

拉伸分子动力学模拟配体-受体相互作用*

许叶春 沈建华** 罗小民 沈旭 陈凯先 蒋华良**

(中国科学院上海生命科学研究院上海药物研究所 新药研究国家重点实验室 药物发现与设计中心, 上海 201203)

摘要 配体和受体之间的相互作用研究有助于阐明配体的作用机理, 为合理药物设计提供线索. 新发展的拉伸分子动力学模拟使原来在微秒至秒时间范围内发生的生物化学过程可以在纳秒尺度内进行模拟, 从而动态再现目前实验所无法提供的配体与受体的结合或解离过程. 文中通过详细介绍拉伸分子动力学方法对石杉碱甲与乙酰胆碱酯酶结合和解离过程以及 HIV-1 逆转录酶和其非核苷酸类似物抑制剂 α -APA 解离过程的成功模拟, 综述拉伸分子动力学模拟在研究配体和受体相互作用中的应用.

关键词 分子动力学 拉伸分子动力学 配体和受体相互作用研究

分子识别和特定的配体-受体相互作用是许多生理过程的关键步骤, 如酶的催化、细胞器组装、能量转换、信号传导、控制功能的分化和遗传物质的复制、表达和存贮等都需要通过配体和受体的非共价键结合来诱发其功能反应的实现; 同时, 蛋白质和小分子之间的相互作用为许多药物的作用机理提供了重要信息. 因此, 正确理解蛋白质和小分子之间的相互作用有助于合理地进行药物设计^[1,2].

常规的实验方法采用测定反应平衡常数来检测配体和蛋白质之间结合强度. 原子力显微镜的发展使其可以对单分子进行操作, 可以将蛋白质和配体复合物中的配体拉离蛋白质的结合位点, 为理解配体解离过程提供信息^[3,4]. 拉伸分子动力学模拟

(steered molecular dynamics, SMD)正是受原子力显微镜实验的后发而发展起来的. SMD 在模拟过程中施加一类似于原子力显微镜力探针的外力(或简谐势)于配体, 使其加速与蛋白质的解离, 并且记录这一动态解离过程中力随时间变化的曲线. 通过对力曲线的分析, 结合模拟所得到的结构和能量信息, 可以定性地分析蛋白质与配体间相互作用、配体诱导蛋白质的构象变化、配体最优结合路径以及配体对蛋白质选择性结合等重要信息; 同时, 通过多次 SMD 模拟, 也可以定量计算出配体-受体的结合能^[2].

本文主要通过我们自己的例子介绍拉伸分子动力学原理和方法及其在模拟配体-受体识别和解离过程中的应用.

2003-10-27 收稿, 2004-03-29 收修改稿

* 国家自然科学基金(20102007, 29725203 和 20072042)、国家基础研究重点规划基金(2002CB512802)、国家“八六三”高科技项目(2002AA233011, 2002AA233061, 2001AA235051 和 2001AA235041)、上海市科技发展基金和中国科学院新药研究和开发重大项目基金资助

** 联系人, E-mail: jhshen@mail.shcnc.ac.cn 和 hljiang@mail.shcnc.ac.cn

1 分子动力学

拉伸分子动力学从分子动力学演化而来, 在介绍拉伸分子动力学之前, 我们首先介绍分子动力学的概念、分子动力学的发展以及分子动力学在生命科学研究中的作用.

1.1 分子动力学原理

分子动力学是在分子力学的基础上描述分子运动时间演化的方法, 属于经典力学的范畴, 体系内的所有粒子运动遵循牛顿第二运动方程. 假设一含 N 个原子的体系内的任一原子 i (或 j) 的质量为 m_i , 电荷为 q_i , 所在位置为 r_i , 则体系中原子所受力 F_i 为

$$F_i = -\nabla U(R), \quad (1)$$

其中 $U(R)$ 为整个体系的势能函数 (简称势函数), 可分解为键伸缩振动势 U_{bond} 、键弯曲振动势 U_{angle} 、二面角扭曲势 U_{dihedral} 和非键相互作用势 U_{nonbond} 等之和

$$U(R) = U_{\text{bond}} + U_{\text{angle}} + U_{\text{dihedral}} + U_{\text{nonbond}}, \quad (2)$$

$$U_{\text{bond}} = \sum_{\text{bonds}} k_i^{\text{bond}} (r_i - r_0)^2, \quad (3)$$

$$U_{\text{angle}} = \sum_{\text{angles}} k_i^{\text{angle}} (q_i - q_0)^2, \quad (4)$$

$$U_{\text{dihedral}} = \sum_{\text{dihedrals}} k_i^{\text{dihe}} [1 + \cos(n_i f_i + d_i)], \quad (5)$$

$$U_{\text{nonbond}} = \sum_i \sum_{j \neq i} 4e_{ij} \left[\left(\frac{s_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{s_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{q_i q_j}{er_{ij}}, \quad (6)$$

其中 U_{bond} 用谐振势函数和 Morse 势函数模拟; U_{angle} 也可以用谐振势函数表征; U_{dihedral} 可以用 Fourier 级数模拟, 其中 f_i 为二面角, d_i 为相位差, n_i 为势垒周期; 非键相互作用可分解为范德华相互作用 (可用 Lennard-Jones 公式表示) 和静电相互作用 (可用库仑相互势表示) 等. 模拟之初, 体系中原子位置 r_i 由蛋白质或其他生物大分子晶体结构中坐标给出, 根据原子位置可计算体系的势能, 而原子所受的力又可以通过方程 (1) 计算得到. 原子的初始速度依赖体系的初始温度, 根据波尔兹曼分布赋值. 运用牛顿第一运动方程可以计算得到原子下一时刻的速度和位置:

$$n_i(t + \Delta t) = n_i(t) \Delta t + \frac{\Delta t}{m_i} F_i(t), \quad (7)$$

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + n_i(t) \Delta t + \frac{1}{2} \frac{\Delta t^2}{m_i} F_i(t), \quad (8)$$

不断重复这一过程从而得到体系随时间变化的轨迹. 因此, 分子动力学模拟可以提供单个粒子随时间变化的最基本的细节, 他们可以用来描述关于模型体系性质的特定问题, 而且经常比实验容易实现, 如配体采用什么途径进入和离开蛋白质受体. 分子动力学模拟的另一特征是, 虽然在模拟中所用的势能函数是近似的, 但它完全可以控制, 通过取消或改变某一特定参数从而测定该参数在描述给定体系性质中的作用, 如分子动力学对体系自由能差值的计算^[5,6].

1.2 生物大分子的分子动力学模拟

现代分子动力学模拟开始于 20 世纪 50 年代后期, 当时 Alder 和 Wainwright 提出了硬球模型^[7]. 1964 年, Rahman 采用第一个合理的势函数 (Lennard-Jones) 模拟了液态氩的结构与性质, 这一研究结果代表着分子动力学模拟向前跨出了重要的一步^[8]. 1971 年报道了第一个有实际意义的分子动力学模拟, Rahman 和 Stillinger 模拟了液态水的动力学行为^[9]. 第一篇关于生物大分子动力学模拟的论文发表于 1977 年, McCammon 等人运用分子动力学方法研究牛胰胰岛素抑制剂 (Bovine Pancreatic Tyrosin Inhibitor, BPTI) 的动力学性质^[10]. 尽管这一模拟在真空中进行, 采用的分子势函数也比较粗糙, 持续的时间只有 9.2 皮秒 (ps), 但这一模拟却极大地改变了人们对蛋白质结构的认识, 即蛋白质并不是完全刚性的分子, 其内部运动所导致的构象变化在实现蛋白质功能中起关键作用^[11]. 随后, 分子动力学模拟广泛应用于生物大分子的结构与功能关系研究. 分子动力学模拟最基本的功能是进行空间构象取样, 因而经常用于生物大分子结构实验测定数据的优化, 为核磁共振、X 射线衍射和电子显微镜结构测定提供有用的信息. 分子动力学模拟的第二个应用是可以描述体系的平衡状态, 如检测蛋白质结构的稳定性、计算体系的自由能差值等. 分子动力学模拟的第三个应用是提供体系随时间演化的动态过程, 如蛋白质构象的变化、蛋白质折叠和去折叠过程、受体-配体之间的分子识别机制和生物体系中的离子输运过程等.

从第一个蛋白质的分子动力学模拟至今,生物大分子的动力学模拟经历了爆炸式的发展^[11],计算机技术的发展和模拟算法程序的改进使得动力学模拟的时间尺度不断延伸,模拟体系也越来越大。最初关于BPTI的模拟不超过10 ps^[10],而现在分子动力学可以模拟上百纳秒甚至微秒时间范围内发生的生物现象,如对蛋白质折叠途径的近1微秒的常规动力学模拟^[12]。而模拟时间的另一个方向,模拟的高分辨率(时间积分步长为fs)使其可以研究只有当时分辨率达到fs时才可以真正研究的化学反应^[13,14],例如通过对一跨膜水通道的多个10 ns进程的模拟,观察到了水分子通过该通道的真正时间^[15]。另一方面模拟的对象越来越大($10^4 \sim 10^6$ 原子代替原来的500个原子),而且模拟的目标正从研究分子和超分子体系向细胞水平发展,目前已经开始用分子动力学方法模拟蛋白质聚合物等复杂生物体系,如对ATP合酶构象变化进行分子动力学模拟^[16]。

然而尽管计算机技术的发展使得动力学模拟的时间尺寸得到延伸,但是目前计算动力学模拟的主要挑战仍然来自时间尺度的巨大差异,例如我们所感兴趣蛋白质的折叠和配体受体相互作用的时间范围从微秒到秒,而我们现在进行的模拟时间主要在纳秒范围。为了在两者之间架起桥梁,除了从根本上加速计算机技术的发展之外,发展快速算法和建立新的模拟方法也十分必要。拉伸分子动力学^[2,17,18]、靶向分子动力学(targeted molecular dynamics)^[19,20]、主成份分子动力学(essential dynamics)^[21]和构象涨落分子动力学(conformational flooding)^[22]等方法,通过在模拟中引入外力或简谐势和减少蛋白质构象空间自由度等策略,使得模拟的时间范围比常规动力学宽,因而可以模拟配体和受体结合、蛋白质的异构效应等生物现象。在下文中,将主要结合自己的工作介绍拉伸分子动力学模拟方法的建立和其应用。

2 拉伸分子动力学模拟方法简介

拉伸分子动力学方法模拟原子力显微镜单分子操作过程,在分子动力学模拟过程中沿着给定方向施加一外力(或简谐势)于配体或蛋白质某一部分,加速配体解离(或结合)或蛋白质构象变化的进程。外力

的施加可以通过简谐势(相当于一简谐弹簧)、表面张力和扭矩三种方式^[2],下面主要以使用最多的通过简谐势施加外力的模型来介绍拉伸分子动力学模拟的原理。

如图1所示,一简谐势(弹簧)作用于配体某一点(质心或某一个原子),然后这一点沿着选定的方向移动,使配体离开与蛋白结合的初始位置,沿着其解离途径运动,与蛋白质产生新的相互作用,此时配体所受到外力以及配体与蛋白质的结合势能函数分别表达为

$$F(x,t) = K(x(t_0) - x(t)), \quad (9)$$

$$\frac{dU}{dx} = F(x,t) + \sigma N(t) - \gamma \dot{x}, \quad (10)$$

其中 K 为弹性系数; $\sigma N(t)$ 是随机波动项,其平均值为0, σ 为振幅;摩擦项是速度 $\dot{x}$ 的函数,而摩擦系数 γ 本身也是速度的非线性函数。由于摩擦项非常难以精确计算,通常在速度合理的情况下忽略不计。配体在结合途径中的热波动(原子力显微镜实验中其悬臂所允许的热波动在0.3 nm之内)和外力大小与弹性系数的关系分别为 $\delta x \sim (K_B T/K)^{1/2}$ 和 $\delta F \sim (K k_B T)^{1/2}$ 。因此,弹性系数大则力的起伏大而配体的热波动小,弹性系

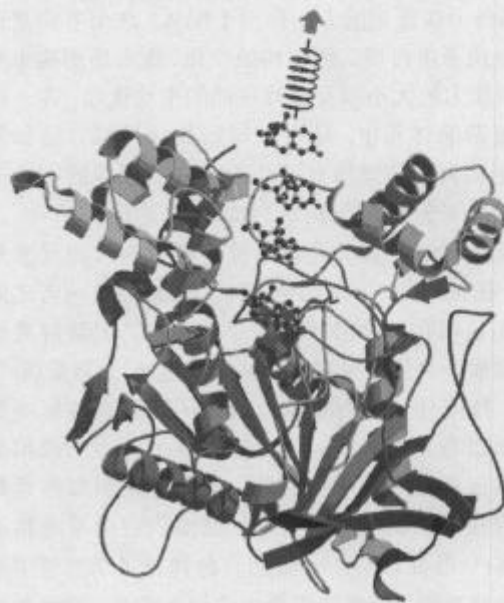


图1 拉伸分子动力学模型

数小则正好相反. 根据弹性系数的大小, 作用于配体的简谐弹簧有软弹簧和硬弹簧之分, 针对不同的模拟要求可以选择不同的弹簧.

在拉伸分子动力学模拟中, 通常采用两种外力模式^[2]: (1) 等外力模式: 在这种情况下, 配体解离速度是变化的. 在解离受阻区域移动速度慢, 而在解离阻力小的区域移动速度快; (2) 等速度模式: 在这种情况下, 为了保证移动速度大小不变, 所施加的外力大小在变化. 在解离受阻区域所需外力大, 在解离阻力小的区域所需外力小. 不同外力模式选择分析的方法也不一样, 前者通过速度随解离时间的变化来体现解离过程中的动态变化, 后者通过力随时间的变化来体现解离过程中的动态变化. 后一种模式被广泛地采用.

拉伸分子动力学模拟需要选择合适的运动途径, 即定义外力作用方向. 对于一般的配体和受体结合, 只要定义一直线就可以, 如模拟生物素(维生素 H)从抗生物素蛋白质的解离过程^[17]和 Titin 免疫球蛋白结构域的去折叠的模拟^[23]. 但是其他一些生物分子体系中配体在弯曲的结合口袋底部, 如噬菌调理素(bacteriorhodopsin)^[24]和核激素受体^[25], 外力的方向需不断变化, 以避免严重破坏配体周围的蛋白质结构. 当外力按选定的方向作用于配体, 这个方向是否合理取决于蛋白质二级结构的变化、蛋白质的构象变化、所加力的大小以及配体移动的平均速度. 在一些比较复杂的体系中, 还可以借助其他模拟方法如靶向分子动力学和随机分子动力学以及相应的实验方法如残基突变等帮助寻找结合或解离途径.

此外, 由于原子力显微镜实验中的时间尺度是毫秒, 在拉伸分子动力学中则往往是纳秒, 两者之间的差距说明在拉伸分子动力学模拟时, 配体解离的速度比原子力显微镜实验中快了将近 6 个数量级^[26]. 因此, 拉伸分子动力学模拟速度的选择直接影响整个模拟过程是否合理可靠. 拉伸分子动力学模拟配体解离过程是一非平衡过程, 解离速度和摩擦系数之间存在复杂的非线性关系, 摩擦效应项很难精确地计算(一般都忽略). 一般而言拉伸分子动力学中速度的选择越慢, 摩擦效应带来的偏离越少, 得到的结果越接近真实的情况. 因此, 模拟的速度越小整个模拟过程越合理. 从方程(10)中可以看出, 在定量讨论

受体与配体之间的结合能时, 速度的选择尤其重要. 在具体模拟中往往通过一系列的速度测试, 找到速度和所需最大力之间的变化曲线的拐点, 该点以下的速度为可接受的合理速度^[17,27]. 但是一般所关注的往往是配体和蛋白质结合或解离整个动态过程中它们之间的相互作用方式、蛋白质的构象变化等结构信息, 此时速度的选择相对宽松, 因为从已有的拉伸分子动力学模拟的结果中发现, 定性讨论解离的动态过程的速度对解离模式影响不是很大(当然是在一定的速度范围之内)^[27,28]. 因此, 根据不同的需要选择不同的速度, 在计算资源允许的前提下, 尽可能选择小的速度进行模拟.

拉伸分子动力学方法和应用主要由 Schulten 和 Grubmüller 研究小组发展的. 可以进行拉伸分子动力学模拟的动力学程序主要有 NAMD(<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>), EGO(<http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071/ego.html>)和 GROMACS(<http://www.gromacs.org/>)等. 此外由 Paci 等发展的 CHARMM 程序也曾用于蛋白质去折叠的拉伸分子动力学模拟^[29,30].

3 拉伸分子动力学模拟配体-蛋白质相互作用

3.1 生物素和抗生物素蛋白(biotin-avidin)复合物解离过程模拟

生物素和抗生物素蛋白复合物由于其亲合力特别高而被用于各种实验研究, 并对其结合自由能和结合焓进行了模拟计算^[31, 32]. 1994年, Florin等用原子力显微镜测出了生物素和抗生物蛋白质之间的黏合力, 约为 160 pN^[4]. 为了与原子力显微镜对应并提供解离过程的结构信息, 拉伸分子动力学模拟对生物素解离抗生物素蛋白质过程进行动态模拟. Grubmüller 和 Izrailev 分别对单个 streptavidin-biotin 复合物^[17]和 avidin-biotin 四聚体^[33]进行了拉伸分子动力学模拟. 在前者的模拟中采用一硬弹簧($K = 280 \text{ pN}/\text{\AA}$), 通过多个不同速度模拟过程外推得到的离解力与原子力显微镜中测得的力一致. 后者的模拟中则采用与

原子力显微镜中悬臂相似的弹性系数(小于120 pN/Å)即软弹簧进行模拟。两个模拟都提供了生物素经过多步解离抗生物素蛋白的作用机理, 每一步中都存在生物素和蛋白质以及水分子之间氢键的形成和断裂。最强的氢键形成于生物素和残基Tyr33, Ser16以及Thr35之间, 而生物素和残基Trp110形成的非极性相互作用对整个解离过程十分重要。这些结论与相应的实验事实吻合。生物素和抗生物素蛋白质解离过程的模拟是拉伸分子动力学第一次用于配体和受体结合或解离相互作用的研究, 模拟不但得到了与原子力显微镜实验测定一致的离解力, 而且提供了生物素的解离机理与实验吻合的重要残基在解离过程中的作用模式。研究结果表明拉伸分子动力学模拟是一种研究配体和蛋白质之间非共价键结合或解离的有效方法^[2]。

3.2 石杉碱甲与乙酰胆碱酯酶结合和解离

乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase)在中枢神经和外周神经系统中起着非常重要的作用, 它通过水解神经递质乙酰胆碱, 中断胆碱能神经节的兴奋传递, 而是由脑内乙酰胆碱水平变化而引起的如老年痴呆等疾病的药物作用靶标^[34,35]。我国中草药蛇足石杉中分离所得天然产物石杉碱甲(Huperzine A)是乙酰胆碱酯酶的可逆抑制剂, 具有选择性高、毒性低和药效时间长等特点, 是治疗老年痴呆症较为理想的候选药物^[36]。实验发现, 石杉碱甲结合乙酰胆碱酯酶的过程较快, 但解离乙酰胆碱酯酶所需时间却比其结合过程长的多。石杉碱甲这一快进慢出过程使得其在乙酰胆碱酯酶结合口袋停留时间较长, 所以它的药效时间长^[37]。然而目前实验仅能提供结果, 无法给出石杉碱甲如何进入乙酰胆碱酯酶狭长的结合口袋, 最后又如何从乙酰胆碱酯酶中解离的过程, 因而无法从根本上解释为什么石杉碱甲药效时间长的特性。而拉伸分子动力学模拟方法则正好可以弥补实验上的不足, 提供石杉碱甲的结合和解离动态过程^[38]。

我们采用 EGO 程序(<http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071/ego.html>)模拟石杉碱甲与乙酰胆碱

酯酶的结合和解离过程。模拟中蛋白质力场采用 CHARMM 力场^[39], 石杉碱甲力场的结构参数由 XPLO2D 程序(<http://xray.bmc.uu.se/usf/factory5.html>)产生, 原子电荷由 NWChem 程序(<http://www.emsl.pnl.gov/docs/nwchem/nwchem.html>)中的量子化学从头计算模块计算并拟合得到。模拟的模型如图 1 所示, 以石杉碱甲和乙酰胆碱酯酶的晶体结构^[40]为基础, 残缺的残基和原子在 Sybyl 程序(Tripos Inc. St. Louis, MO)中重建, 之后将复合物嵌入一足够大的水球中并加入相应的 Na⁺和 Cl⁻离子使整个体系保持电荷中性。体系建立之后进行优化并升温至 300 K, 逐渐放开蛋白质和小分子的限制后进行动力学平衡模拟。整个体系在 1 ns 之后达到平衡, 然后以 0.002 nm/ps 的速度将石杉碱甲沿着乙酰胆碱酯酶狭长的主通道拉离其结合位点。在拉伸模拟石杉碱甲进入乙酰胆碱酯酶的过程中, 先将石杉碱甲沿着拉伸矢量平移至结合口袋上方, 然后以同样的速度 0.002 nm/ps, 将石杉碱甲沿着乙酰胆碱酯酶的主通道拉回结合部位。整个模拟的详细过程参考文献^[38]。

模拟记录了石杉碱甲解离和结合过程中所需力的大小(图 2(a)和(e)), 解离过程所需力远远大于结合过程中的力, 这表明石杉碱甲进入乙酰胆碱酯酶结合部位比离开容易, 这与石杉碱甲与乙酰胆碱酯酶结合过程比解离过程快得多的实验事实一致。分析与力对应的石杉碱甲和乙酰胆碱酯酶残基之间形成的直接氢键、疏水相互作用或通过一水分子形成水桥的分布(图 2), 发现在解离或结合过程中各种相互作用交替出现, 直接氢键对力的贡献最大。而导致解离和结合过程中力差异的关键因素是: 乙酰胆碱酯酶狭长口袋中由残基 Tyr121 和 Phe330 组成的卡口阻碍石杉碱甲解离, 但是在结合过程中卡口对石杉碱甲的阻碍并不大。虽然解离和结合过程都是在卡口打开状态下进行(残基 Phe330 的苯环偏离主通道方向, 如图 3 所示), 但是由三环桥联而成的石杉碱甲刚性很大, 加上乙酰胆碱酯酶内口袋(即结合口袋)空间狭小, 无法使石杉碱甲采取最优的空间取向通过卡口, 所以当石杉碱甲解离时与卡口残基 Tyr121 的芳香侧

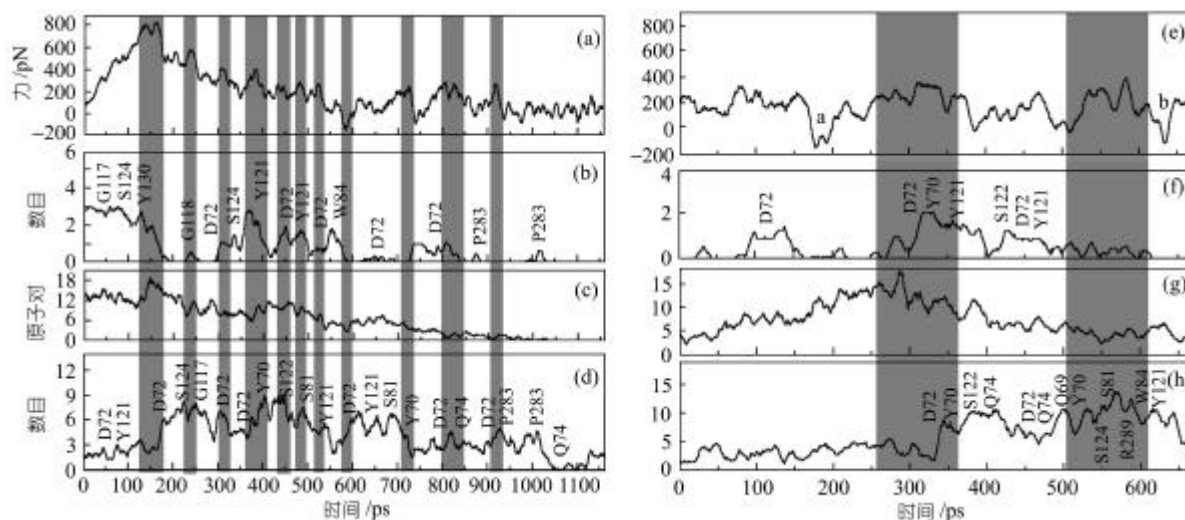


图 2

(a)~(d) 分别对应于石杉碱甲从乙酰胆碱酯酶解离过程中随时间变化的力、石杉碱甲与乙酰胆碱酯酶之间的直接氢键、疏水相互作用原子对和通过一水分子相连的水桥; (e)~(h) 则分别对应于结合过程中随时间变化的力、直接氢键, 疏水相互作用原子对和水桥

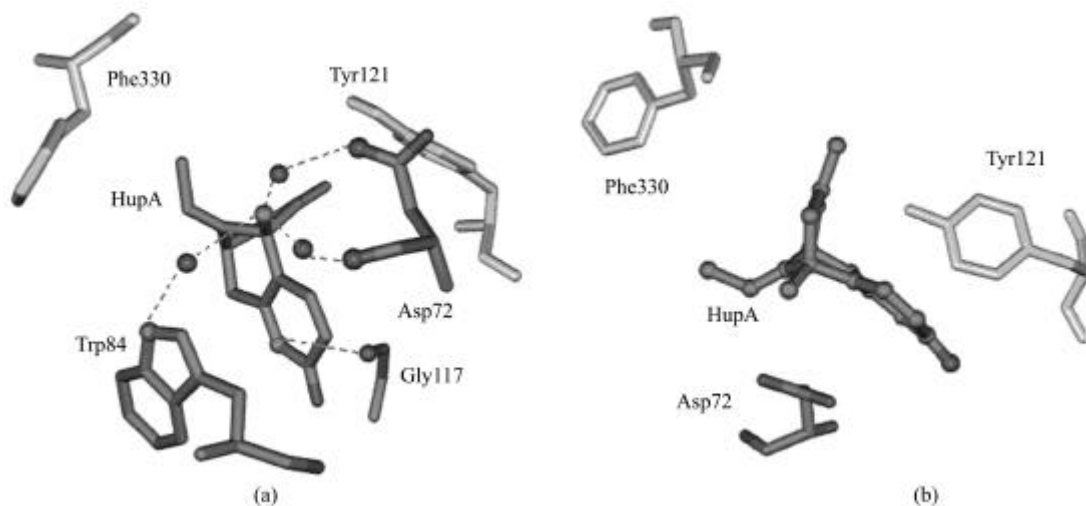


图 3

(a) 解离过程中石杉碱甲与卡口及周围残基的相互作用; (b) 结合过程中石杉碱甲和卡口空间位置的俯视图(由乙酰胆碱酯酶主通道外向里俯视)

链摩擦较大(图 3(a)), 导致了解离过程中力达到 800 pN 左右(图 2(a)). 而在结合过程中则不同, 如图 3(b) 所示, 由于乙酰胆碱酯酶外口袋空间较大使石杉碱甲可以采取与卡口摩擦最小的空间取向通过卡口.

SMD 模拟不但解释了石杉碱甲快进慢出乙酰胆碱酯酶结合部位的实验现象, 而且提供了大量的结构信息. 分析石杉碱甲与乙酰胆碱酯酶的相互作用, 发现残基可以与石杉碱甲形成直接氢键或通过水分子形

成水桥; 沿着主通道分布的大量芳香性残基主要与石杉碱甲形成疏水相互作用. 在众多残基中, Asp72 无论在石杉碱甲的结合还是解离过程中, 一直与石杉碱甲保持相互作用(或通过水桥或直接形成盐桥), 如同一夹子将石杉碱甲导入或导出乙酰胆碱酯酶活性口袋(图 4(a)), 从而解释了为什么突变该残基将导致石杉碱甲与乙酰胆碱酯酶亲和力大大减小. 此外, 在石杉碱甲和乙酰胆碱酯酶复合物晶体结构中发现, Gly117 和

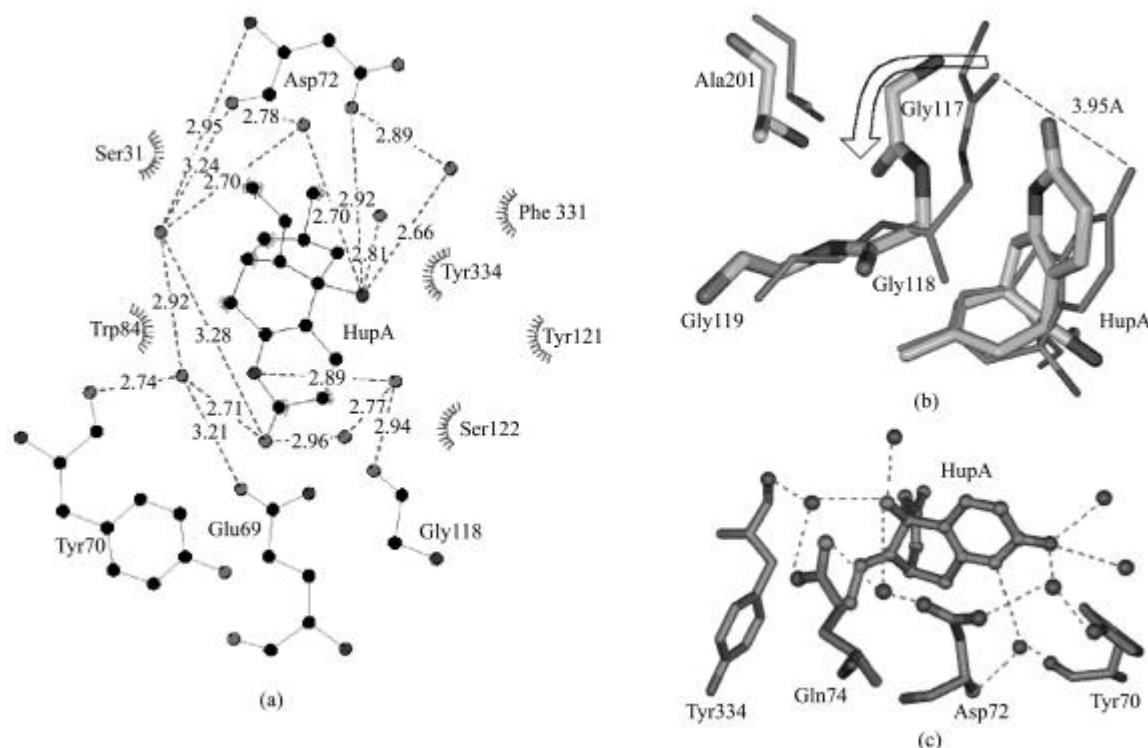


图 4

(a) 解离过程残基Asp72以及其他残基与石杉碱甲相互作用, 虚线表示氢键, 绒状线表示疏水作用; (b) 残基Gly117和Gly118之间的酰胺键的不同取向; (c) 结合过程中多个残基通过水分子形成氢键网络捕获石杉碱甲

Gly118之间的酰胺键取向与其他抑制剂复合物晶体结构正好相反(图4(b)), 认为石杉碱甲吡啶酮氧原子与酰胺键中氧原子的排斥作用导致酰胺键的翻转。SMD模拟发现酰胺键的两种取向都存在, 石杉碱甲的结合或解离可以导致取向的变化, 但是更多的结构表明酰胺键的翻转是乙酰胆碱酯酶的本质行为。最后, 对水分子在石杉碱甲解离和结合过程中所起作用进行了详细分析。水分子可以起到残基与石杉碱甲之间的水桥作用(图2(d)和(h)); 可以与残基形成氢键网络诱导石杉碱甲进入乙酰胆碱酯酶(图4(c)); 通过与石杉碱甲的铵离子形成氢键削弱其与乙酰胆碱酯酶中芳香性残基之间的阳离子- π 相互作用。我们分别对真空和水溶液中石杉碱甲解离过程进行了SMD模拟, 发现真空中拉离石杉碱甲的力和所需时间都远远大于水溶液中所需的力和时间, 表明水分子在结合和解离过程中起润滑作用。

通过石杉碱甲与乙酰胆碱酯酶的结合和解离过程

的拉伸分子动力学模拟, 得到了与实验一致的结论, 获得了导致石杉碱甲快进慢出乙酰胆碱酯酶的因素, 分析了乙酰胆碱酯酶卡口和结合口袋中的重要残基和水分子在整个结合解离过程中的作用, 为石杉碱甲抑制乙酰胆碱酯酶的机理研究提供了详细信息。这一模拟进一步验证了拉伸分子动力学在研究药物和受体之相互作用时的可靠性和有效性。

3.3 HIV-1 逆转录酶和非核苷酸类抑制剂a-APA相互作用模拟

逆转录酶是HIV-1病毒的三个重要功能蛋白之一, 负责将病毒单链RNA转录为可以插入宿主基因组的前体病毒双链DNA。由于HIV-1逆转录酶(HIV-1 RT)在真核生物中没有同源蛋白, 以HIV-1 RT为靶标的药物研究成为抗艾滋病药物研究的重点^[28,41,42]。逆转录酶有两类抑制剂: 核苷酸类似物(nucleoside RT inhibitor, NRTI)和非核苷酸类似物抑制剂(non-

nucleoside RT inhibitor, NNRTI). 大多数 NNRTI 类抑制剂的 IC_{50} 值在 nM 级别, 而且 NNRTI 对 HIV-1 RT 选择性非常高, 对 HIV-2 基本没有抑制活性, 同时发现 NNRTI 类化合物具有结构多样性^[42]. 因此, NNRTI 类药物的设计正在成为抗艾滋病药物研究的重点, 已经有三个 NNRTI 经美国食品及药物管理局(FDA)批准上市^[43~48]. 但是 NNRTI 的抑制机理目前不十分确定, 而且作为抗 HIV 药物, NNRTI 面临着严重的抗药性问题, 要进一步改进和发现新的 NNRTI 类药物, 必须了解 NNRTI 类药物的抑制机理和具体的作用模式^[28]. 我们通过对 NNRTI 抑制剂 α -APA 从 HIV-1 RT 结合口袋中解离的拉伸分子动力学模拟, 探测了 NNRTI 和结合口袋的动态相互作用, 了解 NNRTI 可能的结合或解离途径, 探讨 NNRTI 可能的结合模式以及柔性口袋的形成; 研究抗药性相关残基和 NNRTI 相互作用的动态模式, 讨论他们在 NNRTI 抑制 HIV-1 RT 中所起的作用及与抗药性的关系; 比较 NNRTI 结合态和 NNRTI 解离后 HIV-1 RT 的构象变化, 探讨 NNRTI 的抑制机理^[28].

模拟模型如图 5(a)所示, 采用的程序和步骤与上述石杉碱甲模拟相同(详细过程参见文献^[28]). 模拟首先对不同拉伸速度对力分布的影响进行测试, 认为拉伸速度对定性的解离模式没有本质的影响. 最后以

0.002 nm/ps 的速度将抑制剂 α -APA 从 HIV-1 RT 结合口袋中拉出, 拉离所需力的分布如图 6(a)所示. 解离过程中 α -APA 和 HIV-1 RT 以及水分子形成的氢键、水桥和疏水相互作用如图 6(b)~(d)所示, 表明 α -APA 的解离过程分阶段进行. 第一阶段为 900~1150 ps, α -APA 从口袋松动并向入口移动, 到达由残基 Val179 和 Leu100 组成的卡口. 这阶段中疏水作用是主要的相互作用, 残基 Tyr181 与 α -APA 通过芳香环形成疏水相互作用, 残基 Tyr188 却与 α -APA 形成氢键相互作用, 两个芳香性残基侧链随着 α -APA 往外解离而占据疏水结合口袋. 这两个残基与 α -APA 之间形成的相互作用以及解离过程中两个残基侧链构象的变化部分解释了它们的抗药性. 第二阶段为 1150~1300 ps, α -APA 克服卡口的立体位阻并通过卡口. 由于 α -APA 体积较大而卡口所允许通过尺寸并不大, 但是这一阶段所需的力并不大. 结构分析和量子化学计算发现水分子形成的氢键网络能够降低 α -APA 构象变化的能垒, 从而使 α -APA 采取较优空间取向通过狭窄的卡口. 第三阶段为 1300~1600 ps, 这时配体解离的主要障碍都已经克服, α -APA 进一步离开口袋向溶剂中移动.

在拉伸分子动力学对抑制剂动态结合模式研究的基础上进一步模拟了抑制剂解离对酶的动态性质的影响, 并和抑制剂结合时酶的动态性质进行比较.

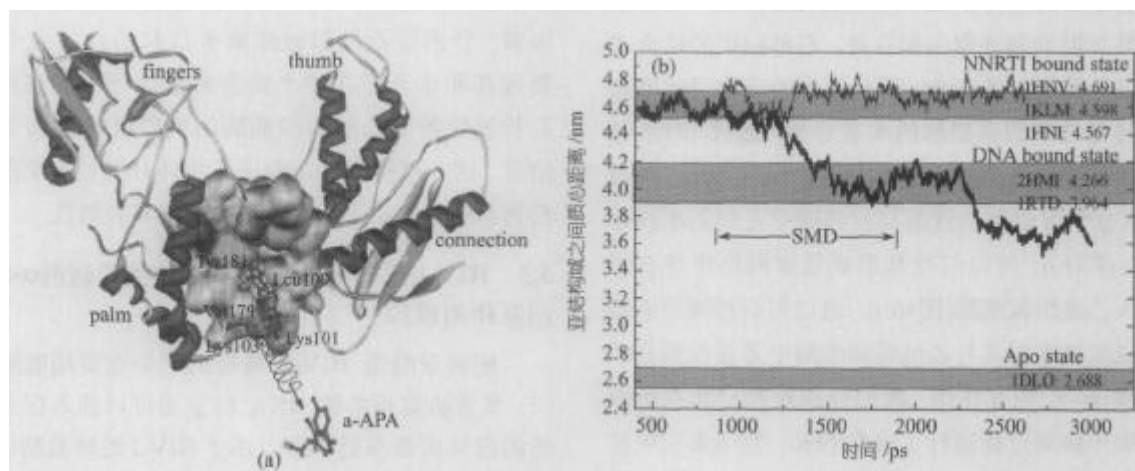


图 5

(a) α -APA 从 HIV-1 RT 中解离的拉伸分子动力学模型; (b) 抑制剂 α -APA 结合(细线)和解离后(粗线)后 HIV-1 RT 中 fingers 亚结构域与 thumb 亚结构域之间质心距离(DMCD)随时间的变化

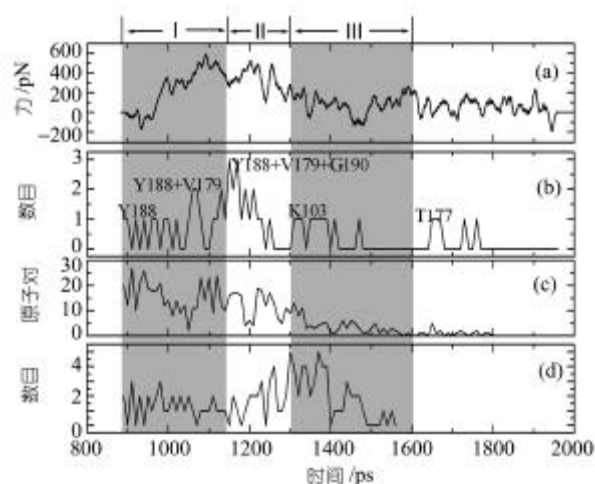


图6

α -APA 从 HIV-1 RT 解离过程中所需的力(a), α -APA 和 HIV-1 RT 之间形成的氢键(b), 疏水相互作用原子对(c)和水桥(d)的分布

图 5(b)是在 α -APA 和 HIV-1 RT 复合物体系中两者的比较. 我们用 fingers 和 thumb 两个结构域质心间的距离(DMCD)表示酶结构域间打开的程度. 从图 5(b)中可以看出, NNRTI 的结合使得 DMCD 的值停留在 ~ 4.7 nm 左右, 这个数值和所有 HIV-1 RT/NNRTI 复合物的晶体结构中的 DMCD 值相当, 总体上都比 HIV-1 RT/dsDNA/dNTP 复合物晶体结构的 DMCD 值要大; 因此 NNRTI 的结合使得 HIV-1 RT 结构域打开程度变大. 但是, 随着 NNRTI 的解离, DMCD 数值显著下降约 1 nm, 回到 HIV-1 RT/dsDNA/dNTP 复合物的晶体结构的 DMCD 值的水平. 这说明酶在没有 NNRTI 的结合下, 具有来回闭合的趋势. 所以, NNRTI 的结合限制了 HIV-1 逆转录酶的结构柔性, 从而抑制 HIV-1 RT 的转录活性. 因此, 我们的 SMD 模拟解释了 NNRTI 抑制 HIV-1 RT 的机理.

3.4 其他体系的拉伸分子动力学模拟

除了上述详细介绍的例子之外, 拉伸分子动力学还广泛用于其他配体和受体结合解离过程以及蛋白质或高分子聚合物的弹性性质研究. Grubmüller 等模拟抗体和抗原之间的解离过程, 发现口袋的高度柔性有助于抗原脱离抗体, 熵变对抗原抗体结合的贡献较大从而解释突变非结合口袋区域残基对结合能的影响较大^[27,49]. Schulten 等使用拉伸分子动力学模拟识别了

视黄醛(retinal)与噬菌调理素(bacteriorhodopsin)的结合途径^[24]、荷尔蒙与其核受体结合和解离的最优途径^[25], 提供了磷酸氢根离子 (HPO_4^{2-})从肌动蛋白“后门”解离的机理^[50,51], 表明拉伸分子动力学模拟可以识别或检验配体结合或解离受体的最佳路径. 此外, 他们还采用拉伸分子动力学模拟了肌肉蛋白 Titin 中单个结构域如何在外力作用下去折叠而伸展和折叠而收缩, 模拟得到的伸展力的分布与实验吻合, 并解释实验测得分两步去折叠主要是由于两组 β 片之间氢键的断裂而引起^[23,52~56]. 拉伸分子动力学模拟还可以用扭矩代替简谐势作用于蛋白质的某一部分, 使其在纳秒时间尺度内旋转一定角度, 使蛋白质构象产生巨大变化, 分析构象变化过程提供相应的分子机理^[57,58].

4 结论和展望

拉伸分子动力学是用来动态研究生物体系中的结合和解离过程以及其弹性性质的一种新方法. SMD 模拟可以揭示解离过程中分子相互作用的细节, 从而为结合机理提供了重要信息. 拉伸分子动力学虽然从原子力显微镜实验中得到启发而建立, 但是实验往往只能提供配体沿着某一特定方向运动力的方向, 而拉伸分子动力学不但给出结合或解离过程中力的大小, 更重要的是它提供蛋白质构象变化的详细结构信息并可以计算结合能. 与常规分子动力学相比, 拉伸分子动力学的优点在于把原来无法模拟的生物化学进程在纳秒时间尺度进行了模拟, 不但大大减少了计算时间, 而且使得动力学模拟在研究生物大分子领域中的应用更加广泛. 众多拉伸分子动力学模拟应用的例子表明, 拉伸分子动力学模拟为动态研究配体小分子和受体生物大分子的结合或解离过程以及蛋白质的力学性质提供一种有效可靠的方法. 当然, 任何一种方法都不可能是完美无缺, 拉伸分子动力学中拉伸速度与原子力显微镜实验相差甚远、模拟过程中外力方向固定等这些都需要进一步改进. 现已经有人尝试发展新的动力学模拟方法克服这些不足之处, 例如新发展的交互式动力学(interactive molecular dynamics, IMD)中, 通过分子图形的监测, 研究者可以在模拟中根据需要不断改变外力的方向、大小和作用点^[59]. 针对拉伸分子动力学中拉伸速度与原子力显微镜实验中相差甚远, 新

发展的拉伸 Langevin 动力学 (steered Langevin dynamics simulation) 采用简化残基的方法使得模拟的速度比拉伸分子动力学中慢几个数量级^[60~63].

参 考 文 献

- 1 Hermans J, Mann G, Wang L, et al. Simulation Studies of Protein-Ligand Interactions. In: Deuhard P, Hermans J, Leimkuhler B, et al. eds. Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas, volume 4 of Lecture Notes in Computational Science and Engineering. Berlin: Springer-Verlag, 1998. 129~148
- 2 Izrailev S, Stepaniants S, Isralewitz B, et al. Steered Molecular Dynamics. In: Deuhard P, Hermans J, Leimkuhler B, et al. eds. Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas, volume 4 of Lecture Notes in Computational Science and Engineering. Berlin: Springer-Verlag, 1998. 39~65
- 3 Binning G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, 56 (9): 930~933
- 4 Florin E L, Moy V T, Gaub H E. Adhesion force between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 1994, 264 (5157): 415~417
- 5 Simonson T, Archontis G, Karplus M. Free energy simulations come of age: protein-ligand recognition. *Acc Chem Res*, 2002, 35(6): 430~437
- 6 Aqvist J, Luzhkov V B, Brandsdal B O. Ligand binding affinities from MD simulations. *Acc Chem Res*, 2002, 35(6): 358~365
- 7 Alder B J, Wainwright T E. Studies in molecular dynamics. 1. General method. *J Chem Phys*, 1959, 31(2): 459~466
- 8 Rahman A. Correlations in motion of atoms in liquid argon. *Phys Rev*, 1964, 136 (2A): 405~411
- 9 Rahman A, Stillinger F H. Molecular dynamics study of liquid water. *J Chem Phys*, 1971, 55(7): 3336~3359
- 10 McCammon J A, Gelin B R, Karplus M. Dynamics of folded proteins. *Nature*, 1977, 267 (5612): 585~590
- 11 Karplus M, McCammon J A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(9): 646~652
- 12 Duan Y, Kollman P A. Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution. *Science*, 1998, 282 (5389): 740~744
- 13 Polanyi J, Zewail A H. Direct observation of the transition-state. *Acc Chem Res*, 1995, 28 (3): 119~132
- 14 Lim M, Jackson T A, Anfinsen P A. Binding of CO to myoglobin from a haem pocket docking site to form nearly linear Fe-C-O. *Science*, 1995, 269 (5226): 962~966
- 15 de Groot B L, Grubmuller H. Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 2001, 294(5550): 2353~2356
- 16 Dittrich M, Hayashi S, Schulten K. On the mechanism of ATP hydrolysis in F₁-ATPase. *Biophys J*, 2003, 85(4): 2253~2266
- 17 Grubmuller H, Heymann B, Tavan P. Ligand binding: molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotin rupture force. *Science*, 1996, 271 (5251): 997~999
- 18 Heymann B, Grubmuller H. Dynamic force spectroscopy of molecular adhesion bonds. *Phys Rev Lett*, 2000, 84 (26): 6126~6129
- 19 Engels M, Kruger P, Jacoby E, et al. Targeted molecular dynamics simulation of conformational change-application to the T-R transition in insulin. *Mol Simul*, 1993, 10 (2-6): 291~308
- 20 Schlitter J, Engels M, Kruger P. Targeted molecular dynamics: A new approach for searching pathways of conformational transitions. *J Mol Graph*, 1994, 12(2): 84~89
- 21 Amadei A, Linssen A, Berendsen H J C. Essential dynamics of proteins. *Proteins Struct Func Gen*, 1993, 17(4): 412~425
- 22 Grubmuller H. Predicting slow structural transitions in macromolecular systems: Conformational flooding. *Phys Rev E*, 1995, 52 (3): 2893~2906
- 23 Lu H, Isralewitz B, Krammer A, et al. Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation. *Biophys J*, 1998, 75 (2): 662~671
- 24 Isralewitz B, Izrailev S, Schulten K. Binding pathway of retinal to bacterio-opsin: A prediction by molecular dynamics simulations. *Biophys J*, 1997, 73(6): 2972~2979
- 25 Kosztin D, Izrailev S, Schulten K. Unbinding of retinoic acid from its receptor studied by steered molecular dynamics. *Biophys J*, 1999, 76(1): 188~197
- 26 Isralewitz B, Baudry J, Gullingsrud J, et al. Steered molecular dynamics investigations of protein function. *J Mol Graph Model*, 2001, 19(1): 13~25
- 27 Heymann B, Grubmuller H. AN02/DNP-hapten unbinding forces studied by molecular dynamics atomic force microscopy simulations. *Chem Phys Lett*, 1999, 303(1-2): 1~9
- 28 Shen L L, Shen J H, Luo X M, et al. Steered molecular dynamics simulation on the binding of NNRTI to HIV-1 RT. *Biophys J*, 2003, 84(6): 3547~3563
- 29 Paci E, Karplus M. Forced unfolding of fibronectin type 3 modules: An analysis by biased molecular dynamics simulations. *J Mol Biol*, 1999, 288(3): 441~459
- 30 Paci E, Karplus M. Unfolding proteins by external forces and temperature: the importance of topology and energetics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6521~6526
- 31 Swamy M J. Thermodynamic analysis of biotin binding to avidin. A high sensitivity titration calorimetric study. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, 36(1): 219~225
- 32 Miyamoto S, Kollman P A. Absolute and relative binding free energy calculations of the interaction of biotin and its analogs with streptavidin using molecular dynamics/free energy perturbation approaches. *Proteins Struct Func Gen*, 1993, 16(3): 226~245
- 33 Izrailev S, Stepaniants S, Balsara M, et al. Molecular dynamics

- study of unbinding of the avidin-biotin complex. *Biophys J*, 1997, 72(4): 1568~1581
- 34 Quinn D M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition state. *Chem Rev*, 1987, 87(5): 955~979
- 35 Sussman J L, Harel M, Frolov F, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from torpedo californica: A archetypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991, 253(5022): 872~879
- 36 Tang X C, Han Y F. Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from chinese herb. *CNS Drug Review*, 1999, 5(3): 281~300
- 37 Ashani Y, Peggins III J O, Doctor B P. Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A. *Biochem Biophys Res Comm*, 1992, 184(2): 7719~7726
- 38 Xu Y C, Shen J H, Luo X M, et al. How does Huperzine A enter and leave the binding gorge of acetylcholinesterase? steered molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(37): 11340~11349
- 39 Brooks B R, Bruccoleri R E, Olafson B D, et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comp Chem*, 1983, 4(2): 187~217
- 40 Raves M L, Harel M, Pang Y P, et al. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat Struct Biol*, 1997, 7(1): 57~63
- 41 De Clercq E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors(NNRTIs)for the treatment of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) infections:strategies to overcome drug resistance development. *Med Res Rev*, 1996, 16(2): 125~157
- 42 Campiani G, Ramunno A, Maga G, et al. Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase(RT) inhibitors:past, present, and future perspectives. *Curr Pharm Des*, 2002, 8(8): 615~657
- 43 De Clercq E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors(NNRTIs) in the thereapy of HIV-1 infection. *Antiviral Res*, 1998, 38(3): 153~179
- 44 De Clercq E. Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors(NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Farmaco*, 1999, 54(1-2): 26~45
- 45 De Clercq E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Curr Pharm Des*, 2001, 8(13): 1543~1572
- 46 De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1 (1): 13~25
- 47 Buckheit R W. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors:perspectives on novel therapeutic compounds and strategies for the treatment of HIV infection. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001, 10(8): 1423~1442
- 48 Gupta S P. Advances in QSAR studies of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Prog Drug Res*, 2002, 58: 223~264
- 49 Heymann B, Grubmuller H. Molecular dynamics force probe simulations of antibody/antigen unbinding: Entropic control and nonadditivity of unbinding forces. *Biophys J*, 2001, 81(3): 1295~1313
- 50 Wriggers W, Schulten K. Stability and dynamics of G-actin: Back door water diffusion and behavior of a subdomain 3/4 loop. *Biophys J*, 1997, 73(2): 624~639
- 51 Wriggers W, Schulten K. Investigating a back door mechanism of actin phosphate release by steered molecular dynamics. *Proteins Struct Func Gen*, 1999, 35 (2): 262~273
- 52 Marszalek P E, Lu H, Li H, et al. Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature*, 1999, 402(6757): 100~103
- 53 Lu H, Schulten K. Steered molecular dynamics simulations of force-induced protein domain unfolding. *Proteins Struct Func Gen*, 1999, 35(4): 453~463
- 54 Lu H, Schulten K. Steered molecular dynamics simulation of conformational changes of immunoglobulin domain I27 interpret atomic force microscopy observations. *Chem Phys*, 1999, 247(1): 141~153
- 55 Gao M, Lu H, Schulten K. Simulated refolding of stretched titin immunoglobulin domains. *Biophys J*, 2001, 81 (4): 2268~2277
- 56 Gao M, Wilmanns M, Schulten K. Steered molecular dynamics studies of titin I1 domain unfolding. *Biophys J*, 2002, 83(6): 3435~3445
- 57 Izrailev S, Crofts A R, Berry E A, et al. Steered molecular dynamics simulation of the Rieske subunit motion in the cytochrome bc1 complex. *Biophys J*, 1999, 77 (4): 1753~1768
- 58 Bockmann R A, Grubmuller H. Nanoseconds molecular dynamics simulaiton of primary mechanical energy transfer steps in F₁-ATP synthase. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(3): 198~202
- 59 Grayson P, Tajkhorshid E, Schulten K. Mechanisms of selectivity in channels and enzymes studied with interactive molecular dynamics. *Biophys J*, 2003, 85(1): 36~48
- 60 Klimov D K, Thirumalai D. Stretching single-domain proteins: phase diagram and kinetics of force-induced unfolding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(11): 6166~6170
- 61 Klimov D K, Thirumalai D. Native topology determines force-induced unfolding pathways in globular proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 7254~7259
- 62 Evans E, Ritchie K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 1997, 72(4): 1541~1555
- 63 Evans E, Ritchie K. Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains. *Biophys J*, 1999, 76(5): 2439 ~2447