高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

基于分子动力学模拟的潜在识别区域下Dectin-1对磷酸化β-(1→3)-*D*-葡聚糖的识别机制

钟彬焱[1], 冯　玄[2], 高余福[1], 詹森华[1], 石彤非[1]
(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广州 510006;
2. 南洋理工大学化学工程与生物技术学院, 新加坡 637459, 新加坡)

摘要　结合分子对接与分子动力学(MD)模拟方法, 探究了磷酸化三螺旋线性β-(1→3)-葡聚糖(TH-CP)与树突状细胞相关C型凝集素-1(Dectin-1)之间的相互作用机制. 研究结果表明, O_6及$O_{4,6}$位点的磷酸化修饰在Dectin-1表面引入了稳定的潜在结合位点, 使TH-CP能够与Dectin-1形成热力学上有利且结构稳定的复合物. 在潜在位点的3种识别方式中, 呈表位识别模式的复合物表现出显著的结合优势. 这主要源于表位识别构型下, TH-CP能够与潜在位点周围更多的氨基酸残基发生协同作用, 从而获得更强的范德华相互作用和静电相互作用. 此外, 磷酸基团中多个羟基可作为灵活的氢键供体和受体, 构建区别于经典位点的新型氢键网络, 使潜在位点介导的识别能力与未修饰β-(1→3)-葡聚糖在经典结合位点的识别能力相当.

关键词　β-(1→3)-葡聚糖; 磷酸化; 树突状细胞相关C型凝集素-1; 识别机制; 分子动力学模拟
中图分类号　O636　　**文献标志码**　A　　doi: 10.7503/cjcu20250401

Recognition Mechanism of Dectin-1 for Phosphorylated β-(1→3)-*D*-Glucan in Potential Recognition Regions Based on Molecular Dynamics Simulations

ZHONG Binyan[1], FENG Xuan[2], GAO Yufu[1], ZHAN Senhua[1], SHI Tongfei[1*]
(*1. School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou* 510006, *China*;
2. School of Chemical Engineering and Biotechnology, Nanyang Technological University, Singapore 637459, *Singapore*)

Abstract　Molecular docking combined with molecular dynamics (MD) simulations was employed to investigate the interaction mechanisms between phosphorylated triple-helical linear β-(1→3)-glucan (TH-CP) and dendritic cell-associated C-type lectin-1 (Dectin-1). The results demonstrate that phosphorylation at the O_6 and $O_{4,6}$ positions introduces stable potential binding sites on the surface of Dectin-1, enabling TH-CP to form thermodynamically favorable and structurally stable complexes with the receptor. Among the three recognition modes identified at the potential binding site, complexes adopting an epitope recognition pattern exhibit a pronounced binding advantage. This behavior mainly arises from the cooperative interactions between TH-CP and a larger number of surrounding amino acid residues at the potential site, leading to enhanced van der Waals and electrostatic interactions. In addition, multiple hydroxyl groups within the phosphate moieties can act as flexible hydrogen bond donors and acceptors, giving rise to

收稿日期: 2025-12-26. 网络首发日期: 2026-04-01.
联系人简介: 石彤非, 男, 博士, 教授, 主要从事多糖与蛋白的相互作用方面的研究. E-mail: tfshi@gdut.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22473032)资助.
Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22473032).

a novel hydrogen-bonding network distinct from that at the classical binding site. As a result, the recognition capability mediated by the potential binding site is comparable to that of unmodified β-(1→3)-glucan interacting with Dectin-1 at the classical binding site.

Keywords β-(1→3)-Glucan; Phosphorylation; Dendritic cell-associated C-type lectin-1; Recognition mode; Molecular dynamic simulation

线性β-(1→3)-葡聚糖(Curdlan)是一种由*D*型吡喃葡萄糖单元通过β-(1→3)-糖苷键连接组成的天然均聚糖，其糖链结构基本不含β-(1→6)支链[1,2]. 该类β-(1→3)-葡聚糖广泛存在于细菌和真菌细胞壁中，是重要的结构成分，可作为病原体相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns，PAMPs)被人类先天免疫系统中的模式识别受体树突状细胞相关C型凝集素-1(Dectin-1)识别[3,4]. Dectin-1是一种C型凝集素样模式识别受体(Pattern recognition receptor，PRR)，其主要功能是特异性识别β-(1→3)-葡聚糖，从而触发一系列免疫应答过程，包括细胞因子的产生、吞噬作用和活性氧(Reactive oxygen species，ROS)的产生等[5~7]. 研究结果表明，在Dectin-1的碳水化合物识别域(Carbohydrate recognition domain，CTLD)中，由Trp221，His223和Tyr228等氨基酸残基构成的凹槽区域是β-(1→3)-葡聚糖的关键结合位点(下文称为经典位点)，在配体识别与结合过程中发挥着核心作用[8~10]. β-(1→3)-葡聚糖在水溶液中可呈现无规卷曲、单螺旋、双螺旋和三螺旋等多种构象[11~13]. 其中，Zhang等[14]和Jiang等[15]认为三螺旋构象是β-(1→3)-葡聚糖发挥生物活性的关键结构基础. 三螺旋β-(1→3)-葡聚糖通常不溶于水、醇及大多数有机溶剂[16]，较差的溶解性严重限制了其在食品和医学领域中的应用[17,18]. 因此，在保持三螺旋构象及生物活性的前提下，提高β-(1→3)-葡聚糖在水溶液中的溶解度至关重要. 目前，提高多糖溶解度的策略主要有通过酶水解、酸水解、碱中和或水热处理将高分子量多糖降解为低聚糖[19~21]及通过化学修饰手段在不显著改变多糖主链结构和聚合度的情况下改善其理化性质两种方法. 常见的化学修饰包括磷酸化和硫酸化[22~24]，其中磷酸化修饰不仅能够显著提高多糖的水溶性，还能在较大程度上保留甚至增强其免疫和抗肿瘤活性. Xia等[25]发现磷酸化可用于降低天然多糖的高黏度，提高其水溶性和生物活性；Shetty等[26]发现磷酸化琼脂(P-AG)显著抑制了肿瘤细胞的增殖；Huang等[27]发现磷酸化葡聚糖的抗肿瘤活性比未修饰的葡聚糖更强；Chen等[28]发现，与硫酸盐或羧甲基基团相比，磷酸基团修饰多糖有利于提高抗肿瘤活性.

近期的研究表明，化学修饰不仅能改善多糖的理化特性，还能改变多糖与受体蛋白的相互作用模式并调控生物活性[29]. 例如，对N-和O-聚糖的末端进行α2,6-唾液酸化，可以显著改变糖结合蛋白对糖链的识别能力，从而调节免疫信号[30]. 作为典型的模式识别受体，血树突状细胞抗原-2(BDCA-2)主要通过其碳水化合物识别结构域识别聚糖的末端糖残基，因此聚糖末端的改变将直接影响其结合能力[31]. 此外，基于表面等离子体共振(SPR)实验，已有研究表明Dectin-1能够以不同于经典β-葡聚糖的结合模式识别非β-葡聚糖糖簇，该结合过程不完全依赖已知的β-葡聚糖结合位点[32]. 这一现象说明Dectin-1可能具有尚未充分阐明的额外或扩展的碳水化合物识别界面. 同时引入化学修饰基团(如磷酸基团)可能会显著影响氢键和静电相互作用，而这些因素正是碳水化合物-蛋白质识别的关键决定因素[33]. 因此，将磷酸基团取代基引入β-(1→3)-葡聚糖分子[34]中有可能通过调控分子间氢键和静电相互作用，诱导其与Dectin-1之间形成不同于经典模式的相互作用界面，从而暴露或产生潜在的结合位点. 因此，探究磷酸化修饰能否诱导β-(1→3)-葡聚糖与Dectin-1之间形成潜在的结合位点，具有至关重要的意义.

然而，仅凭实验手段难以从分子层面阐明化学修饰对β-(1→3)-葡聚糖与Dectin-1识别过程的影响机制. 分子动力学(MD)模拟[35]为解析多糖-蛋白质相互作用提供了一种强有力的计算方法. 已有研究利用MD成功揭示了β-(1→3)-葡聚糖与Dectin-1之间的识别机制和关键相互作用，从而深入揭示了聚糖与蛋白之间的结合信息[15,36,37]. 此外，MD还被广泛用于探究化学修饰对聚糖理化性质及构象行为的影响，如硫酸化程度对β-(1→3)-葡聚糖三螺旋构象稳定性的调控作用[38]，以及磷酸化修饰对淀粉分子降解行为的影响等[39].

本文首先采用分子对接方法[40]预测并筛选了磷酸化β-(1→3)-葡聚糖与Dectin-1之间的潜在结合位点，并在此基础上引入显式溶剂分子动力学模拟，对该潜在位点介导的复合物体系进行了系统性的研究．针对每种复合物均进行了100 ns的分子动力学模拟，重点分析了潜在位点下磷酸化β-(1→3)-葡聚糖-Dectin-1复合物的构象稳定性、关键相互作用和配体识别机制．研究结果揭示了磷酸化β-(1→3)-葡聚糖在该潜在位点与Dectin-1相互识别的作用特征，为理解配体-受体相互作用的分子基础以及该潜在位点可能存在的生物功能提供了新的理论依据．

1 实验部分

1.1 模型搭建

为便于后续描述与讨论，将葡聚糖单元糖环上的主要原子按位置分别标记为C_1，C_2，C_3，C_4，C_5，C_6和O_5，并对与特定碳原子相连的羟基进行标记，如与C_2相连的羟基上的氧原子和氢原子分别表示为O_2和HO_2．由于β-(1→3)-葡聚糖的化学取代为多位点混合取代，即化学修饰基团可取代C_2，C_4及C_6等多种位点上所连的羟基，因此在构建磷酸化β-(1→3)-葡聚糖模型时，在所有可能的修饰位点上引入中性磷酸基团[图1(A)]．同时，由于三螺旋β-(1→3)-葡聚糖(TH-bglc)被认为是其发挥生物活性的关键构象，因此本文主要聚焦于三螺旋构象下的磷酸化β-(1→3)-葡聚糖(Phosphorylated curdlan，CP)与Dectin-1之间的识别和相互作用，其结构如图1(B)所示．已有研究表明，O_2位点的取代会严重破坏链间氢键网络，从而导致三螺旋结构崩溃．鉴于O_2-HO_2链间氢键网络对于维持三螺旋的稳定性至关重要[23,37]，为确保磷酸化后体系仍保持稳定的三螺旋构象，本文仅对O_4和O_6位点进行磷酸化修饰，主要包括对三螺旋所有O_4位置进行取代(O_4取代)、对三螺旋所有O_6位置进行取代(O_6取代)及对三螺旋所有

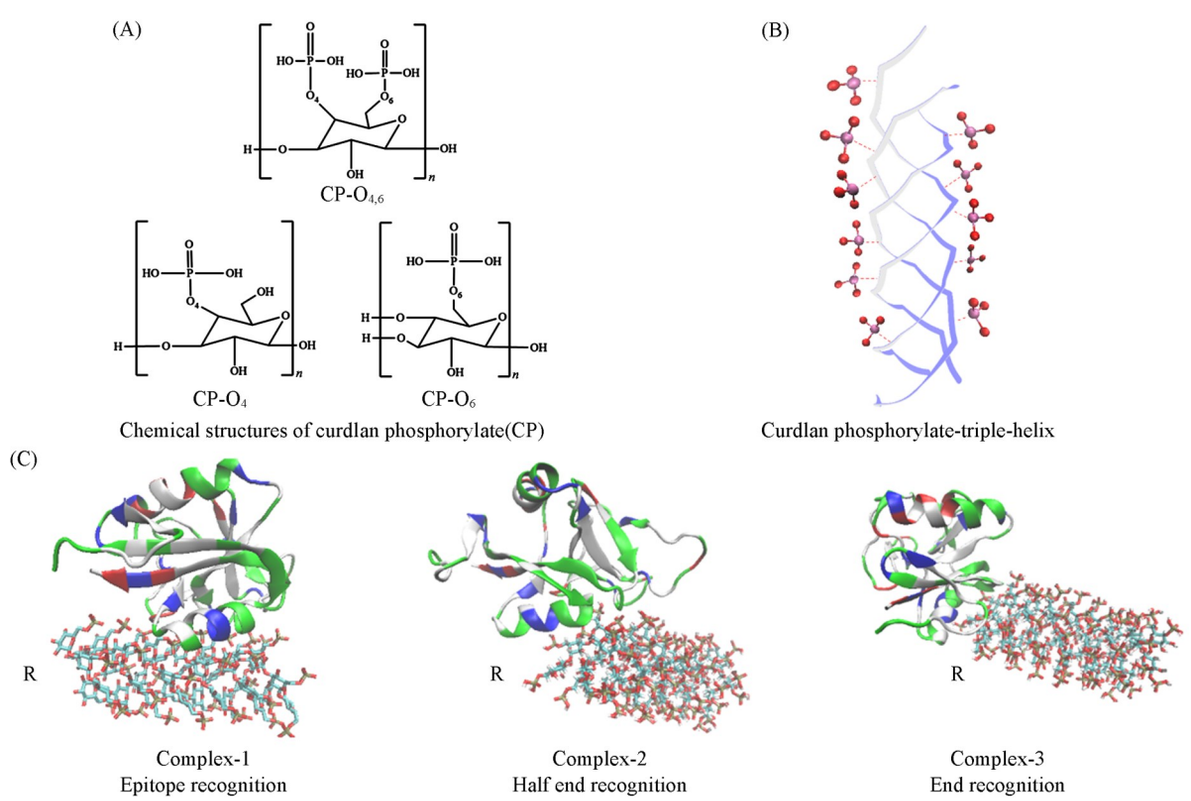


Fig. 1 The main discussion focuses on CP and its complex structure

(A) Chemical structures showing phosphorylation substitution at the O_4, O_6 and $O_{4,6}$ sites; (B) triple helical β-(1→3)-glucan structure with 12 glucose units per chain; oxygen atoms are shown in red and phosphorus atoms in purple; hydrogen atoms are removed for clarity; (C) complexes with three different binding modes, where R denotes the reducing end; molecular models are visualized using the molecular graphics software VMD[42].

O_4和O_6位置进行取代($O_{4,6}$取代)，即三螺旋上不同位点的取代率均为100%[15].

Dectin-1的三维结构取自蛋白质数据库(PDB ID:2BPD，链B)，并在分子模拟之前补加缺失的非极性氢原子. 随后，利用HADDOCK网络服务器对CP与Dectin-1的分子对接，根据其打分函数筛选出得分最高的3个模型，从而得到预测可靠性较高的复合物模型[40,41]. 将O_4，O_6和$O_{4,6}$取代的CP分别与Dectin-1进行了对接. 对接结果表明，O_6取代和$O_{4,6}$取代的CP在Dectin-1表面形成了稳定的潜在位点，且这些潜在位点均位于不同于已知经典β-葡聚糖结合位点的Dectin-1的下部区域，仅结合方式有所不同[42]，其结果如图1(C)所示. 本文按照表位识别、半端部识别和端部识别的结合方式将不同取代位点的复合物模型分为Complex-1(O_6模型)、Complex-2($O_{4,6}$模型1)和Complex-3($O_{4,6}$模型2)，将复合物对应的三螺旋CP(TH-CP)分别标记为CP-1，CP-2和CP-3.

1.2 模拟协议

本文关键模拟条件与未改性的经典位点的模拟条件相同[15]，并且所有模拟均使用GROMACS软件(GROMACS-2019.6/GROMCS-2022.5)完成[43,44]. 体系中所有原子之间的相互作用参数均来自CHARMM36力场[45,46]. 在显式溶剂模拟中，石泽南等[47]将所有复合物模型放在立方体盒子的中心位置，使用TIP3P水模型进行溶剂化，并通过向体系中添加Na^+进行电荷中和. 在整个模拟过程中，盒子的边界应用了周期性边界条件[48]. 具体的模拟过程如下：首先使用最陡下降算法对体系进行能量最小化，然后在NVT和NPT系综中模拟100 ps进行约束分子动力学预平衡[49]，最后，在NPT系综中对体系进行100~350 ns的无偏分子动力学模拟，并收集轨迹数据进行采样分析. 模拟采用高效的随机动力学方法(GROMACS中的参数*sd*)进行积分，时间步长为1 fs. 该方法在积分过程中实现了对体系的温度控制，参考温度为298 K，温度耦合的弛豫时间为2 ps. 使用Berendsen算法[50]将压力保持在100000 Pa，压力耦合的弛豫时间为1 ps. Lincs方法[51]用于约束所有共价键. 使用截断方法计算短程相互作用，截断半径为1.20 nm. 使用粒子网格Ewald方法[52]计算静电相互作用的倒易部分，网格空间尺寸为0.0175 nm.

1.3 结构表征策略

1.3.1 稳定性分析 均方根偏差(RMSD)量化了模拟轨迹中给定时间点的构象与参考结构之间的结构差异，因此被广泛用于评估复合物结构在分子动力学模拟过程中是否达到平衡，以及平衡后系统的结构稳定性[53]. 对于不同复合物体系，RMSD均采用各自对应的初始构象(即模拟中t=0时刻对应的构象)[图1(C)]作为参考结构进行计算.

为了详细了解Dectin-1在识别CP期间的微观结构变化，本文计算了均方根波动(RMSF)[54,55]，并使用蛋白质二级结构定义程序(DSSP)计算了Dectin-1的二级结构变化[54,56]. RMSF值量化了每个氨基酸残基的局部灵活性[57]. DSSP可跟踪α螺旋、β折叠和转角/弯曲的形成和破坏，从而评估二级结构的稳定性[58].

为了表征CP的构象，本文计算了糖苷键二面角φ(φ=O_5-C_1-O-C_3)和ψ(ψ=C_1-O-C_3-C_2)[59]以描述骨架柔性和链间取向[60]. 此外，根据gmx puckering计算得到的Cremer-Pople参数θ可确定吡喃糖环的构象[61].

1.3.2 氢键 氢键在配体-2受体结合和维持所得复合物的稳定性方面起着至关重要的作用. 因此，本文统计了稳定的复合物中Dectin-1和CP分子间的氢键数量，并计算了其氢键占有率[62]，研究了磷酸化对氢键介导识别的影响. GROMACS根据几何准则来判断氢键是否存在：若氢键供体和受体之间的距离≤0.035 nm，且氢原子-供体-受体之间的角度≤30°，则认为存在该氢键. 氢键占有率表示特定氢键存在的时间占总模拟时间的比例，反映了其在整个轨迹的稳定性和持久性. 所有氢键数据均使用GROMACS工具gmx hbond计算

1.3.3 相互作用能 分子力学能量与泊松-玻尔兹曼(或广义玻恩)表面积连续介质溶剂化[MMPB(GB)SA]相结合的方法为估算蛋白质-配体之间的结合自由能提供了一个理论框架[63~65]. 因此MMPB(GB)SA在药物设计和生物分子相互作用分析中得到了广泛的应用. 通过连续溶剂模型(PB或GB方程)，

MMPB(GB)SA可将总结合自由能分解为不同的物理贡献，如范德华能、静电能和溶剂化能．在该研究中，gmx_MMPBSA工具包[66,67]用于计算Dectin-1和CP之间的结合自由能(ΔG_{bind}，kJ/mol)，并将其分解为范德华能(ΔE_{vdW}，kJ/mol)、静电相互作用能(ΔE_{elec}，kJ/mol)、极性溶剂化自由能(ΔG_{polar}，kJ/mol)和非极性溶剂化自由能($\Delta G_{nonpolar}$，kJ/mol)．该方法可以定量评估Dectin-1与CP的结合强度，并揭示识别位点的详细相互作用[68~72]，为探究潜在位点处的分子识别机制提供重要线索．

2 结果与讨论

2.1 TH-CP-Dectin-1复合物稳定性分析

以Complex-1，Complex-2和Complex-3复合物模型为初始构象，为评估通过潜在识别位点形成的复合物稳定性，对TH-CP与Dectin-1在不同结合方式下形成的复合物的稳定性进行了分析，结果如图2所示．模拟结果表明，所识别的潜在识别位点并不位于Dectin-1 CTLD的凹槽区域附近，说明该结合区域与传统认为的β-(1→3)-葡聚糖与Dectin-1的经典结合位点无明显关联．图2中RMSD的结果显示，在100 ns的模拟时间内，TH-CP与Dectin-1通过潜在识别位点形成的各类复合物模型均能够保持稳定，未观察到受体和配体发生明显分离的现象．该结果表明，该潜在结合位点可能作为一种新的识别界面，使Dectin-1能够通过该位点识别TH-CP，并在结构层面上为其免疫功能的维持提供基础．不同的结合方式中，表位识别样本(Complex-1)的RMSD结果最稳定，说明即使是在潜在位点，表位识别仍然是Dectin-1和TH-CP的主要识别模式[15]．而半端部识别(Complex-2)与端部识别(Complex-3)在模拟过程中虽存在一定程度的构象波动，但未出现显著的结构解链或脱离现象，表明TH-CP仍可通过多种结合方式稳定识别Dectin-1的潜在位点．Complex-2与Complex-3的RMSD波动主要源于模拟过程中配体与受体相对空间位置的逐步调整，以寻求最优的结合构象．在所有的复合物模拟中，三螺旋聚糖和Dectin-1的RMSD在模拟时间内均能够保持稳定，说明O_6和$O_{4,6}$位点的磷酸化修饰并未破坏TH-bglc的三螺旋结构，同时TH-CP的结合也并未引起Dectin-1的整体结构发生显著的变化．

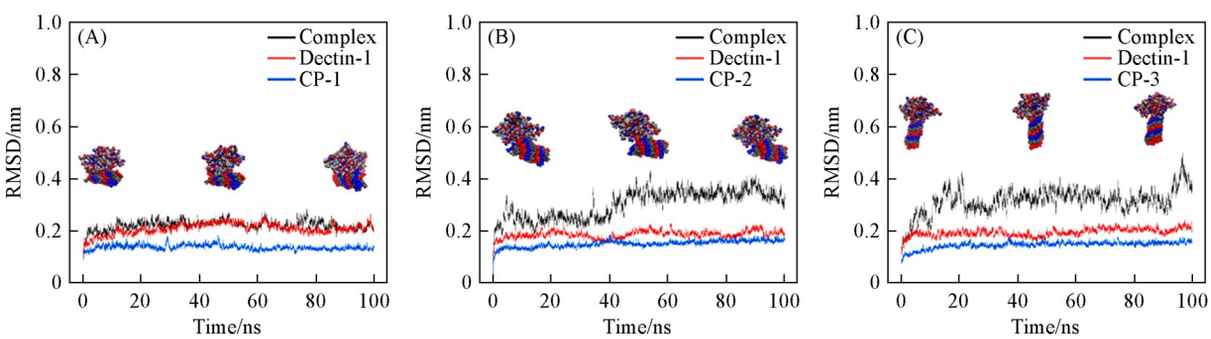


Fig. 2 RMSDs of CP-1 substituted with O_6 and Dectin-1 and their corresponding complex(Complex-1, A), CP-2 substituted with $O_{4,6}$ and Dectin-1 and their corresponding complex(Complex-2, B), and CP-3 substituted with $O_{4,6}$ and Dectin-1 and their corresponding complex(Complex-3, C)

The insets show the representative structural snapshots of the complexes at different simulation times.

2.2 MMPB(GB)SA结合能分析

为了进一步探究TH-CP和Dectin-1在潜在识别位点的结合能力，使用MMPB(GB)SA方法，选择Complex-1，Complex-2和Complex-3最后20 ns轨迹的平衡阶段来计算其配体和受体之间的结合自由能(ΔG，kJ/mol)．表1示出了在相同潜在结合位点采用不同结合方式形成的3种复合物的结合能以及各种分解能量的贡献．从表1可以看出，Complex-1，Complex-2和Complex-3的ΔG分别为−127.654，−96.316和−96.106 kJ/mol，该结果表明TH-CP与Dectin-1通过潜在位点形成的复合物在热力学上是有利的，其识别过程可自发进行．值得注意的是，Complex-1与Dectin-1的结合能与文献报道的未修饰的TH-bglc在经典位点与Dectin-1的结合能相当(后文称为未修饰的经典位点识别)[15]，这证实了磷酸化修饰的TH-bglc与Dectin-1在潜在位点具有较强的结合能力，进一步增强了潜在位点作为新的识别位点

Table 1 Predicted binding energies and individual energy components of the Dectin-1 complexes with CP and TH-bglc

Gmx_mmpbsa	ΔE_{vdW}/(kJ·mol^{-1})	ΔE_{elec}/(kJ·mol^{-1})	ΔG_{polar}/(kJ·mol^{-1})	$\Delta G_{nonpolar}$/(kJ·mol^{-1})	ΔG_{bind}/(kJ·mol^{-1})
TH-bglc	−231.681	−278.322	418.977	−37.510	−128.535
Complex-1	−265.140	−363.046	538.899	−38.367	−127.654
Complex-2	−231.166	−175.561	343.339	−32.928	−96.316
Complex-3	−194.263	−239.492	362.502	−24.811	−96.106

存在的可能性. 在3个复合物模型中，表位识别的Complex-1表现最优，说明表位识别仍是TH-CP与Dectin-1最有利的结合方式，磷酸基团的引入并未改变其与Dectin-1的结合方式.

结合自由能的能量贡献分解结果表明，不论是未修饰的经典位点的TH-bglc样本，还是潜在结合位点的TH-CP样本，其范德华相互作用、静电相互作用和非极性溶剂化自由能均对结合有利，其中范德华和静电相互作用为主要贡献，而极性溶剂化自由能则对结合不利. Complex-1的范德华作用力和静电相互作用都更强，这说明表位识别的CP-1配体与蛋白的潜在位点相互作用时，其表面特征与蛋白界面更贴合，同时极性强的磷酸基团可与周围极性氨基酸残基形成更强的静电作用. 但由于磷酸基团的引入显著提高了聚糖的亲水性，在识别过程中部分磷酸基团直接参与结合界面的形成，从而削弱了结合态下聚糖与溶剂的相互作用，导致更高的脱溶剂化代价，这部分代价抵消了范德华和静电相互作用带来的优势，最终使得整体结合力与未修饰的经典位点识别相似. 而采用半端部和端部识别的Complex-2和Complex-3，由于参与界面的磷酸基团数量比Complex-1少，因此脱溶剂化代价也比Complex-1小，但参与识别的氨基酸残基和聚糖基团数量也明显减少，从而导致范德华和静电相互作用更小，因此使其总结合能低于表位识别模式的Complex-1，这进一步说明端部结合不是优势结合，而以三螺旋中部结合为特征的表位构象模式仍是优势识别模式，符合TH-bglc的内窥型识别的结构特征[15]. 综上所述，表位识别不仅在TH-CP与Dectin-1的相互作用中起到关键作用，同时也提示Dectin-1潜在位点的识别可能具有一定的生物学功能意义.

2.3 结合自由能残基分解分析

为了更详细地研究TH-CP与Dectin-1在潜在位点处的相互作用特征，对复合物样本Complex-1，Complex-2和Complex-3进行了结合自由能的残基分解分析，结果如图3(A_1~A_3)所示. 分析表明，在潜在位点识别过程中，对结合自由能贡献显著的Dectin-1残基主要集中在140~145，185~187，215~218，192~197以及231~233等5个区域[图3(D)]. 与未修饰的经典位点识别相比，TH-bglc与Dectin-1的结合区域为175~177，209~211，221，223和228[15]，这与潜在位点涉及的结合区域几乎不存在重叠，这一结果表明，TH-CP与Dectin-1在潜在位点的识别方式与经典位点显著不同. 值得注意的是，在3种识别方式中，Complex-1参与识别的Dectin-1残基数量明显多于Complex-2和Complex-3[图3(B_1~B_3)]，说明在表位识别模式下，更多新的氨基酸残基与CP-1发生接触并参与结合. 这一特征也合理地解释了Complex-1样本相对于TH-bglc复合物样本具有更有利的范德华和静电作用以及更不利的极性溶剂化作用. 进一步分析发现，194/195残基在Complex-1中对结合自由能具有极为显著的贡献，其既表现出强烈的静电相互作用，同时也伴随较高的极性溶剂化代价；而在Complex-2和Complex-3中，194/195残基对结合自由能的贡献却几乎可以忽略. 这一差异解释了为何Complex-1的静电相互作用和极性溶剂化作用均强于其它模型. 可见，由于CP-1在潜在位点接触了更多Dectin-1残基，从而产生更强的范德华相互作用，同时194/195残基提供了额外的强静电贡献，使得其在3种识别方式中表现出最强的结合能力.

同时，对TH-CP本身在不同复合物中的能量贡献进行了残基分解分析，以进一步阐明葡聚糖在不同识别方式中的识别结合机制，结果如图3(C_1~C_3)所示. 结果表明，在潜在位点的识别过程中，TH-CP主要通过位于三螺旋外表面的糖单元与Dectin-1进行接触[图3(D)]. 这些糖单元在三螺旋结构表面呈现紧密堆积、规则交替排列的空间模式. 若将聚糖从还原端到非还原端进行编号，同时将三螺旋的三条链标记为A链、B链和C链，则在Complex-1样本中，参与识别的糖单元包括B链的4号糖单元，C链

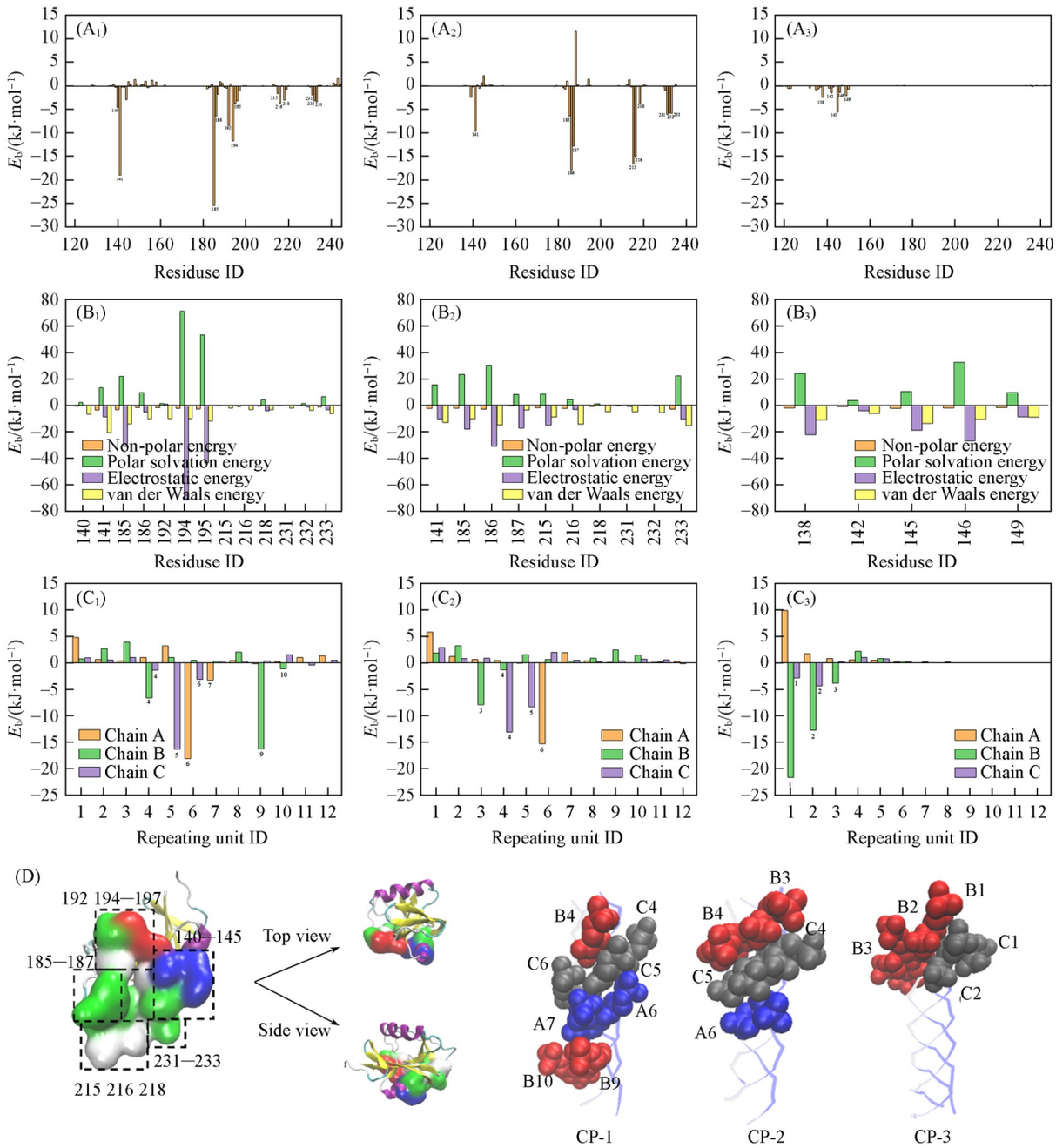


Fig. 3 Residue binding energy analysis

(A_1—A_3) Contributions of key amino acid residues in Dectin-1 to the total binding energy of the Dectin-1-CP-1(A_1), Dectin-1-CP-2(A_2), Dectin-1-CP-3(A_3) complexes; (B_1—B_3) contributions of key amino acid residues in Dectin-1 to individual energy components (van der Waals, electrostatic, polar solvation, and non-polar solvation) in the Dectin-1-CP-1 (B_1), Dectin-1-CP-2 (B_2), Dectin-1-CP-3 (B_3) complexes; (C_1—C_3) energy decomposition profiles of the three chains (Chain A, Chain B and Chain C) in the Dectin-1-CP-1 (C_1), Dectin-1-CP-2 (C_2), Dectin-1-CP-3 (C_3) complexes (each panel shows the contributions of the three chains within one CP model); (D) schematic illustration of the recognition site region of Dectin-1 and the epitope recognition patterns of TH-CP samples with different substitutions patterns; the left panel shows the key residues forming the recognition region of Dectin-1 (top and side views); the right panels represent CP-1, CP-2, and CP-3 from left to right; the three chains of the triple helix are shown in different colors, highlighting the glucose units involved in epitope recognition from each individual chain.

的4~6号糖单元，A链的6号和7号糖单元和B链的9号和10号糖单元，这些糖单元按照顺序从O_6取代三螺旋的还原端到非还原端层层堆叠，具有特定几何构型的排列模式，该特征清晰地体现了表位识别的模式，与前述CP-1在表位识别模式下具有最优结合能力的结果高度一致．这说明潜在位点并未改变

TH-CP的典型识别方式，其仍然遵循与未修饰经典位点相同的表位构象识别模式[73]. 其中，这些结构紧密、相邻堆叠的吡喃糖单元是TH-CP与Dectin-1稳定结合的关键因素之一.

2.4 氢键分析

氢键是维持蛋白质、核酸等生物大分子三维结构的关键相互作用，同时也是分子识别过程中决定特异性和亲和力的重要非共价作用[74]. 已有研究表明，未改性的TH-bglc和Dectin-1之间形成的氢键网络在二者的识别过程中起着至关重要的作用. 因此，针对潜在位点上的TH-CP与Dectin-1的识别，本文统计并比较了3种不同识别方式的受体与配体之间可能存在的氢键数量(图S1，见本文支持消息). 研究结果表明，在整个模拟过程中，采取表位识别模式的Complex-1更容易形成稳定氢键，其氢键数量明显高于半端部识别的Complex-2和端部识别的Complex-3. 表明表位识别模式在潜在位点同样更有利于形成稳固的相互作用网络.

为了进一步探究氢键网络在识别过程中的具体作用机制，对模拟时间内氢键的占有率进行了统计分析. 表2和表S1(见本文支持消息)分别列出了在100 ns时间内3种识别方式的TH-CP与Dectin-1之间氢键占有率大于10%的氢键. 由表2可知，TH-CP与Dectin-1之间的大多数稳定氢键均由磷酸基团与氨基酸残基形成，且磷酸基团能够与氨基酸残基构建关键的特征氢键网络，主要表现在两个方面：(1) 一个磷酸基团能够与多个氨基酸残基形成氢键网络，如在Complex-1中，B链的第9号糖单元的磷酸基团($B_9H_2PO_3$)能够同时与Lys144和Glu194形成氢键[图4(A)]. (2) 一个氨基酸残基能够与一个糖单元的不同原子形成氢键网络，如在Complex-1中，B链的第10号糖单元的磷酸基团($B_{10}H_2PO_3$)的两个氢原子能够与Asp195形成氢键[图4(B)]. 值得注意的是，第二类特征氢键网络在未修饰的经典位点识别中并未观察到. 相比之下，半端部识别(Complex-2)和端部识别(Complex-3)虽然同样可形成第一类特征氢键网络，但由于其结合界面中参与识别的氨基酸残基和聚糖基团有限，所形成的氢键占有率明显低于表位识别模式的Complex-1(表S1). 综上所述，与未修饰β-(1→3)-葡聚糖主要依赖糖环羟基形成氢键不同，磷酸化修饰引入的磷酸基团提供了多个额外的氢键供体/受体位点，而多种由磷酸基团介导的氢键网络在潜在位点的协同作用是使Complex-1的结合能能够与未改性的经典位点相当的重要原因之一.

Table 2 Hydrogen bond occupancies(>10%) between Dectin-1 and the O_6 substitution CP-1 complex

Dectin-1 residue	TH-CP chemical group*	Occupancy(%)	Dectin-1 residue	TH-CP chemical group*	Occupancy(%)
Tyr141	C_5PO_{63}	14.9	Asn185(O)	B_4HPO_{61}	30.3
Lys144(HZ1)	A_6PO_{63}	82.1	Glu194(O)	B_9HPO_{61}	54.7
Lys144(HZ1)	B_9PO_{63}	37.8	Glu194(OE1)	B_9HPO_{62}	16.9
Arg145	C_4PO_{63}	44.3	Asp195(O)	$B_{10}HPO_{62}$	47.3
Asn185(HD21)	B_4O_4	86.1	Asp195(O)	A_6HO_4	33.3
Asn185(HD21)	C_5O_6	79.6	Asp195(O)	$B_{10}HPO_{61}$	24.4
Asn185(O)	B_4HPO_{62}	51.2			

*The first number indicates the number of the repeating unit, which is numbered starting from the reducing end of the A, B, and C chains of CP. HO_6 denotes the hydroxyl hydrogen at C_6, HPO_{61} and HPO_{62} denote the hydroxyl hydrogens at C_6; OE1 and O represent oxygen atoms, and HD21 and HZ1 represent hydrogen atoms.

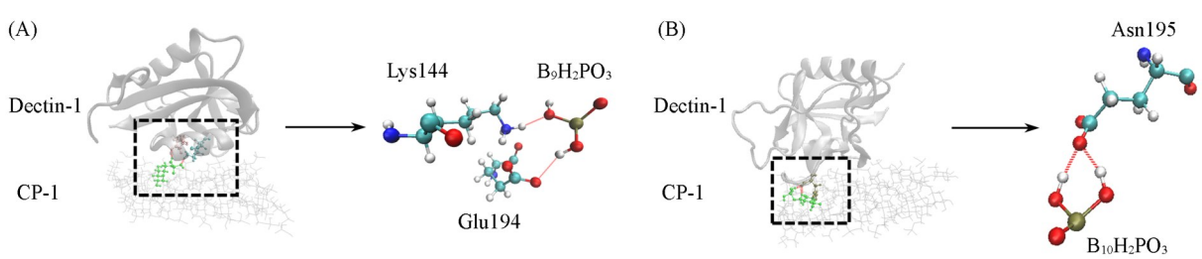


Fig. 4 Schematic representation of the major hydrogen bonds formed between Dectin-1 and CP-1

The portions of two characteristic hydrogen-bonding networks. Hydrogen bonds between Dectin-1 and CP-1 are indicated by red dashed lines. (A) Hydrogen-bonding network involving Lys144 and Glu194 residues of Dectin-1 with CP-1; (B) hydrogen-bonding network involving the Asn195 residue of Dectin-1 with CP-1. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines.

2.5 TH-CP与Dectin-1的结构表征

在确认复合物整体稳定的基础上(图2)，进一步从残基柔性和二级结构层面对Dectin-1的构象进行分析. 计算了3种复合物的Dectin-1的RMSF和DSSP，其结果如图5和图S2(见本文支持信息)所示. 由图5(A)可见，在整个模拟过程中，Dectin-1的α-helix结构始终保持高度稳定，β-sheet区域未出现断裂或重排，仅在Turn，bend和coil之间观察到正常的热涨落. 这表明在潜在位点下，TH-CP的结合不会破坏Dectin-1的整体折叠框架，其核心二级结构在动力学尺度上保持良好稳定性. 进一步评估了配体不同识别方式对Dectin-1局部柔性的影响. 由图5(B)可见，所有体系的RMSF值主要集中在0.05~0.15 nm的低波动区间，潜在结合位点识别与未修饰的经典位点识别的RMSF趋势上展现高度重合[15]，

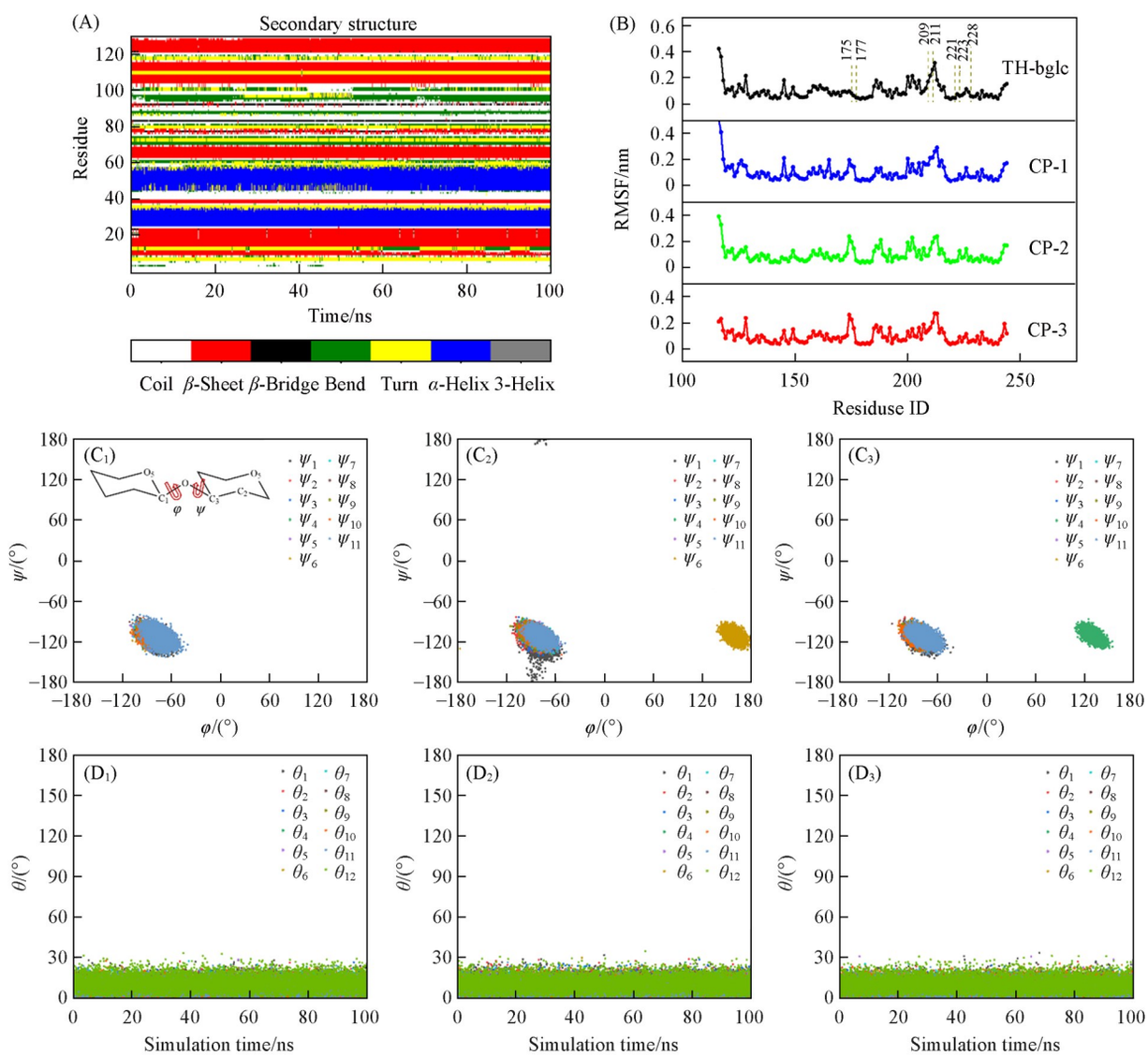


Fig. 5 Structural analysis of CP-1 and its Dectin-1

(A) Secondary structure (DSSP) of the Dectin-1 protein under O_6 substitution; (B) root mean square fluctuation (RMSF) profiles of Dectin-1 residues in four systems: TH-bglc, CP-1, CP-2, and CP-3; residues 175—177, 209—211, and 221, 223, and 228 are highlighted by dashed lines; (C_1—C_3) distributions of glycosidic bond dihedral angles (φ and ψ) for each chain in the triple-helical conformation of CP-1; the panels correspond to Chain A (C_1), Chain B (C_2), and Chain C (C_3), respectively, ψ_1—ψ_{11} denote the glycosidic dihedral angles between adjacent glucose units along each chain; (D_1—D_3) fluctuations of the θ ring puckering parameter for each chain in CP-1, the panels correspond to Chain A (D_1), Chain B (D_2), and Chain C (D_3), respectively, θ_1—θ_{12} represent the ring puckering parameters of individual glucose residues, calculated based on the O_5-C_1-C_2-C_3-C_4-C_5 atom sequence.

这说明Dectin-1在配体的不同结合方式下均维持整体结构稳定，潜在位点识别并未引起Dectin-1的构象扰动.

RMSD分析结果显示聚糖结构稳定(图2). 为进一步刻画TH-CP的构象特征，计算了不同TH-CP的各链糖苷键二面角分布和糖环Cremer-Pople特征参数随时间的变化情况，如图5(C)和(D)及图S3和S4(见本文支持信息)所示. 糖苷键二面角分析表明，其二面角主要稳定分布在(φ,ψ)≈(−80°, −110°)，仅极少部分的糖苷键发生改变，这与未修饰的经典位点识别结果基本相同[15]. 这表明Dectin-1的不同结合位点不会影响bglc的三螺旋构象，而稳定的三螺旋构象正是TH-CP能够在潜在位点形成稳定结合的结构基础. 此外，所有葡萄糖环的Cremer-Pople参数θ均小于30°，表明三螺旋中糖环的构象均为$^4C_1$椅式构象，未观察到其它糖环构象的产生. 因此，无论是TH-CP还是Dectin-1，其微观结构在模拟过程中均表现出良好的稳定性，而这种构象稳定性是二者能够在潜在位点形成稳定复合物的重要前提.

3 结　　论

三螺旋β-(1→3)-葡聚糖与受体Dectin-1之间的识别在先天免疫应答中发挥着重要作用. 然而，磷酸化修饰在显著提高β-(1→3)-葡聚糖的溶解度的同时，也可能引入新的潜在位点，而这种潜在位点是否会影响其与Dectin-1的识别机制仍缺乏系统认识. 基于此，本文使用分子动力学和对接技术研究了O_6位点和$O_{4,6}$位点磷酸化的三螺旋β-(1→3)-葡聚糖在潜在位点下的结构稳定性及其与Dectin-1的识别行为. 主要结论如下：(1) 处于潜在位点的3种识别方式的TH-CP依旧能保持稳定的三螺旋构象，与处于未改性的经典位点的TH-bglc构象基本一致. TH-CP的糖苷键和糖环微观构象未出现失稳，依然表现出典型的层层排列的表位识别模式. 处于潜在位点的TH-CP能够与受体蛋白Dectin-1形成紧密结合的复合物，且在模拟的时间尺度内保持稳定，其中表位识别模式的Complex-1的构象最平稳. Dectin-1的潜在识别区域为残基140~145，185~187，215~218，192~197以及231~233，这几乎不与未改性的经典位点重合. (2) 结合自由能的计算结果表明，潜在位点的磷酸化三螺旋结构在热力学上能够自发进行. 其中，处于中部表位结合位置的Complex-1表现出最优的结合能力，其结合自由能与处于未改性的经典位点的TH-bglc复合物的结合能相当；而处于半端部识别(Complex-2)和端部识别(Complex-3)的复合物的结合能力明显降低，其根本原因在于CP-1能够与Dectin-1更多氨基酸残基发生相互作用，从而获得更有利的范德华作用和静电作用. 其中185/194/195残基的静电贡献能够很大程度上抵消结合脱溶的极性溶剂化作用所带来的不利影响，使得CP-1的三螺旋构象与Dectin-1的识别更稳定，这些结果说明表位识别依然是优势识别模式. (3) 氢键分析结果进一步表明，在潜在位点的识别过程中，TH-CP与Dectin-1之间形成了区别于未改性的经典位点的新型氢键网络. 这是因为磷酸基团中多个处于相似化学环境的羟基既可作为氢键供体，也可作为氢键受体，与相同或不同的氨基酸残基能够形成氢键. 新的氢键网络类型增强了处于潜在位点的TH-CP-Dectin-1复合物的稳定性.

模拟/对接研究结果不仅揭示了Dectin-1潜在位点参与磷酸化β-(1→3)-葡聚糖识别的结构与热力学基础，而且为理解磷酸化修饰在调控β-(1→3)-葡聚糖免疫识别行为中的作用机制提供了新的分子层面证据. 这些发现可为后续开展Dectin-1潜在识别区域与磷酸化β-(1→3)-葡聚糖相互作用的实验研究提供一定的理论参考.

支持信息见http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20250401.

参　考　文　献

[1] Caseiro C., Dias J. N. R., de Andrade Fontes C. M. G., Bule P., *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*(6), 3156—3157
[2] Saito H., Misaki A., Harada T., *Agric. Biol. Chem.*, **1968**, *32*(10), 1261—1269
[3] Legentil L., Paris F., Ballet C., Trouvelot S., Daire X., Vetvicka V., Ferrières V., *Molecules*, **2015**, *20*(6), 9745—9766
[4] Manabe N., Yamaguchi Y., *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*(4), 1578—1579
[5] Aghaei M., Khademi R., Far M. A. J., Bahreiny S. S., Mahdizade A. H., Amirrajab N., *Curr. Res. Transl. Med.*, **2024**, *72*(4), 103460—103461

[6] Taylor P. R., Tsoni S. V., Willment J. A., Dennehy K. M., Rosas M., Findon H., Haynes K., Steele C., Botto M., Gordon S., *Nat. Immunol.*, **2007**, *8*(1), 31—38
[7] Mansour M. K., Tam J. M., Khan N. S., Seward M., Davids P. J., Puranam S., Sokolovska A., Sykes D. B., Dagher Z., Becker C., *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*(22), 16043—16054
[8] Tsoni S. V., Brown G. D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**, *1143*(1), 45—60
[9] Kimberg M., Brown G. D., *Med. Mycol. Case Rep.*, **2008**, *46*(7), 631—636
[10] Marakalala M. J., Kerrigan A. M., Brown G. D., *Mamm. Genome*, **2011**, *22*(1), 55—65
[11] Cai Z., Zhang H., *Carbohydr. Polym.*, **2021**, *272*, 118456—118457
[12] Zhang R. R., Edgar K. J., *Biomacromolecules*, **2014**, *15*(4), 1079—1096
[13] Guo X. Y., Kang J., Xu Z. Y., Guo Q. B., Zhang L. F., Ning H. F., Cui S. W., *Carbohydr. Polym.*, **2021**, *262*, 117962—117963
[14] Meng Y., Lyu F. Z., Xu X. J., Zhang L. N., *Biomacromolecules*, **2020**, *21*(5), 1653—1677
[15] Feng X., Li F., Ding M. M., Zhang R., Shi T. F., Lu Y. Y., Jiang W., *Carbohydr. Polym.*, **2022**, *286*, 119276—119277
[16] Liu H., Li Y., Gao J., Shi A., Liu L., Hu H., Putri N., Yu H., Fan W., Wang Q., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2016**, *84*, 394—401
[17] Šandula J., Kogan G., Kačuráková M., Machová E., *Carbohydr. Polym.*, **1999**, *38*(3), 247—253
[18] Zekovic D. B., Kwiatkowski S., Vrvic M. M., Jakovljevic D., Moran C. A., *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2005**, *25*(4), 205—230
[19] Giese E. C., Covizzi L. G., Dekker R. F., Monteiro N. K., Da Silva M. D. L. C., Barbosa A. M., *Process Biochem.*, **2006**, *41*(6), 1265—1271
[20] Li J., Zhu L., Zheng Z. Y., Zhan X. B., Lin C. C., Zong Y., Li W. J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2013**, *97*(19), 8495—8503
[21] Wang D., Kim D. H., Yoon J. J., Kim K. H., *Process Biochem.*, **2017**, *52*, 233—237
[22] Chen X., Yu C., Wang J. H., Wu Y. C., Ma Y., Li H. J., *Colloids Surf., A*, **2023**, *674*, 131893—131894
[23] Mei X. Y., Tang Q. L., Huang G. L., Long R., Huang H. L., *Food Chem.*, **2020**, *309*, 125791—125792
[24] Suflet D. M., Nicolescu A., Popescu I., Chitanu G. C., *Carbohydr. Polym.*, **2011**, *84*(3), 1176—1181
[25] Xia S., Zhai Y., Wang X., Fan Q., Dong X., Chen M., Han T., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, *184*, 946—954
[26] Shetty M. P., Tambe P., Rana K., Kulkarni S. D., Chaudhari P., Bharati S., *Cell Biochem. Biophys.*, **2026**, *84*, 581—598
[27] Huang Q., Zhang L., *Carbohydr. Polym.*, **2011**, *83*(3), 1363—1369
[28] Chen X. Y., Xu X. J., Zhang L. N., Zeng F. B., *Carbohydr. Polym.*, **2009**, *78*(3), 581—587
[29] Chen F. M., Sun T., Song H. Z., *J. Agric. Food Chem.*, **2026**, *74*(1), 40—58
[30] Pinho S. S., Alves I., Gaifem J., Rabinovich G. A., *Cell. Mol. Immunol.*, **2023**, *20*(10), 1101—1113
[31] Han B., Baruah K., Cox E., Vanrompay D., Bossier P., *Biophys. Rev. Lett.*, **2020**, *11*, 658—659
[32] Jiang S., Niu S., Yao W., Li Z. J., Li Q., *Carbohydr. Res.*, **2016**, *429*, 148—154
[33] Zhang S., Chen K. Y., Zou X., *Commun. Inf. Syst.*, **2021**, *21*(1), 147—148
[34] Mattox D. E., Bailey-Kellogg C., *PLoS Comput. Biol.*, **2021**, *17*(10), 1009470—1009471
[35] Lei X. T., Jin Y. Q., Meng X. Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2021**, *42*(8), 2550—2557(雷晓彤, 金怡卿, 孟烜宇. 高等学校化学学报, **2021**, *42*(8), 2550—2557)
[36] Feng X., Li F., Ding M. M., Zhang R., Shi T. F., Jiang W., *Carbohydr. Polym.*, **2021**, *261*, 117844—117845
[37] Feng X., Li F., Ding M. M., Zhang R., Shi T. F., *Carbohydr. Polym.*, **2020**, *250*, 116906—116907
[38] Gao Y. F., Feng X., Zhang R., Xiao J., Huang Q. R., Li J. W., Shi T. F., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2024**, *282*, 137119—137120
[39] Hansen P. I., Spraul M., Dvortsak P., Larsen F. H., Blennow A., Motawia M. S., Engelsen S. B., *Biopolymers*, **2009**, *91*(3), 179—193
[40] Yan Y., Tao H., He J., Huang S. Y., *Nat. Protoc.*, **2020**, *15*(5), 1829—1852
[41] Remmert M., Biegert A., Hauser A., Söding J., *Nat. Methods*, **2012**, *9*(2), 173—175
[42] Humphrey W., Dalke A., Schulten K., *J. Mol. Graphics*, **1996**, *14*(1), 33—38
[43] Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E., *SoftwareX*, **2015**, *1*, 19—25
[44] Páll S., Zhmurov A., Bauer P., Abraham M., Lundborg M., Gray A., Hess B., Lindahl E., *J. Chem. Phys.*, **2020**, *153*(13), 5728—5740
[45] Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., de Groot B. L., Grubmüller H., MacKerell A. D. Jr., *Biophys. J.*, **2017**, *112*(3), 71—73
[46] Lee J., Cheng X., Jo S., MacKerell A. D., Klauda J. B., Im W., *Biophys. J.*, **2016**, *110*(3), 405—413
[47] Liao S. W., Liu Y. C., Shi Z. N., Zhao D. H., Wei Y. Y., Li L. B., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, *44*(10), 20230155(廖首维, 刘炎昌, 石泽南, 赵道辉, 魏嫣莹, 李理波. 高等学校化学学报, 2023, *44*(10), 20230155)
[48] Jorgensen W. L., Tirado-Rives J., *PNAS*, **2005**, *102*(19), 6665—6670
[49] Su L. L., Shao X. G., Cai W. S., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, *44*(4), 20220745(粟李醴, 邵学广, 蔡文生. 高等学校化学学报, 2022, *44*(4), 20220745)
[50] Berendsen H. J., Postma J. V., van Gunsteren W. F., DiNola A., Haak J. R., *J. Chem. Phys.*, **1984**, *81*(8), 3684—3690
[51] Hess B., Bekker H., Berendsen H. J., Fraaije J. G., *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*(12), 1463—1472
[52] Darden T., York D., Pedersen L., *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 10089—10090

[53] Kato K., Nakayoshi T., Kurimoto E., Oda A., *Chem. Phys. Lett.*, **2021**, *781*, 139022—139023
[54] Kabsch W., Sander C., *Biopolymers*, **1983**, *22*(12), 2577—2637
[55] Henzler-Wildman K. A., Thai V., Lei M., Ott M., Wolf-Watz M., Fenn T., Pozharski E., Wilson M. A., Petsko G. A., Karplus M., **2007**, *450*(7171), 838—844
[56] Hollingsworth S. A., Dror R. O., *Neuron*, **2018**, *99*(6), 1129—1143
[57] Martínez L., *PLoS One*, **2015**, *10*(3), e0119264—e0119265
[58] Gorelov S., Titov A., Tolicheva O., Konevega A., Shvetsov A., *J. Chem. Inf. Model.*, **2024**, *64*(9), 3593—3598
[59] Perez S., Makshakova O., *Chem. Rev.*, **2022**, *122*(20), 15914—15970
[60] Lutsyk V., Wolski P., Plazinski W., *J. Chem. Theory Comput.*, **2024**, *20*(14), 6350—6368
[61] Li J., *gmxtools*, **2022**
[62] Noumi E., Snoussi M., Bouali N., Alshammari M. M., Altayb H. N., Afzal M., de Feo V., *PLoS One*, **2025**, *20*(7), e0324836—e0324837
[63] Kollman P. A., Massova I., Reyes C., Kuhn B., Huo S., Chong L., Lee M., Lee T., Duan Y., Wang W., *Acc. Chem. Res.*, **2000**, *33*(12), 889—897
[64] Homeyer N., Gohlke H., *Mol. Inf.*, **2012**, *31*(2), 114—122
[65] Genheden S., Ryde U., *Expert Opin. Drug Discovery*, **2015**, *10*(5), 449—461
[66] Kumari R., Kumar R., Consortium O. S. D. D., Lynn A., *J. Chem. Inf. Model.*, **2014**, *54*(7), 1951—1962
[67] Paissoni C., Spiliotopoulos D., Musco G., Spitaleri A., *Comput. Phys. Commun.*, **2014**, *185*(11), 2920—2929
[68] Xie C. M., Lu Y. Y., An L. J., Wang Z. H., Wang J., Li M. L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2025**, *46*(12), 20250247(谢冲墨, 卢宇源, 安立佳, 王振华, 王健, 李明伦. 高等学校化学学报, **2025**, *46*(12), 20250247)
[69] Bai R., Li S. W., Chen Q., Sun Z. Y., Xu W. S., *Chem. J. Chinese Universities*, **2024**, *45*(6), 20240013(白蓉, 李尚伟, 陈全, 孙昭艳, 徐文生. 高等学校化学学报, **2024**, *45*(6), 20240013)
[70] Guo X. H., Zhou Y. Z., Xie D. Q., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, *41*(5), 1076—1083
[71] Sun H. Y. J., Li X. H., Zeng X. L., Liu J., Rakmatullin A., Lou C. J., Tang M. X., Fernández-Carrión A. J., Kuang X. J., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, *41*(2), 296—304
[72] Zhang J. J., Lü L. N., Zhu H. R., Zhang Y., Xu X. D., Long L. X., Fu W., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2024**, *40*(6), 1201—1211
[73] Nagae M., Yamaguchi Y., *Int. J. Mol. Sci.*, **2014**, *15*(3), 3768—3783
[74] Baker E., *International Tables for Crystallography Volume F: Crystallography of Biological Macromolecules*, Wiley, Hoboken, **2006**, 546—552

(Ed.: W, K, M)