

• 研究论文 •

HIV 蛋白酶抑制剂——利迪链菌素的分子对接研究

李金涛 李艳妮 元英进*

(天津大学化工学院制药工程系 天津 300072)

摘要 用分子对接的方法, 对利迪链菌素的抗 HIV 蛋白酶活性进行了研究. 为了更准确地反映利迪链菌素分子与酶蛋白结合的情况, 充分考虑受体活性部位的柔性, 采用了 FlexX(初步对接)和 Flexidock(精确对接)分两步将配体与受体进行对接. 在初步对接中, 设计了不同的受体活性部位来考察是否有结合水分子参与抑制剂与酶的结合. 对一种作用方式已知的非肽类 HIV 蛋白酶抑制剂 Aha006 进行的对接研究显示, 分子模拟的结果与实际情况吻合得较好, 证明了本文所采用的方法的可靠性. 利迪链菌素与蛋白酶活性部位的对接结果显示, 配体分子与受体之间的结合没有结合水分子的参与, 两者通过 5 对氢键作用结合成为稳定的复合物. 利迪链菌素占据结合腔, 覆盖了蛋白酶的活性三联体 Asp25-Thr26-Gly27, 从而起到抑制其生物活性的作用.

关键词 HIV-1 蛋白酶抑制剂; 利迪链菌素; 分子模拟; 分子对接

Study of Molecular Docking of an HIV-1 Protease Inhibitor—— Streptolydigin

LI, Jin-Tao LI, Yan-Ni YUAN, Ying-Jin*

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology,
Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract The HIV protease-inhibiting activity of streptolydigin was studied using docking methodology. To reflect the binding state of streptolydigin and enzyme receptor more exactly, the flexibility of the active site was taken into consideration. A two-step docking method involving FlexX (for rough docking) and Flexidock (for precise docking) was used. In rough docking, in order to find out whether there is a structural water molecule mediating the contacts of the ligands and the protease, two different active site models were designed. The two-step docking result was obtained for Aha006, a non-peptide HIV-1 protease inhibitor whose binding mode in the active site is already known. The docking result coincided with actual binding state of ligand and receptor, indicating that the docking method used was reliable. The binding result of streptolydigin and active site of HIV-1 protease exhibited that the ligand binds to the active site under the help of five hydrogen bonds and no water molecule participates in the binding. Streptolydigin molecule occupies the binding site and covers the active-site triad (Asp25-Thr26-Gly27), thus the biological activity of the protease is inhibited.

Keywords HIV-1 protease inhibitor; streptolydigin; molecular modeling; docking

HIV 蛋白酶(PR)在病毒颗粒的装配和成熟中起着关键的作用, 是抗 HIV 病毒药物的重要靶点. HIV 蛋白酶

抑制剂(Pis)通过阻断蛋白酶的功能, 使病毒生产出成熟的、没有感染性的后代, 从而起到抑制 HIV 病毒繁殖

* Email: yjyuan@tju.edu.cn

Received June 21, 2005; revised and accepted August 21, 2006.

国家杰出青年基金(No. 20425620)资助项目.

的作用^[1]. 从上世纪九十年代初发展至今, PIs 已经成为一类临床应用非常广泛的抗艾滋病(AIDS)药物, 目前已经有 6 个品种上市: 沙奎那韦(saquinavir, SQV), 利托那韦(ritonavir, RTV), 茚地那韦(indinavir, IDV), 奈非那韦(nelfinavir, NFV), 安普那韦(amprenavir, APV)及复方制剂 Kaletra(罗匹那韦+RTV)^[2]. 这些抑制剂均属肽类和拟肽类的抑制剂, 它们存在着水溶性差、生物利用度低等缺点. 另外, 抗 AIDS 药物的大规模临床应用, 也使病毒的耐药性问题不断凸现出来^[3]. 这些不利因素促使人们不断地探索具有新颖结构的药物和新的药物作用模式.

利迪链菌素(streptolydigin, Stl)是从利迪链霉菌(*Streptomyces lydigus*)的发酵产物中得到的一种抗生素. 自上世纪五十年代利迪链菌素被发现以来, 科学家对它的性质和生物活性进行了全面的探索, 发现它对核糖核酸聚合酶(RNA 聚合酶, RNAP)具有抑制作用^[4,5]. Steven 等^[6]用 X 射线衍射法得到利迪链菌素与 RNA 聚合酶复合物的晶体三维结构, 进一步确定了其发挥抑制作用的作用位点与作用方式, 把利迪链菌素的活性研究带入了一个新的阶段. 前人对于利迪链菌素的生物活性研究集中在其 RNA 聚合酶的抑制活性上, 而对其 HIV 蛋白酶的抑制活性则未曾做过报道. 本课题组在研究中发现^[7], 利迪链菌素对 HIV 蛋白酶同样具有一定程度的抑制作用, 半数抑制浓度(IC₅₀)为 39.8 μg/mL. 利迪链菌素的 HIV 蛋白酶抑制活性同样有着重要的研究价值, 对其作用机理进行更深入的探索, 很有可能促成一类具有崭新结构的 HIV PR 抑制剂的发现.

从结构上看, 利迪链菌素是非肽类分子, 属于 tetramic acid 家族(图 1). 由于目前还没有得到利迪链菌素/蛋白酶复合物的结构, 因此两者的作用方式尚不清楚. 为了阐明利迪链菌素的作用机理, 并进而推进这一类具有崭新结构的 HIV PR 抑制剂的研究, 本文利用分子对接的方法预测了利迪链菌素在蛋白酶活性部位的结合方式. 当前的分子对接方法中, 大多是刚性对接或

者只考虑了配体的柔性. 而事实上, 在底物和蛋白酶发生相互契合作用的过程中, 受体活性部位的构象也会发生一定程度的变化. 因此, 考虑了受体柔性的对接过程将会得到更加准确的复合物结构, 更真实地反映底物和酶的相互作用模式. 在实验中, 我们采用了两步的对接. 先是初步对接, 只考虑配体分子的柔性, 高效率地寻找其作用于受体大致模式; 然后, 利用初步对接的结果, 同时考虑配体与受体活性部位的柔性进行更为精确的精确对接.

本实验的各个步骤均利用 SYBYL6.92 软件包完成^[8].

1 材料和方法

本文所采用的晶体结构数据均取自 Protein Data Bank (www.rcsb.org). 选取一种非肽类抑制剂 Aha006 与 HIV 蛋白酶的复合物晶体(ID: 1AJV), 取其蛋白酶部分作为对接的受体^[9]. 在进行利迪链菌素的对接的同时, 将 Aha006 分子采用相同的方法和 HIV 蛋白酶的活性部位进行对接. 通过对比对接结果和实际情况中 Aha006 分子的作用方式来评价对接方法的可靠性. 利迪链菌素的结构提取自 Stl/RNAP 的复合物晶体结构(ID: 1ZYR)^[6].

1.1 配体的准备

将 Aha006 和 Stl 分子从复合物晶体结构 1AJV 和 1ZYR 中分别提取出来, 采用最陡下降法——共轭梯度法各 200 步分别进行优化. 优化过程采用 tripos 力场, Gasteiger-Hückel 电荷, 距离超过 0.8 nm 的原子间不考虑非键相互作用. 经过优化得到两个分子的初始三维构象.

1.2 配体的构象分析

为了消除初始构象对分子对接过程的影响, 先对配体分子在水溶液中的构象进行分析. 考虑到配体分子的体积, 将两个分子分别置于边长为 4.014 nm 的盒子中心, 采用 SILVERWARE 算法, 向盒子里填充水分子. 因为体系比较大, 所以使用淬火的方法进行构象分析. 在 800 K 的温度下对体系进行淬火, 使用 tripos 力场, Gasteiger-Hückel 电荷, 溶剂盒子的边缘作为边界条件. 淬火过程共进行 1000 fs, 每隔 50 fs 提取构象进行优化, 分别得到两个分子的 20 个低能构象. 将淬火过程得到的低能构象从水溶液中提取出来, 分别建立数据库.

1.3 初步分子对接

HIV 蛋白酶分子没有结合抑制剂时为特殊的 C₂ 对称的同二聚体结构. 每个单体提供一个活性三联体

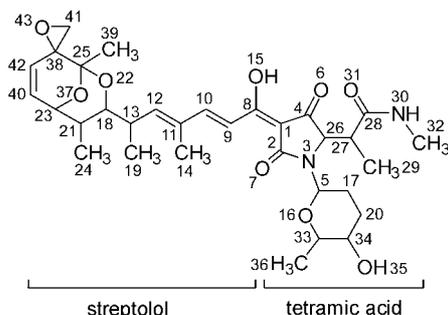


图 1 利迪链菌素的结构

Figure 1 Structure of streptolydigin

(Asp25-Thr26-Gly27)形成催化中心,各提供一个 β 发夹环结构(翼端)覆盖活性中心并参与底物和抑制剂的结合。绝大多数蛋白酶/抑制剂复合物的晶体结构显示,发夹环的 Ile50/Ile50'和抑制剂的 P_2/P_1' 间通过一个结合水分子(Wat301)形成氢键网络^[10-13]。新型的抑制剂中也有些直接与受体活性部位结合,没有结合水分子参与两者的相互作用^[14,15]。为了考察利迪链菌素和受体间的作用是否有水分子的参与,分别构建了不含有结合水分子的活性部位模型(A)和含有结合水分子的活性部位模型(B)。受体活性部位 A(图 2)的构建,选取了两个亚基中参与形成结合腔的残基 8, 10, 23—30, 32, 47—50, 80—84。在报道过的抑制剂/HIV-1 蛋白酶复合物结构中,结合水分子与抑制剂、蛋白酶的相对位置是固定不变的。如果利迪链菌素同样通过结合水分子与 Ile50/Ile50'形成氢键网络,这个水分子的位置应该和它在其它复合物中的位置一致。因此,参考文献中 Wat301 的位置,将水分子先行合并到活性部位上,构建成活性部位 B(图 3)。在活性部位 B 中,结合水分子与 Ile50/Ile50'的相对位置和文献[8]报道的受体/酶蛋白晶体复合物中位置一致,处于结合腔内靠近翼端的中心部分,与 Ile50/Ile50'的氮原子距离均为 0.3 nm。通过观察,可以发现水分子中的氧原子已经与 Ile50/Ile50'分别形成氢键。对接结果中,如果配体可以在结合水分子存在的情况下(活性部位 B)进入结合腔,并与结合水分子形成氢键,说明很有可能水分子通过搭建氢键网络参与了配体与受体的相互作用。如果先行置于结合腔中的水分子阻碍了配体分子的进入,或者增加了配体/受体复合物的能量(与活性部位 A 的对接结果相对比),则说明两者的作用没有结合水分子的参与。利迪链菌素与以上两个活性部位 A 和 B 的对接分别进行。本部分实验利用 FlexX 模块完成^[16],采用形式电荷, DrugScore 作为评分函数^[17]。

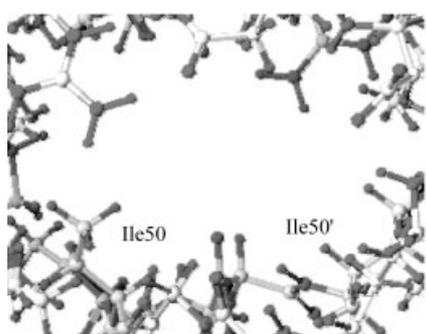


图 2 不含有结合水分子的活性部位

Figure 2 Active site excluding structural water molecule

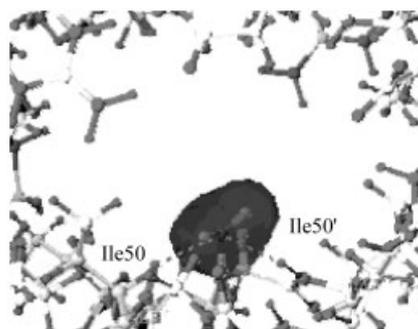


图 3 含有结合水分子的活性部位,结合水分子已经与翼端的 Ile50/Ile50'形成氢键

Figure 3 Active site including structural water molecule which forms hydrogen bonds with Ile50/Ile50' of the flap region

1.4 精确对接

将两个配体分子初步对接得到的结果,分别选取能量最低者作为初始构象,进行进一步精确对接。充分考虑了配体和受体分子的柔性,在对接过程中,配体分子的所有非环单键和受体上的所有氨基酸残基侧链均可自由旋转。本部分实验采用基于遗传算法的 Flexdock 模块,考虑了静电场作用,受体蛋白使用 Kollman all-atom 电荷,配体分子使用 Gasteiger-Hückel 电荷,传代 500000 次。

2 结果与讨论

2.1 Aha006 的对接结果与讨论

Aha006 与活性部位 B 的初步对接结果,全部二十个构象均不能完全进入活性部位。水分子阻碍了配体分子进入结合腔,使对接得到的复合物的能量较高,配体和受体并不能稳定地结合。而与活性部位 A 的初步对接结果中,20 个构象中有 19 个能够包埋到活性结合腔中并得到能量较低的复合物结构。这表明 Aha006 与蛋白酶的作用并没有结合水分子的参与,这与文献报道的相同^[9]。

经过精确对接过程,配体分子与活性部位的氨基酸残基间建立多对氢键作用,其中 SO_2 基团中两个氧原子分别与活性部位的 Ile50 和 Ile50' 的亚氨基氢原子形成氢键,七元环上的两个羟基与 Asp25 产生氢键作用(图 4)。根据文献报道, Aha006 七元环上两个羟基中的一个与 Asp25/Asp25' 分别产生氢键作用(图 5)^[9]。虽然对接得到的配体/受体氢键作用方式与文献报道的实际情况略有差别。但对接结果中 Aha006 分子的构象和空间位置与实际情况差别较小,均方根偏差 RMSD 为 0.132 nm(图 6),这表明分子对接所得到的结果和实际情况吻合得较好。

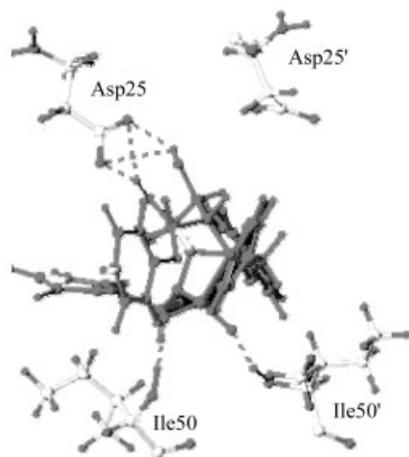


图4 Aha006 的对接结果中配体/受体间的氢键作用

Figure 4 Hydrogen bonds between Aha006 and active site according to the docking result

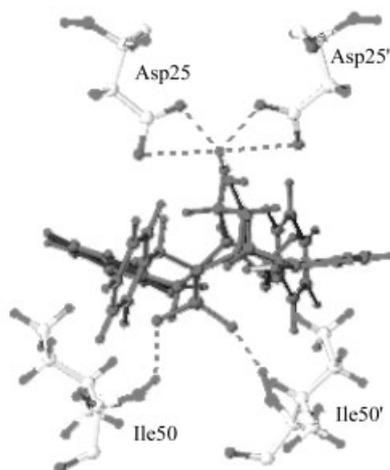


图5 实验获得的 Aha006/H2V PR 复合物晶体结构中配体/受体间的氢键作用

Figure 5 Hydrogen bonds in the X-ray crystal structure between Aha006 and active site

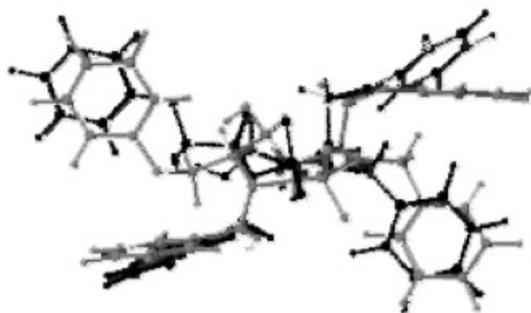


图6 Aha006 分子对接结果(灰色)与实际情况(黑色)的对比

Figure 6 Comparison between the docking result (gray) and the X-ray crystal structure (black)

Aha006 分子的对接结果与实际情况的对比表明, 本文采用的方法比较可靠, 可以较为准确地反映配体与受体的相互作用方式.

2.2 利迪链菌素的对接结果与讨论

StI 与活性部位 A 的初步对接结果, 全部的 20 个构象中, 有 12 个可以完全进入活性部位. 在能量最低的结果中, StI 分子的 O(7) 与活性部位的 Ile50' 的亚氨基氢原子形成了氢键. 而与活性部位 B 的对接结果, 全部的二十个构象均不能完全进入结合腔. 这表明预先置入结合腔的水分子阻碍了配体分子进入活性部位, 同时降低了配体分子同 Ile50' 建立氢键的可能性. 因此, 推测 StI 与 HIV 蛋白酶之间的作用没有结合水分子的参与.

经过精确对接过程, StI 的 streptolol 部分占据结合腔的 S1/S1' 部位, tetramic acid 部分与活性部位的氨基酸残基间形成了 5 对氢键作用(图 7). C(34) 上的羟基氧原子与 Arg8 形成了氢键作用, 在其作用下, Arg8 的侧链包住了 StI 分子, 对复合物的稳定起到了重要的作用, 这和前人做过的分子对接结果相符^[18]. C(8) 上的羟基氢原子与 Asp25' 间形成了一对氢键作用, C(28) 上的羰基氧原子与 Asp29' 形成了一对氢键作用, N(30) 的氢原子与 Gly48' 形成了一对氢键, O(7) 与 Ile50' 间形成一对氢键. 在这些氢键的作用下, StI 分子占据了受体的活性腔, 与受体结合形成了稳定的复合物, 并覆盖了对 HIV 蛋白酶的活性至关重要的 Asp25-Thr26-Gly27 三联体, 从而抑制了其生物活性.

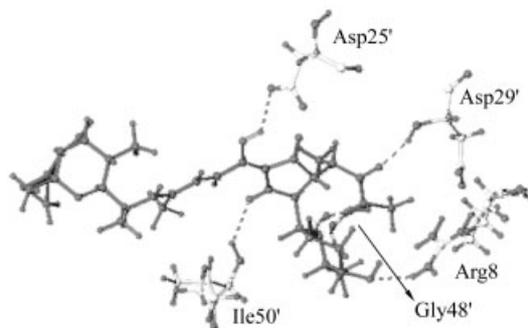


图7 利迪链菌素与活性部位的氢键作用

Figure 7 Hydrogen bonds between streptolydigin and active site

3 结论

本文用分子对接的方法对利迪链菌素与 HIV 蛋白酶的相互作用方式进行了研究. 首先选择了一种作用方式已知的 HIV 蛋白酶抑制剂 Aha006, 对其进行的分子对接研究表明, 模拟的结果与实际情况吻合得较好, 证明了对接方法的可靠性. 在此基础上, 对利迪链菌素进行了分子对接研究, 预测了 StI/HIV PR 复合物的结构, 并分析了二者的相互作用模式. 研究结果表明, 利迪链菌素与 HIV 蛋白酶的作用没有结合水分子的参与, 配体与受体通过 5 对氢键结合成为比较稳定的复合物, 受体

活性部位 Arg8 的侧链在氢键的作用下包住了配体分子,对稳定复合物的结构起到了重要的作用。

总之,利迪链菌素作为一种非肽类化合物,对 HIV 蛋白酶具有抑制作用。本文利用分子对接方法探讨了其发挥抑制活性的机理,以期在解释利迪链菌素的药理活性的基础上,提供理论指导,促进其生物活性的研究。

致谢 感谢天津大学化工学院大型仪器分析检测中心提供分子模拟软件 SYBYL6.92。

References

- 1 Kohl, N. E.; Emini, E. A.; Schleif, W. A.; Davis, L. J.; Heimbach, J. C.; Dixon, R. A. F.; Scolnik, E. M.; Sigal, I. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 4686.
- 2 Randolph, J. T.; DeGoey, D. A. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *10*, 1079.
- 3 Schinazi, R. F.; Larder, B. A.; Mellors, J. W. *Int. Antiviral News* **1997**, *5*, 129.
- 4 Chalongkwan, S.; John, W. E.; Bernard, W. J. *Bacteriol.* **1969**, *99*, 151.
- 5 Heisler, L.; Suzuki, H.; Landick, R.; Gross, C. J. *Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25369.
- 6 Steven, T.; Stefan, G. S.; Xinyue, W.; Brian, H.; Elena, S.; Jayanta, M.; Jens, J. B.; Olivier, L.; Sajida, I.; Arthur, D. C.; Chhaya, D.; Andrew, N.; Oleg, L.; Jookyung, L.; Sergai, B.; Richard, H. E.; Eddy, A. *Cell* **2005**, *122*, 541.
- 7 Wang, Z.-P. *Ph.D Dissertation*, Tianjin University, Tianjin, **2004** (in Chinese). (王志平, 博士论文, 天津大学, 天津, **2004**.)
- 8 SYBYL, Version 6.92, Tripos Inc., Louis, Missouri, U. S. A., **2004**.
- 9 Backbro, K.; Lowgren, S.; Osterlund, K.; Atepo, J.; Unge, T. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 898.
- 10 Navia, M. A.; Fitzgerald, P. M. D.; McKeever, B. M.; Leu, C.-T.; Heimbach, J. C.; Herber, W. K.; Sigal, I. S.; Darke, P. L.; Springer, J. P. *Nature* **1989**, *337*, 615.
- 11 Miller, M.; Schneider, J.; Sathyanarayana, B. K.; Toth, M. V.; Marshall, G. R.; Clawson, L.; Selk, L.; Kent, S. B.; Wlodawer, A. *Science* **1989**, *246*, 1149.
- 12 Louis, J. M.; Dyda, F.; Nashed, N. T.; Kimmel, A. R.; Davies, D. R. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2105.
- 13 Weber, I. T.; Wu, J.; Adomat, J.; Harrison, R. W.; Kimmel, A. R.; Wondrak, E. M.; Louis, J. M. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 523.
- 14 Wang, Y.; Freedberg, D. I.; Grzesiek, S.; Torchia, D. A.; Wingfield, P. T. *Biochemistry* **1996**, *35*, 694.
- 15 Hodge, C. N.; Aldrich, P.; Bacheler, L. T.; Chang, C.-H.; Eyermann, C. J. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 1.
- 16 Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470.
- 17 Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 337.
- 18 Österberg, F.; Morris, G. M.; Sanner, M. F.; Olson, A. J. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2002**, *46*, 34.

(A0506211 SONG, J. P.)