

Bcl-2 蛋白抑制剂结合腔的性质分析

郑灿辉, 周有骏, 朱 驹, 陈 军, 李耀武, 盛春泉, 宋云龙, 吕加国, 蒋俊航, 刘 娜
(第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

摘要 采用多重拷贝同时搜寻(MCSS)等方法对 Bcl-2 蛋白抑制剂结合腔进行分析. 结果显示, 结合腔可分成 P1, L1, P2, P3 和 P4 等 5 个区域, 其底部呈疏水性, 而 P3 部位不适合芳香性大基团的结合. 结合腔侧面和边缘处分布有可与配体形成除疏水以外作用的多个重要残基. MCSS 计算得到的各种性质官能团在结合腔内的能量优势位置和取向能与已知结合模式的高活性抑制剂的重要基团位置吻合得较好.

关键词 Bcl-2 蛋白; 多重拷贝同时搜寻; 抑制剂; 合理设计

中图分类号 O641 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)03-0591-05

Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡通路中起重要的调节作用. 研究表明, 其抗凋亡亚家族成员通过其表面的疏水凹槽与促凋亡亚家族成员的 Bcl-2 蛋白家族保守区域(BH)3 结合而发生相互作用, 调节细胞正常的生理凋亡. 抗凋亡亚家族成员的过度表达可阻止细胞正常的生理凋亡, 是肿瘤产生及发生耐药的重要原因之一. 如果干扰两者的结合将促进肿瘤细胞的凋亡, 因此 Bcl-2 成为具有较好应用前景的抗肿瘤靶点. 近几年来, 研究者发现了一些能结合于 Bcl-2 活性腔的抗肿瘤小分子抑制剂, 已有多个化合物正在进行临床前研究^[1]. 2005 年, Oltersdorf 等^[2]报道了 Bcl-2 与小分子抑制剂结合复合物的分辨三维结构. 目前尚未见到基于此结构对蛋白抑制剂结合腔进行深入细致的研究的报道. Cafisch 等^[3]开发的多重拷贝同时搜寻(MCSS)方法基于蒙特卡罗和能量优化结合的技术能有效地确定各种性质官能团在已知三维结构靶点中的能量优势位置和取向, 该方法能同时优化随机放置于靶点内的大量官能团拷贝, 从而排除拷贝之间的相互干扰, 得到准确的结果.

本文采用活性位点搜寻工具确定了 Bcl-2 抑制剂结合腔的大小形状, 用 MCSS 方法对抑制剂结合腔进行计算, 分析结果确认了抑制剂结合腔各区域的性质和重要残基的分布. MCSS 计算得到的各种性质官能团在抑制剂结合腔内的能量优势位置和取向能与已知结合模式的高活性抑制剂的重要基团位置较好地吻合, 说明了模拟计算结果的可靠性, 反过来它也可以对抑制剂的结构修饰和全新设计有所启发^[4].

1 计算与方法

本文采用的结构 1YSW 从 RCSB Protein Databank(PDB)数据库中获取, 由 NMR 测得. 所有的计算均在 Origin 300 服务器上由 SYBYL 6.9^[5], Insight II 2000^[6] 软件包完成.

1.1 蛋白结构优化

从 PDB 数据库直接获取的结构中存在一定不合理碰撞和张力, 用于研究前我们先对它们进行简单的分子力学能量优化. 优化在 SYBYL 中进行, 采用逐步放开的策略, 最终优化至能量梯度小于 20.9 kJ/(mol·nm).

1.2 活性位点搜寻

采用 Insight II 中 Binding Site Analysis 模块确定蛋白抑制剂结合腔的大小和形状. 搜寻蛋白抑制剂结合腔时用大小设为 0.145 nm × 0.145 nm × 0.145 nm 的格点来填满蛋白的溶剂可及表面.

收稿日期: 2007-02-02.

基金项目: 第二军医大学博士创新基金(2005 年度)和上海市重点学科建设项目(批准号: B906)资助.

联系人简介: 周有骏, 男, 教授, 博士生导师, 从事抗真菌和抗肿瘤药物研究. E-mail: zhouyoujun2006@yahoo.com.cn

1.3 MCSS 计算

计算采用 MCSS 2.1 程序和 CHARMM22 力场. 根据活性位点搜寻结果设置了一个 $3.2 \text{ nm} \times 1.6 \text{ nm} \times 1.2 \text{ nm}$ 的长方体以定义蛋白抑制剂结合腔区域. 每次搜寻先随机放置 200 个官能团拷贝至活性区域, 同时进行独立能量优化. 最终得到的低能官能团位置之间均方根偏差小于 0.02 nm 的可认为等同且, 只保留其中一个. 为了更充分地对抑制剂结合腔进行搜寻, 将同样的流程重复 10 次.

2 结果与讨论

2.1 Bcl-2 蛋白的抑制剂结合腔

通过活性位点搜寻程序发现抑制剂结合腔是蛋白表面一个占据 256 个格点 (体积 0.78 nm^3) 的狭长凹槽 (见图 1), 它的底部主要由 $\alpha 5$ 构成, 其它侧面由 $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ 及 $\alpha 8$ 围成. 根据药物设计的观点可以将抑制剂结合腔分为 5 个主要区域. P1 和 P2 口袋是抑制剂结合腔内两个较深的口袋, P3 和 P4 是抑制剂结合腔的两端, 为两个较浅的口袋, 而 L1 是一个相对较窄浅的 P1 和 P2 连接部位.

2.2 MCSS 计算结果

MCSS 计算得到 10 个非极性、极性和带电的官能团在抑制剂结合腔内的能量分布见表 1. 而由于官能团与溶剂竞争结合于蛋白抑制剂结合腔, 所有只有结合能低于一半溶剂化焓 (能反映溶剂化能) 的低能官能团纳入下一步分析^[7].

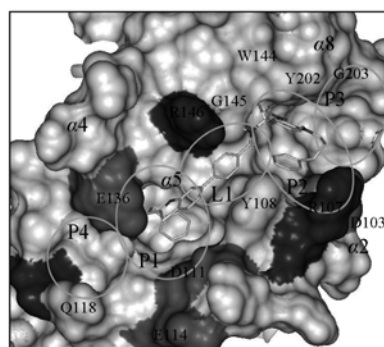


Fig. 1 Schematic representation of the inhibitors-binding site of Bcl-2

A small molecule inhibitor binding to Bcl-2 is shown in stick.

Table 1 Results of functional groups mapped into the inhibitor-binding site of Bcl-2

Functional group	$\frac{\Delta H}{2}/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ ^[7]	Initial No. of copy	Number of copy with the sayment of interaction energy < 0	Energy range/ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Number of copy with interaction energy < $\Delta H/2$
Benzene	-14.6	2000	30	-58.9—-14.4	29
Cyclohexane		2000	72	-33.2—-0.4	
Propane	-10.0	2000	75	-27.1—-11.9	75
Isobutane	-10.0	2000	223	-30.3—-12.0	223
Water	-20.9	2000	52	-140.6—-11.9	48
N-Methyl acetamide	-40.1	2000	58	-168.1—-13.4	46
Methanol	-21.3	2000	71	-116.0—-12.3	68
Phenol		2000	103	-106.8—-25.9	
Methyl ammonium	-156.8	2000	28	-422.6—-17.8	8
Acetate ion	-194.4	2000	23	-328.6—-46.8	6

2.2.1 非极性官能团的分布 低能的非极性官能团在抑制剂结合腔的各个部位几乎均有分布. 如图 2 (A) 所示, 低能的苯大致可分为 4 簇, 分别对应于 P1, P2, P4 和 L1. 最低能量的官能团位于 L1 部位, 我们认为这是由于它既能与蛋白形成疏水作用, 还能与此部位的 R146 带正电荷侧链形成阳离子- π 相互作用. 能量稍高的官能团分别分布于 P1, P2 和 P4 的底部, 与蛋白形成较强的疏水作用. 另外值得注意的是, 在 P2 内部分布有部分与 Y202 呈接近平行的的低能苯, 它们之间形成 π - π 堆积作用.

由于丙烷不具有芳香性, 其低能的官能团分布与苯略有差别. 如图 2 (B) 所示, 丙烷除分布于苯分布的四个部位以外还分布于 P3 部位, 且具有较低能量. 另外, 在 L1 部位, 分布于此的丙烷低能官能团和苯不同, 能量并非最低, 我们认为这是由于在此部位丙烷只能以疏水作用结合, 而不能象苯一样形成阳离子- π 相互作用. 另外两类脂肪族非极性官能团环己烷和异丁烷分布和丙烷类似, 不再详述.

2.2.2 电性官能团的分布 由于具有较大的溶剂化焓, 纳入分析的低能带电官能团较少. 由图 2 (C) 可见, 能量最低的 1 和 2 号甲铵离子低能官能团位于 P1 内, 与 E136 侧链形成离子键. 4 和 5 号甲铵离

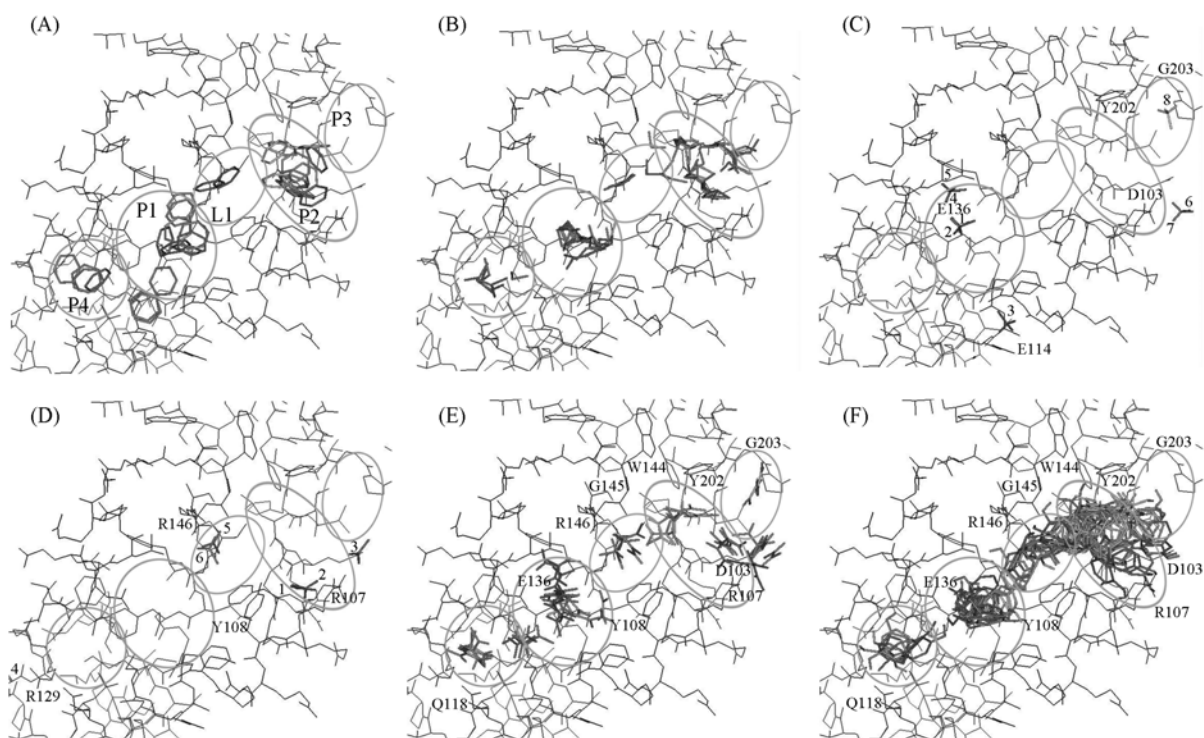


Fig. 2 Functional groups (shown in thick sticks) mapped into inhibitors-binding site of Bcl-2

(A) Benzene; (B) propane; (C) methyl ammonium; (D) acetate ion; (E) *N*-methyl acetamide; (F) phenol.

子除了可与 E136 侧链形成离子键外, 还与 E136 骨架羰基形成氢键. 3 和 6 及 7 号甲铵离子可分别与 E114 和 D103 形成离子键, 但它们都位于腔的边缘处. 还有一个 8 号甲铵离子位于 P3, 可与 Y202 和 G203 的骨架羰基形成氢键. 由图 2(D) 可见, 对于乙酸根离子, 5 和 6 号甲铵离子位于 L1, 可与 R146 形成离子键. 其它低能官能团虽然具有更低的能量, 但都位于腔的边缘处. 1 号甲铵离子既可与 R107 侧链形成离子键, 还可与 Y108 侧链形成氢键. 2, 3 和 4 号甲铵离子可分别与 R107 和 R129 形成离子键.

2.2.3 极性官能团的分布 低能的极性基团分散分布于抑制剂结合腔各个区域. *N*-甲基乙酰胺能既作为供体又作为受体和蛋白形成氢键. 如图 2(E) 所示, 能量最低的官能团分布于抑制剂结合腔侧面带电荷残基 R107(P2), D103(P2), E136(P1, P4), R146(L1) 周围与之形成氢键. 部分分布于 Y108 侧链(L1)、Q118 侧链(P4)、G203 骨架羰基(P3)、G145 骨架羰基(L1) 周围并与之形成氢键的低能官能团也具有较低能量. 还有低能官能团分布于 P4, P1 和 P2 的中部, 没有形成氢键, 但其与蛋白之间存在一定的范德华作用. 甲醇的低能官能团分布和 *N*-甲基乙酰胺很相似, 但它还有部分低能官能团分布于 D111 侧链及骨架羰基(P1)、Y202 骨架羰基及侧链(P3, P2)、W144 骨架羰基(P2) 周围并形成氢键. 水的分布也类似, 但由于水的极性更大, 在几个口袋内部的分布更少, 分布于 P2 中部的一些低能官能团能量较高, 这也说明抑制剂结合腔底部具有较强的疏水性.

另一个极性官能团苯酚的分布有所不同. 如图 2(F), 它的低能位置由其芳香环的疏水作用和极性基团的电性作用共同决定, 充满了整个抑制剂结合腔. 但能量最低是那些既能和蛋白前述残基侧链或骨架形成氢键, 又能形成疏水作用的官能团. 另外, 结合于 P2 和 Y202 平行形成 π - π 堆积作用, 并和 G145 骨架羰基形成氢键的官能团也具有较低能量.

2.3 抑制剂结合腔各区域的性质

根据 MCSS 计算结果的分析和对复合物中相互作用的考察, 可以确定抑制剂结合腔五个区域的性质. 各区域(P1, L1, P2, P3, P4) 底部均呈疏水性, 能与疏水基团形成紧密结合, 其中 P1 和 P2 体积较大最易发生结合, 而 P3 部位不适合芳香性大基团的结合. 而可与配体形成除疏水以外作用的残基主要分布于抑制剂结合腔的侧面和边缘处, 见表 2, 具体位置图示见图 1.

Table 2 Important residues on the side and edge of Bcl-2 inhibitors-binding site*

Subsite	Position	Residue	Interactions with ligand
P1	Side	E136, D111	Salt bridge, hydrogen bond
	Edge	E114	Salt bridge, hydrogen bond
L1	Side	R146	Salt bridge, hydrogen bond, cation- π
		Y108, G145*	Hydrogen bond
P2	Side	Y202	Hydrogen bond, π - π stacking
		W144*	Hydrogen bond
P3	Edge	D103, R107	Salt bridge, hydrogen bond
		Y202*, G203*	Hydrogen bond
P4	Side	Q118	Hydrogen bond
	edge	R129	Salt bridge, hydrogen bond

* The residues whose backbone interacts with the inhibitors depicted in the table, the others are the residues whose side chain interacts with the inhibitors.

通过分析活性腔各区域性质可以发现活性腔底部的几个疏水口袋和侧面的这些电性和极性残基是潜在的重要配体结合位点. 部分结合位点的重要作用已经得到了复合物结构, 和大量的蛋白活性腔内残基突变实验以及底物肽的 Ala 替代实验的证实. 如疏水位点 P1, L1 和 P2^[2,8,9]、侧面碱性酸性残基 R146^[2,10,11] 和 E136^[9]、极性残基 Y202^[2,9] 以及 G145^[2,10,11].

2.4 对抑制剂合理设计的启发

由图 3 可见, 比较 MCSS 计算得到的低能官能团分布与 1YSW 结构中 *N*-乙酰磺酰胺类小分子抑制剂(1YSWL) 的位置发现, 苯的低能官能团(2 号: 位于 P1, 疏水作用; 5 号: 位于 L1, 疏水和阳离子- π 作用; 14 号: 位于 P2, 疏水作用; 27 号: 位于 P2, π - π 堆积作用)与 1YSWL 结构中的几个苯环基团重叠或很接近, 并与蛋白之间存在相同的作用. *N*-甲基乙酰胺的 38 号低能官能团的位置与 1YSWL 中相应的酰胺基很接近, 也与蛋白形成氢键. MCSS 计算结果与 1YSWL 重要基团位置的较好吻合说明了模拟计算结果的可靠性. MCSS 计算结果显示脂肪族疏水官能团在 P3 部位有较低能量的分布, 而在相应部位引入脂肪族链(如图 3, 前期对接研究证实 ABT737 中该链就是结合于 P3 部位^[12])的 *N*-乙酰磺酰胺类抑制剂活性显著提高^[13]. 这也进一步证实了 MCSS 计算结果能给抑制剂合理设计提供建设性意见.

根据 MCSS 计算结果, 所有疏水官能团在 P4 部位都有较低能量的分布, 如果能将抑制剂疏水骨架延伸到 P4 部位将有利于亲和力的提高. 另外和抑制剂骨架较为接近的残基 E136, Y108 附近有低能极性官能团分布, 表明在分子骨架相应部位引入类似极性基团(如羟基、氨基等)可与蛋白形成氢键从而提高亲和力. 同样, 根据 MCSS 的结果也能对其它已知结合模式的抑制剂的结构修饰有所启发.

MCSS 计算结果也可作为全新设计的基础. 文献[14]曾用手工连接 MCSS 计算得到的低能官能团成功地设计合成了一类全新结构类型的抗真菌 14 α -去甲基化酶抑制剂. 而 LUDI 等的全新设计软件^[15]为低能官能团找到合适的连接片断提供了更有效的工具. MCSS 计算结果表明, 芳香和脂肪族疏水官能团在活性腔各口袋底部有低能分布, 而极性官能团在活性腔侧面重要残基周围有低能分布, 如用合适的连接片断将它们连接起来并尽可能保持其能量最优势位置和取向, 可以为设计全新结构类型抑制剂提供参考.

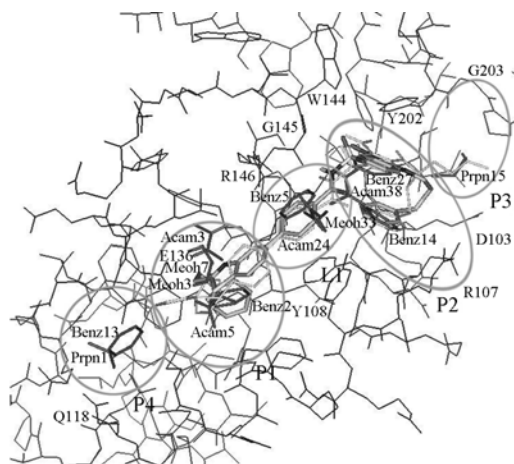


Fig. 3 Comparison between the structure 1YSW and the minima of functional groups

They are shown in sticks with the carbon atoms of 1YSWL colored dark grey, the carbon atoms of ABT737 colored grey, and the carbon atoms of the functional groups black. Benz: benzene; acam: *N*-methyl acetamide; prpn: propane; meoh: methanol.

3 结 论

本文采用活性位点搜寻工具和 MCSS 方法对抑制剂结合腔进行了计算分析, 结果表明, 抑制剂结合腔可分成 P1, L1, P2, P3 和 P4 五个区域, 其底部呈疏水性, 而 P3 部位不适合芳香性大基团的结合. 抑制剂结合腔侧面和边缘处分布有可与配体形成除疏水以外作用的多个重要残基. MCSS 计算得到的各种性质官能团在抑制剂结合腔内的能量优势位置和取向能与已知结合模式的高活性抑制剂的重要基团位置较好地吻合说明模拟计算结果的可靠性, 反过来也能为抑制剂的结构修饰和全新设计提供建设性意见.

参 考 文 献

- [1] ZHENG Can-Hui(郑灿辉), ZHU Ju(朱驹), ZHOU You-Jun(周有骏), *et al.*. Prog. Pharm. Sci. (药学进展)[J], 2004, **28**(3): 97—103
- [2] Oltersdorf T., Elmore S. W., Shoemaker A. R., *et al.*. Nature[J], 2005, **435**(7042): 677—681
- [3] Cafilisch A., Miranker A., Karplus M.. J. Med. Chem. [J], 1993, **36**(15): 2142—2167
- [4] LI Yao-Wu(李耀武), ZHOU You-Jun(周有骏), ZHU Ju(朱驹), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(11): 2084—2087
- [5] SYBYL, Computer Program, Version 6.9[CP], St. Louis, MO: Tripos Associates Inc., 1999
- [6] Insight II, Computer Program, Version 2000[CP], San Diego, CA: Accelrys Inc., 2000
- [7] Joseph-McCarthy D., Hogle J. M., Karplus M.. Proteins[J], 1997, **29**(1): 32—58
- [8] Outilie S., Diaz J. L., Horne W., *et al.*. J. Biol. Chem. [J], 1997, **272**(49): 30866—30872
- [9] ZHENG Can-Hui(郑灿辉), ZHOU You-Jun(周有骏), ZHU Ju(朱驹), *et al.*. Acad. J. Sec. Mil. Med. Univ. (第二军医大学学报)[J], 2006, **27**(10): 1085—1088
- [10] Yin X. M., Oltvai Z. N., Korsmeyer S. J.. Nature[J], 1994, **369**(6478): 321—323
- [11] Petros A. M., Olejniczak E. T., Fesik S. W.. Biochim. Biophys. Acta[J], 2004, **1644**(2/3): 83—94
- [12] ZHENG Can-Hui(郑灿辉), ZHOU You-Jun(周有骏), ZHU Ju(朱驹), *et al.*. Acta Chim. Sinica(化学学报)[J], 2006, **64**(23): 2327—2332
- [13] Wendt M. D., Shen W., Kunzer A., *et al.*. J. Med. Chem. [J], 2006, **49**(3): 1165—1181
- [14] Ji H., Zhang W., Zhang M., *et al.*. J. Med. Chem. [J], 2003, **46**(4): 474—485
- [15] Bohm H. J.. J. Comput. Aided Mol. Des. [J], 1992, **6**(1): 61—78

Property Analysis of Inhibitors-binding Site of Bcl-2 Protein

ZHENG Can-Hui, ZHOU You-Jun*, ZHU Ju, CHEN Jun, LI Yao-Wu, SHENG Chun-Quan,
SONG Yun-Long, LÜ Jia-Guo, JIANG Jun-Hang, LIU Na

(Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Bcl-2 protein is a new target of anticancer drugs with a bright prospect now. The multiple copy simultaneous search(MCSS) methodology was used to analyze the inhibitors-binding site of Bcl-2. The results show that the inhibitors-binding site can be divided into five subsites(P1, L1, P2, P3, P4), the bottom of which is hydrophobic. And several important residues which can form interactions other than hydrophobic interactions distribute on the side and edge of the inhibitors-binding site. Energetically favorable positions and orientations of various functional groups determined by MCSS computing are consistent with these of important groups in high potent inhibitors, which can reversely guide the structure modification and novel design of inhibitors effectively.

Keywords Bcl-2 protein; Multiple copy simultaneous search; Inhibitor; Rational design

(Ed.: Y, I)