

• 研究论文 •

分子模拟研究铜、锌与 A β 肽相互作用中的竞争取代效应

贾卫平 焦勇 杨频*

(山西大学分子科学研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘要 以分子模拟方法研究了与 A β 肽相互作用中铜、锌两种金属离子竞争取代的可能机理. 结果表明, 锌离子不能竞争取代准螺旋配合物 [Cu-H13(N π)-Y10(OH)], 不影响其聚集抑制作用; 配合物 [Zn-H14(N τ)-V12(CO)] 和 [Zn-H13(N τ)-E11(CO)] 中的锌离子能被铜离子所取代, 配合物构象无明显变化. 另外, 铜离子还能取代简单桥联模式 [H13(N τ)-Zn-H14(N τ)] 中的锌离子.

关键词 锌离子(II); 铜离子(II); A β 肽; 竞争取代; 分子模拟

Molecular Modeling of the Competitive Substitution Effect between Cu²⁺ and Zn²⁺ in the Interactions with Amyloid β -Peptide

JIA, Wei-Ping JIAO, Yong YANG, Pin*

(Institute of Molecular Science, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The possible mechanism of the competitive substitution effect between Zn²⁺ and Cu²⁺ in the interactions with A β was investigated for the first time by a molecular modeling method. The results show that Zn²⁺ fails to substitute the Cu²⁺ in the complex of [Cu-H13(N π)-Y10(OH)] with a quasi-helix conformation and thus is of no effect on the inhibition of Cu²⁺ on A β aggregation. However, in striking contrast to Zn²⁺, Cu²⁺ effectively substitutes the Zn²⁺ in the complexes of [Zn-H14(N τ)-V12(CO)] and [Zn-H13(N τ)-E11(CO)] almost without disturbing the conformation of the complexes. In addition, Cu²⁺ may even substitute the Zn²⁺ which crosslinks two A β strands by the bridge of [H13(N τ)-Zn-H14(N τ)].

Keywords zinc(II); copper(II); amyloid β -peptide; competitive substitution; molecular modeling

阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD), 又称老年痴呆, 是最常见的神经退行性疾病之一, 其定义性病理标志是在大脑中出现淀粉样斑和神经纤维缠结. 在 AD 病人大脑中, 跨膜蛋白 APP 经蛋白酶水解得到 A β 肽(Amyloid β -Peptide), 它在体内以尚未明了的机制聚集成斑点核, 然后与相关蛋白质等共沉淀成脑斑. 脑斑具有神经毒性, 它的扩展将导致神经退行性病变^[1,2]. 体外实验表明, 铜、锌、铁都可促使 A β 聚合, 其中, 锌离子诱导 A β 聚集的能力最强, 而铜离子与 A β 作用则受 pH 或者浓度变化影响^[3,4,7]. 与同龄对照组相比, AD 患

者的若干严重退化的大脑区域诸如海马区和扁桃体结构中, 锌离子、铁离子浓度相对升高^[5,6], 铜离子浓度则显著下降^[5]. 研究发现, 在一定条件下, 铜离子通过与锌离子对 His 残基的竞争作用, 可有效抑制 A β 的聚集. 在锌离子与 A β 多肽的聚集体系中加入铜离子后, 淀粉样多肽的聚集急剧减少^[7]. 然而, 在与 A β 的作用过程中, 铜、锌离子之间的具体竞争机理尚不清楚. 我们以分子模拟方法探讨了铜、锌离子与 A β 肽相互作用形成的配合物被对方取代的可能作用机理, 完善了我们在分子水平上对 AD 病人体内两种金属离子作用机制的认知.

* E-mail: yangpin@sxu.edu.cn; Tel./Fax: 0086-0351-7011022.

Received December 26, 2006; revised February 3, 2007; accepted March 27, 2007.

国家自然科学基金(Nos. 30470408 和 20637010)资助项目.

1 模拟方法

研究发现 AD 患者脑斑主要由淀粉样 β 多肽组成^[8], 利用电子显微镜观测从斑点核中提取的 A β 纤维, 发现其由两条直径为 2~4 nm 的单纤维组成, X-ray 衍射分析检测到单纤维 A β 在纤维轴向及正交方向上的空间周期分别为 0.48 和 1.06 nm^[8,9]. 可见, A β 多肽在此纤维中是有序排列的. Lynn 等^[10]联合应用固态核磁、电子显微镜和小角度中子散射等手段对处于溶液和固态的合成纤维进行了直接研究, 建立了 A β 10-35 的纤维结构模型. 该模型空间排列数据与斑点核中提取的纤维实验所测基本吻合, 说明研究它对了解斑点核信息具有指导意义.

Morgan 等^[11]还合成了较短的 A β 10-21 (10YEVHHQKLVFFA21), 研究发现加入锌离子加快了 A β 的聚集生长. 该段序列保持了整个 A β 的两性分布特点, 研究其变化可用来揭示完整 A β 的特性. 目前, 我们^[12,13]已对金属离子与 A β 10-21 的键合模式作了一定的理论模拟. 在本文中, 我们以程序的 beta_strand 结构建

立标准 β 多肽 A β 10-21 ($\Phi = -120^\circ$, $\Psi = +120^\circ$), 并以此搭建实验限制性模型: 首先, 建立 β 折叠片二级结构, A β 通过氢键侧向聚集在一起, 间隔为 0.5 nm(图 1b); 然后, 令 β -sheets 在垂直于纤维轴方向相互平行层叠, 跨度为 1.0 nm(图 1c). 图 1a 给出了一个简单组合 4*4 型纤维结构, 实际计算中还可根据需要搭建 $N*M$ (sheets*lamin)体系.

在我们的前期研究基础上, 本文研究了铜、锌离子与 A β 优势键合模式被竞争取代的可能作用机理. 该工作选择 ESFF 分子力学力场(参数默认)来优化构象, 所有计算在 SGI 工作站上完成, 软件平台是 InsightII 2000.

2 结果与讨论

2.1 中心铜离子的取代模拟

铜离子与 A β 肽作用过程中, pH、铜离子浓度、配位形式等对反应结果影响很大. 前期工作中, 我们以 H13, H14 残基的咪唑 N 原子为锚合点, 在两个水分

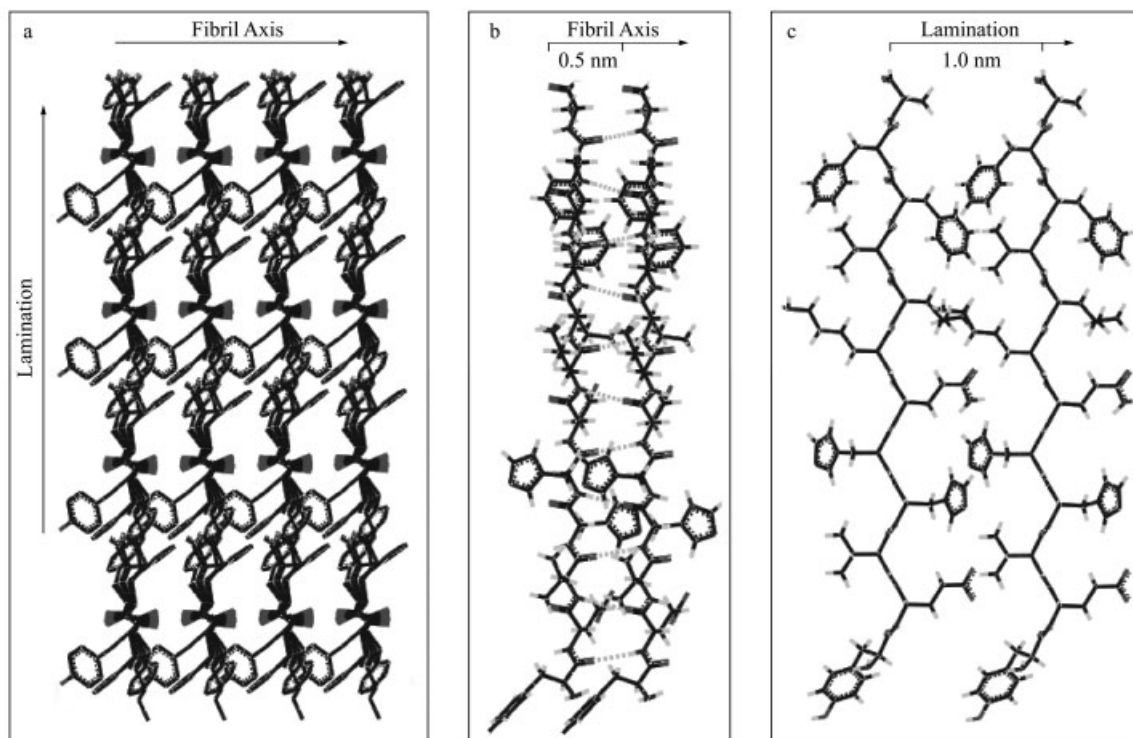


图 1 A β 10-21 纤维结构模型

(a) 4 个折叠片层叠纤维结构, 该纤维由标准 β 多肽组成, 在平行于纤维轴方向通过氢键交联形成 β 折叠片, β 折叠片在纤维轴正交方向平行层叠; (b) 在折叠片内 β 多肽间氢键与纤维轴相平行且垂直于多肽骨架链; (c) 折叠片间 β 多肽选片伸展方向垂直于多肽骨架链. 折叠片间及其内部相邻多肽空间距离分别为约 1.0 nm (c), 约 0.5 nm (b)

Figure 1 The model of the A β 10-21 fibril

(a) The four-sheets laminated fibril with the heavy atoms shown, as viewed along the peptide backbones. These fibrils are composed of β -strands, associating into β -sheet with hydrogen bond parallel to fibril long axis, while β -sheets laminate perpendicular to the fibril axis. (b) Hydrogen bonds formed between two β -strands within a sheet, as viewed perpendicular to the peptide backbones and along the axis of fibril propagation. (c) The lamination between two β -strands of different sheets, as viewed perpendicular to the peptide backbones and along the direction of lamination. The spacing between strands in the sheet and the mean distance between laminated sheets are ca. 0.5 (b) and ca. 1.0 nm (c), respectively

子参与配位的前提下,对 $A\beta$ 的主链和侧链上存在的铜离子潜在作用位点分别进行搜索,发现 Cu^{2+} - $A\beta$ 优势可溶配合物为 $[Cu-H13(N\pi)-Y10(OH)]$, 配位几何为平面四边形,这种键合能量较低,促使 $A\beta$ 肽向螺旋构象转变且抑制多肽的纤维化聚集^[12]. 为验证铜、锌离子间竞争取代作用,替换上述配合物稳定结构的中心离子为锌离子,优化体系.

由表 1 可知,相同配位环境下,配合物 $[Cu-H13(N\pi)-Y10(OH)]$ 被锌离子取代后,体系势能急剧升高,观察以取代前相应能量为参比值的图 2 曲线,可看出优化过程中,由成键及非键作用共同组成的体系势能始终为正值,说明取代配合物 $[Zn-H13(N\pi)-Y10(OH)]$ 体系势能始终高于取代前. 可见,在混合体系中,配合物 $[Cu-H13(N\pi)-Y10(OH)]$ 的铜离子不会被锌离子取代,铜离子促使 $A\beta$ 肽螺旋化及抑制 $A\beta$ 肽纤维化聚集的作用不会减弱.

对比图 2 曲线变化,发现取代后成键能曲线迅速下降,而锌离子配位几何则由平面四边形转变为四面体(图 3),此时能量曲线反映了配位几何的变化,说明锌离子在四配位环境中,四面体配位最稳定. 非键能曲线随成键作用发生相应变化,也反映了体系空间构象的变化.

2.2 中心锌离子的取代模拟

实验证明, Zn^{2+} - $A\beta$ 多肽通过分子间 $His(N\tau)-Zn^{2+}-His(N\tau)$ 桥键聚集成聚集体^[4],分别在化学取代 H13/A13 和 H14/A14 各自体系中加入锌离子后发现,没

有沉淀及大的聚集体形成^[14,15],说明 His13, His14 是不溶聚集形成的关键.

在前期工作中,我们以 H13, H14 残基的咪唑 N 原子为锚合点,对 $A\beta$ 的主链和侧链以及邻近 $A\beta$ 上存在的锌离子潜在作用位点分别进行搜索,系统地考察了锌离子与 $A\beta$ 相互作用的键合模式. 研究发现,锌离子的四面体配位能量最低. 链内螯合模式中,由 H14(N τ)、主链 V12(CO)、两个 Wat(O)或 H13(N τ)、侧链 E11(CO)、两个 Wat(O) 作为配体的四面体配合物 $[Zn-H14(N\tau)-V12(CO)]$ ^[13]和 $[Zn-H13(N\tau)-E11(CO)]$ 是锌离子与 $A\beta$ 的优势键合模式,这两种键合有利于体系内 β 折叠成分的增加,诱导增强 β 型二级结构 β -sheet 的形成,促进了 $A\beta$ 的纤维化聚集. 桥联模式中,两个 β -sheets 之间是通过同层相邻多肽的 $[H13(N\tau)-Zn-H14(N\tau)]$ 而交联起来的^[13],有两个水分子参与配位. 对上述键合模式的稳定结构,替换中心离子为铜离子,优化体系.

2.2.1 链内螯合模式

从表 2 可知,配合物 $[Zn-H14(N\tau)-V12(CO)]$ 及 $[Zn-H13(N\tau)-E11(CO)]$ 被铜离子取代后,体系势能降低,而成键作用能均低于取代前. 从图 4, 5 可看出,优化过程中,由成键及非键作用共同组成的体系势能一直小于零,说明铜离子可以把锌离子从四面体配位环境中竞争出来,取代物体系趋于更稳定状态.

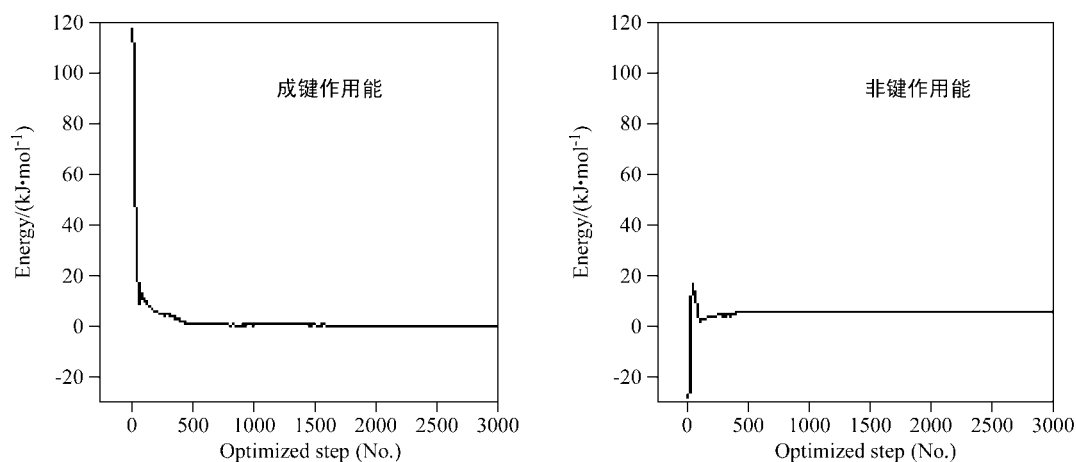


图 2 取代配合物 $[Zn-H13(N\pi)-Y10(OH)]$ 优化能量曲线

以配合物 $[Cu-H13(N\pi)-Y10(OH)]$ 相应能量为参比值

Figure 2 The energy curve of the substituted complex $[Zn-H13(N\pi)-Y10(OH)]$

The corresponding energy of the complex $[Cu-H13(N\pi)-Y10(OH)]$ was regarded as the reference value

表 1 配合物 $[Cu-H13(N\pi)-Y10(OH)]$ 被 Zn^{2+} 取代前后能量对比 ($kJ\cdot mol^{-1}$)^a

Table 1 The energy of the complex $[Cu-H13(N\pi)-Y10(OH)]$ and Zn^{2+} substitution product ($kJ\cdot mol^{-1}$)

	链内螯合模式 ^b	体系势能	成键作用能	非键作用能
取代前	$[Cu-H13(N\pi)-Y10(OH)]$	-1350.10	509.92	-1860.02
取代后	$[Zn-H13(N\pi)-Y10(OH)]$	-982.66	989.47	-1972.13

^a 配位环境相同; ^b 配位几何为平面四边形, 有两 Wat(O) 参与配位.

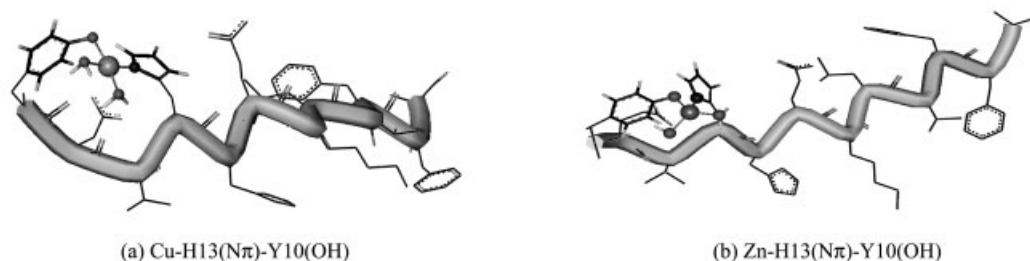


图3 配合物[Cu-H13(N π)-Y10(OH)] (a)及其锌离子取代物(b)的稳定结构

Figure 3 The stabilized conformation of the complex [Cu-H13(N π)-Y10(OH)] (a) and Zn²⁺ substitution product (b)

表2 Zn²⁺-A β 配合物被 Cu²⁺取代前后能量对比(kJ·mol⁻¹)^a

Table 2 The energy of the complex Zn²⁺-A β and Cu²⁺ substitution product (kJ·mol⁻¹)

		键合模式 ^b	体系势能	成键作用能	非键作用能
链内螯合模式	取代前	[Zn-H14(N τ)-V12(CO)]	-1291.41	513.96	-1805.37
	取代后	[Cu-H14(N τ)-V12(CO)]	-1340.24	435.92	-1776.16
	取代前	[Zn-H13(N τ)-E11(CO)]	-1437.62	411.26	-1848.88
	取代后	[Cu-H13(N τ)-E11(CO)]	-1525.69	341.23	-1866.92
链间桥联模式	取代前	[H13(N τ)-Zn-H14(N τ)]	-1581.77	694.38	-2276.14
	取代后	[H13(N τ)-Cu-H14(N τ)]	-1636.61	623.19	-2259.80

^a 配位环境相同; ^b 配位几何为四面体配位, 有两 Wat(O)参与配位.

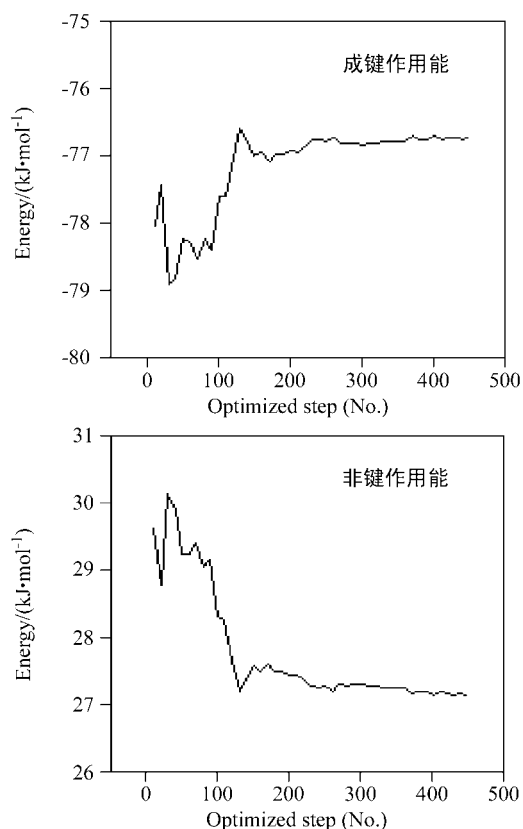


图4 取代配合物[Cu-H14(N τ)-V12(CO)]优化能量曲线

以配合物[Zn-H14(N τ)-V12(CO)]优化结果相应能量为参比值

Figure 4 The energy curve of the substituted complex [Cu-H14(N τ)-V12(CO)]

The corresponding energy of the complex [Zn-H14(N τ)-V12(CO)] was regarded as the reference value

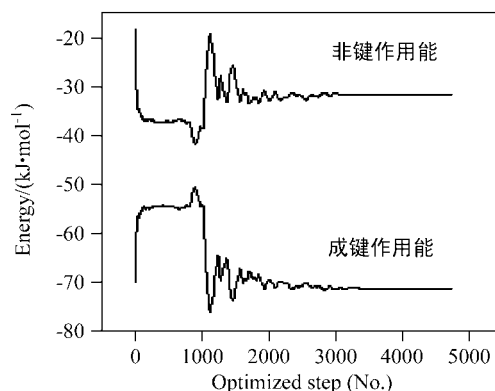


图5 取代配合物[Cu-H13(N τ)-E11(CO)]优化能量曲线

以配合物[Zn-H13(N τ)-E11(CO)]优化结果相应能量为参比值

Figure 5 The energy curve of the substituted complex [Cu-H13(N τ)-E11(CO)]

The corresponding energy of the complex [Zn-H13(N τ)-E11(CO)] was regarded as the reference value

观察图 4, 5 发现, [Cu-H13(N τ)-E11(CO)]能量变化幅度远大于[Cu-H14(N τ)-V12(CO)], 这是因为图 5 配合物[Cu-H13(N τ)-E11(CO)]内层配位的配体含带电基团 COO⁻, 取代后该基团与铜离子配体水间形成了较强的氢键(图 6), 非键能迅速降低, 而配体水位置的变动则导致局部配位环境发生改变, 成键作用能升高(图 5). 在成键与非键作用相互协调下, 约 1000 步时能量有明显变化, 反映了肽链的结构调整. 表 3 的 RMS 值中, 配合物 [Cu-H13(N τ)-E11(CO)]与取代前叠合 RMS 值略大, 说明其结构变化略大. 可见, 非键作用同样影响肽链的变化.

表 3 Zn^{2+} -A β 配合物被 Cu^{2+} 取代前后骨架叠合 RMS (Root Mean Square) 值
Table 3 The backbone superimpose RMS of the complex Zn^{2+} -A β and Cu^{2+} substitution product

稳定构象	[Zn-H14(N τ)-V12(CO)]	[Zn-H13(N τ)-E11(CO)]
[Cu-H14(N τ)-V12(CO)]	0.0545	—
[Cu-H13(N τ)-E11(CO)]	—	1.0667

从图 6 空间构象可看出, 取代后肽链没有发生明显的变化, 表 3 数据也说明, 多肽骨架变化不明显. [Zn-H14(N τ)-V12(CO)] 被取代前后构象变化与图 6 相似, 由 RMS 值可知其构象转变极小.

总之, 铜、锌离子与 A β 肽混合体系中, 铜离子能将 Zn^{2+} -A β 配合物中心离子竞争出来, 形成更稳定的 β 型多肽, 铜离子有不利于疾病的一面.

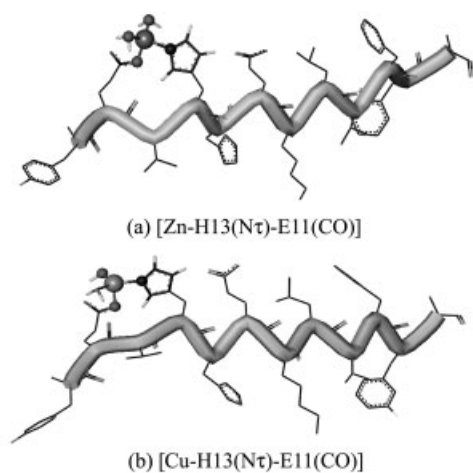


图 6 配合物 [Zn-H13(N τ)-E11(CO)] (a) 及其铜离子取代物 (b) 的稳定结构

Figure 6 The stabilized conformation of the complex [Zn-H13(N τ)-E11(CO)] (a) and Cu^{2+} substitution product (b)

2.2.2 链间桥联模式

由表 2 可知, 相同的四面体配位, 铜离子桥联模式 [H13(N τ)-Cu-H14(N τ)] 成键作用比锌离子桥联模式低约 71.19 kJ/mol, 体系势能也相对较低. 可见, 铜离子的配位更稳定, 能把多肽间桥联的锌离子竞争出来. 然而, 聚集体系内各种作用错综复杂, 详细的机理有待进一步研究.

3 结论

体外实验发现了铜、锌等金属离子对 A β 聚集作用的多种效应, 然而, 其中的作用机理尚未完全明了. 本文通过分子模拟发现, 锌离子不能取代准螺旋配合物 [Cu-H13(N τ)-Y10(OH)], 不影响其抑制聚集作用; 链内螯合物 [Zn-H14(N τ)-V12(CO)] 和 [Zn-H13(N τ)-E11(CO)]

能被铜离子取代, 取代前后配合物构象变化较小. 另外, 铜离子还能取代简单桥联模式 [H13(N τ)-Zn-H14(N τ)] 的中心离子, 具有抑制以及促进 A β 聚集的双重功能, 有不利于治疗的一面. 以上结果完善了我们对人体内两种金属离子的认识, 有助于启发科研工作者的研究思路, 从而制定相应的治疗手段.

References

- 1 Storey, E.; Cappai, R. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1999**, 25, 81.
- 2 Atwood, C. S.; Martins, R. N.; Smith, M. A.; Perry, G. *Peptides* **2002**, 23, 1343.
- 3 Atwood, C. S.; Moir, R. D.; Huang, X.-D.; Scarpa, R. C.; Bacarra, N. M. E.; Romano, D. M.; Hartshorn, M. A.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 12817.
- 4 Miura, T.; Suzuki, K.; Kohata, N.; Takeuchi, H. *Biochemistry* **2000**, 39, 7024.
- 5 Deibel, M. A.; Ehmann, W. D.; Markesbery, W. R. *J. Neurol. Sci.* **1996**, 143, 137.
- 6 Danscher, G.; Jensen, K. B.; Frederickson, C. J.; Kemp, K.; Andreasen, A.; Juhl, S.; Stoltenberg, M.; Ravid, R. *J. Neurosci. Methods* **1997**, 76, 53.
- 7 Suzuki, K.; Miura, T.; Takeuchi, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 285, 991.
- 8 Dong, J.; Atwood, C. S.; Anderson, V. E.; Siedlak, S. L.; Smith, M. A.; Perry, G.; Carey, P. R. *Biochemistry* **2003**, 42, 2768.
- 9 Kirschner, D. A.; Abraham, C.; Selkoe, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 503.
- 10 Burkoth, T. S.; Benzinger, T. L. S.; Urban, V.; Morgan, D. M.; Gregory, D. M.; Thiagarajan, P.; Botto, R. E.; Meredith, S. C.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7883.
- 11 Morgan, D. M.; Dong, J.-J.; Jacob, J.; Lu, K.; Apkarian, R. P.; Thiagarajan, P.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12644.
- 12 Jiao, Y.; Han, D.-X.; Yang, P. *Sci. China, Ser. B* **2005**, 35, 303 (in Chinese).
(焦勇, 韩大雄, 杨频, 中国科学 B 辑, **2005**, 35, 303.)
- 13 Han, D.-X.; Yang, P. *Sci. China, Ser. B* **2004**, 34, 61 (in Chinese).
(韩大雄, 杨频, 中国科学 B 辑, **2004**, 34, 61.)
- 14 Yang, D.-S.; McLaurin, J.; Qin, K.-F.; Westaway, D.; Fraser, P. E. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 6692.
- 15 Dong, J.-J.; Shokes, J. E.; Scott, R. A.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3540.