

# Apicidin 选择性抑制 Class I HDACs 分子动力学研究

李晓晖<sup>1</sup>, 赵俊伟<sup>1</sup>, 滕虎<sup>1</sup>, 西野究和<sup>2</sup>, 修志龙<sup>1</sup>

(1. 大连理工大学环境与生命学院, 大连 116024; 2. 日本九州工业大学大学院生命体工学研究科, 北九州 808-0196)

**摘要** 采用模拟方法研究组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (Apicidin) 选择性抑制组蛋白去乙酰化酶 (Histone deacetylases, HDACs) 中的 HDAC1 和 HDAC8. 通过 HDAC8 晶体结构同源模建 HDAC1 三维结构模型, 将 Apicidin 分别与 HDAC1 和 HDAC8 对接并进行分子动力学模拟, 结果表明, HDAC1 活性口袋入口处的 Arg270 是 Apicidin-HDAC1 形成稳定结构的重要因素; HDAC1 中 Tyr303 及 His178 与 Apicidin 形成 2 个持续存在的氢键, 而在 HDAC8 中未发现, 这是 Apicidin 选择性抑制 HDAC1 高于 HDAC8 的另一重要原因.

**关键词** 组蛋白脱乙酰酶抑制剂; 组蛋白去乙酰化酶 (HDACs); 分子动力学; 同源模建; 分子对接

中图分类号 O641

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)02-0374-05

核小体中组蛋白 *N*-末端赖氨酸  $\epsilon$ -氨基的乙酰化状态在基因表达调控中起着关键作用<sup>[1,2]</sup>. 组蛋白乙酰化状态由两种相关酶控制: 组蛋白乙酰基转移酶 (Histone acetyltransferases, HAT) 和组蛋白去乙酰化酶 (Histone deacetylases, HDACs). HDACs 通过与转录复合物相互作用使核小体在关键位置异常产生, 影响基因表达<sup>[3]</sup>, HDACs 抑制剂 (HDACi) 可导致肿瘤细胞生长停滞、诱导肿瘤细胞分化和凋亡, 被认为是一个全新的、具有发展潜力的治疗和预防兼具的抗肿瘤药物. 目前已报道了多种不同结构类型的 HDACi, 小分子羟肟酸类 (如 SAHA, TSA)、羧酸类 (如丁酸, AN-9)、苯甲酰胺类 (如 CI-994, MS-275)、亲电子酮类 (如三氟甲基酮) 以及环肽类 (如 Azumamide<sup>[4]</sup>, FR235222<sup>[5]</sup> 和 FK-228) 等, 其中从嗜热真菌 *Fusarium pallidoroseum* 中分离出来的组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (Apicidin) 是环肽类 HDACi [cyclo(-L-Trp(OMe)-L-Ile-D-Pip-L-Aode-, 图 1], 具有高效广谱抗原虫作用, 是一种可逆抑制 HDACs 物质<sup>[6]</sup>.

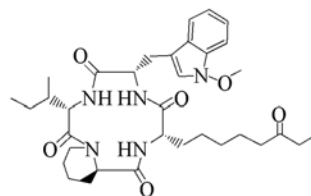


Fig. 1 Structure of apicidin

人类 HDACs 根据酵母蛋白同源性及结构功能分为四大类 18 个亚型, 每个亚型都具有独特的生物功能并分别聚集在基因特定区域, 针对 HDACs 亚型设计选择性抑制剂可治疗特定疾病, 较广谱 HDACi 的毒副作用大大降低, 这将会对临床治疗产生重要影响<sup>[7]</sup>. 实验结果表明, Apicidin 对 Class I HDACs (HDAC 1, 2, 3, 8) 具有选择性抑制作用, 其中对 HDAC1 和 HDAC8 的  $IC_{50}$  分别是 2 nmol/L 和  $>1000$  nmol/L<sup>[8]</sup>. 采用分子模拟方法研究蛋白质-配体相互作用已有报道<sup>[9]</sup>. 本文通过分子模拟方法, 研究 Apicidin 与 HDAC1 和 HDAC8 的相互作用, 从分子水平上分析了 Apicidin 具有选择性抑制活性的原因.

## 1 计算方法

目前 HDAC1 的晶体结构尚未被解析, 但 HDAC1 与 HDAC8 的序列一致性为 43%<sup>[8]</sup>, 本文以

收稿日期: 2009-03-17.

基金项目: 国家“八六三”计划项目 (批准号: 2007AA021604) 资助.

联系人简介: 修志龙, 男, 博士, 教授, 主要从事生物化工研究. E-mail: zhixiu@dlut.edu.cn

李晓晖, 女, 硕士, 副教授, 主要从事多肽药物化学研究. E-mail: lxhx@dlut.edu.cn

HDAC8 的晶体结构<sup>[8,10]</sup> (PDB code: 1T64) 为模板, 用同源建模方法建立 HDAC1 三维结构. 由 MODELLER9v4<sup>[11]</sup> 模建得到初始模型并进行能量最小化(共轭梯度法)和分子动力学模拟(模拟退火), 所得最佳模型用 PROCHECK<sup>[12]</sup>, WHATIF<sup>[13]</sup> 和 ERRAT<sup>[14]</sup> 评估其合理性.

采用 AutoDock 4.0 软件<sup>[15]</sup> 将 Apicidin 分别与 HDAC1 和 HDAC8 活性位点对接, 得到两个复合物结构. 用 GROMACS 3.3.3 程序<sup>[16]</sup> 将每个复合物分别置于平截八面体水盒子中, 并使溶质原子到盒子壁的距离为 1.0 nm, 作为分子动力学模拟的初始结构. 模拟前先对复合物进行 5000 步联合最陡下降法/共轭梯度法能量最小化, 50 ps 约束优化后, 每个体系分别在 300 K 下用 NPT 系综进行 3500 ps 的分子动力学模拟.

## 2 结果与讨论

### 2.1 HDAC1 模型合理性检验

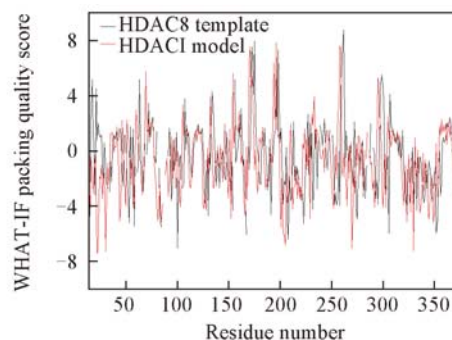
同源建模的 HDAC1 模型采用三种评估软件检验: PROCHECK 程序检验蛋白主链中 Phi/Psi 二面角分布情况(表 1), 质量好的模型应该有 90% 以上氨基酸残基落在核心区<sup>[12]</sup>, HDAC1 模型和 HDAC8 晶体结构分别有 91.4% 和 90.1% 落在核心区, HDAC8 晶体结构有 0.3% 氨基酸残基落在不允许区, 而 HDAC1 模型中的氨基酸残基全部落在允许区内; WHATIF 程序检查蛋白折叠质量, 得分在 -5.0 以上为合理结构<sup>[13]</sup>, HDAC1 模型与 HDAC8 晶体结构得分类似且基本高于 -5.0, 少量氨基酸残基低于 -5.0, 然而这种偏低情况也在模板中相应残基上出现(图 2); ERRAT 程序检查 HDAC1 中非键原子相互作用整体质量得分 73.15, 属于正常分值范围(>50)<sup>[14]</sup>. 可见, 同源建模的 HDAC1 模型合理可信.

### 2.2 HDAC1 的三维结构

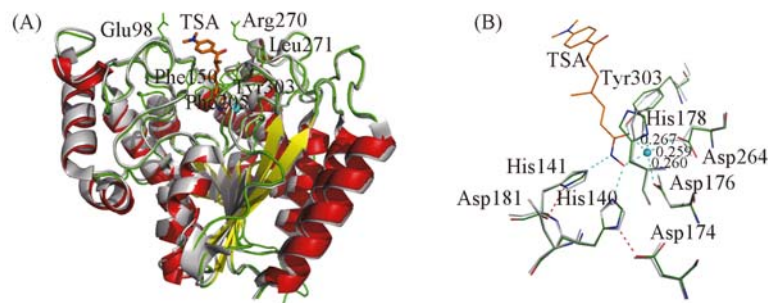
构建的 HDAC1 模型结构与 HDAC8 晶体结构类似(图 3), HDAC1 模型中心部分由 8 个  $\beta$  折叠片( $\beta$ -sheets) 并排形成平面, 平面两边由 16 个  $\alpha$  螺旋( $\alpha$ -helices) 包围, 构建的 HDAC1 模拟模型与 HDAC8 晶体结构基本叠合[图 3(A)], 二者骨架原子的均方根偏差(Root mean square deviation, RMSD) 为 0.238 nm. 抑制剂 TSA 在活性口袋部位与  $Zn^{2+}$ 、氨

**Table 1** Phi/Psi dihedral angel distribution of HDAC1 and HDAC8

Value calculated	Percentages of residues(%)	
	HDAC1 model	HDAC8 template
Core	91.4	90.1
Allowed	7.6	9.3
Generously allowed	0.9	0.3
Disallowed	0	0.3



**Fig. 2** WHAT-IF packing quality scores calculated for the HDAC8 template and HDAC1 model



**Fig. 3** Superimposition of HDAC1 model (red: helices, yellow: sheets, green: loops) and HDAC8 X-ray structure (grey: cartoon) with the co-crystallized inhibitor TSA (orange sticks) (A), zinc geometry at the active site of HDAC1 (green) with HDAC8 counterpart (grey) (B)

The cyan dashed lines represent hydrogen bonds while the red ones represent the two Asp-His charge relay systems in HDAC1.

基酸残基发生作用. 在 HDAC1 与 HDAC8 活性口袋入口处主要有 2 个氨基酸不同, HDAC1 的 Glu98 和 Arg270 取代了 HDAC8 中的 Tyr100 和 Met274, Glu98 取代 Tyr100 使活性口袋入口处更开阔, 这表明有较大帽子基团的抑制剂(如环肽类 HDACi)更容易进入活性口袋. HDAC1 模型中活性口袋由 Phe150, Phe205, Asp181, Gly149, Leu271 和 Tyr303 组成, 除 Leu271 代替了 HDAC8 中 Met274 外, 其余氨基酸残基均一致. HDAC1 活性口袋底部与 HDAC8 相同也有 2 个 Asp-His 电荷传递系统, 分别是 His140-Asp174 和 His141-Asp181. HDAC1 模型在  $Zn^{2+}$  催化位点有合理的几何结构[图 3(B)], 其中  $Zn^{2+} \cdots Asp176(O\delta1)$ ,  $Zn^{2+} \cdots Asp264(O\delta1)$  和  $Zn^{2+} \cdots His178(N\epsilon2)$  的距离分别为 0.260, 0.259 和 0.267 nm, 对应 HDAC8 中的距离分别为 0.197, 0.194 和 0.215 nm.

### 2.3 Apicidin 选择性抑制活性分析

利用 AutoDock 4.0 软件将 Apicidin 分别与 HDAC1 和 HDAC8 进行分子对接, 分析 Apicidin 选择性抑制活性. 在对接结果中选取能量最低构象作为 Apicidin-HDAC1 和 Apicidin-HDAC8 复合物结合模型, 对 2 个复合物进行 3500 ps 的分子动力学模拟, 为考察分子动力学模拟轨迹的稳定性和是否达到收敛, 在模拟过程中, 对体系的能量和结构变化进行分析, 结果表明, 较小的 RMSD 变化和能量、压力以及温度达到收敛, 表明分子动力学模拟正常. 体系的势能随时间波动很小, 总趋势守恒. 图 4 中分别表示复合物体系主链骨架 [ $C_{\alpha}$ , N, C 原子, 图 4(A)] 和 Apicidin[图 4(B)] 的 RMSD 值在动力学模拟中的

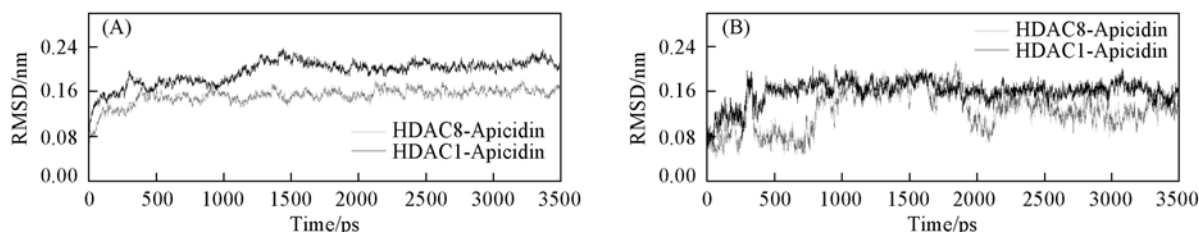


Fig. 4 RMSD of the C, N,  $C_{\alpha}$  atoms of the systems(A) and apicidin(B) with respect to the starting structure as a function of time

变化情况, 表明在 2200 ps 后两个复合物体系主链骨架原子和 Apicidin 结构均达到稳定. RMSD 计算采用复合物能量最小化后的结构为参考结构. 环肽类抑制剂 Apicidin 的 RMSD 随时间变化情况表明: Apicidin 在与 HDAC1 复合物中模拟 1200 ps 后就达到稳定状态, 而 HDAC8 2200 ps 后才达到稳定. 选取 2200 ps 后的稳定区域作为分析对象, 计算 RMSD 平均值, Apicidin 在 HDAC1 和 HDAC8 中的 RMSD 平均值相近分别为 0.1885 和 0.1678 nm, 但标准偏差(Standard deviation, SD)相差较大, 分别为 0.0091 和 0.0136 nm. 在 Yan 等<sup>[17]</sup>研究小分子 HDACi 对 HDACs 类似蛋白(HDLP)作用中发现, 抑制活性较低的小分子 HDACi 的 SD 差异显著, SD 值小意味着结构稳定性强, 这与 Apicidin 对 HDAC1 抑制活性高于 HDAC8 的实验结果一致. 在 HDAC1 和 HDAC8 活性位点的  $Zn^{2+}$  与 Apicidin 的 Aode 侧链羰基氧的距离非常稳定, 都在 0.19 nm 左右(图 5), 即形成了稳定配位键, 使得 Apicidin 能够准确定位于活性口袋并发挥其抑制活性. 在对 2 个复合物体系骨架原子  $C_{\alpha}$ , C 和 N 的均方根波动(Root mean squared fluctuation, RMSF)随氨基酸残基变化模拟中(图 6), HDAC1 活性口袋底部  $Zn^{2+}$  附近 His140, Asp174, His141, Asp181, His178 和 Tyr303 的 RMSF 值以及 HDAC8 中对应位置残基的 RMSF 均比较小, 表明两个酶在催化中心处的氨基酸残基稳定性相当且都非常稳定, 这进一步表明 Apicidin 的 Aode 侧链羰基氧能够分别与两个酶的催化位点稳定结合. 而活性口袋入口处的整体稳定性 Apicidin-HDAC1 好于 Apicidin-HDAC8. 在活性口袋中, Phe150 附近 HDAC1 的柔性高于 HDAC8, 而在 Phe205 附近 HDAC8 的柔性略高于 HDAC1, 这两个 Phe 构成活性口袋最窄部分, 其柔性可以使具有更大基团的 HDACi(如 TSA 中 4-甲基)与活性口袋形成更

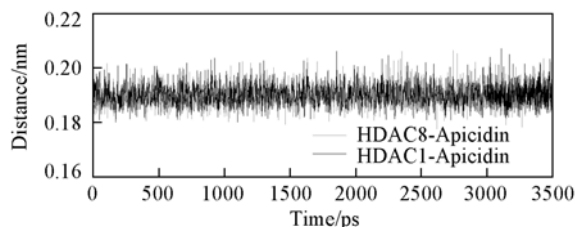


Fig. 5 Distance fluctuations for the Aode side chain of apicidin with HDAC1 and HDAC8 during the molecular simulation

适合的相互作用, Yan 等<sup>[17]</sup>和 Rdoriquuez 等<sup>[5]</sup>的工作也都证实了这一点. HDAC1 和 HDAC8 活性口袋入口处两个不同的氨基酸在图 6 中的 RMSF 值表明, HDAC1 中 Glu98 残基附近的稳定性略差于 HDAC8, 且二者的 RMSF 都偏高; HDAC1 中 Arg270 处的稳定性显著高于 HDAC8 的, 这表明 HDAC1-apicidin 复合物结合得更紧密, 抑制剂对酶的抑制活性较高, 因此, 在酶活性口袋入口处, Arg270 是 Apicidin 抑制 HDAC1 活性高于 HDAC8 的重要残基.

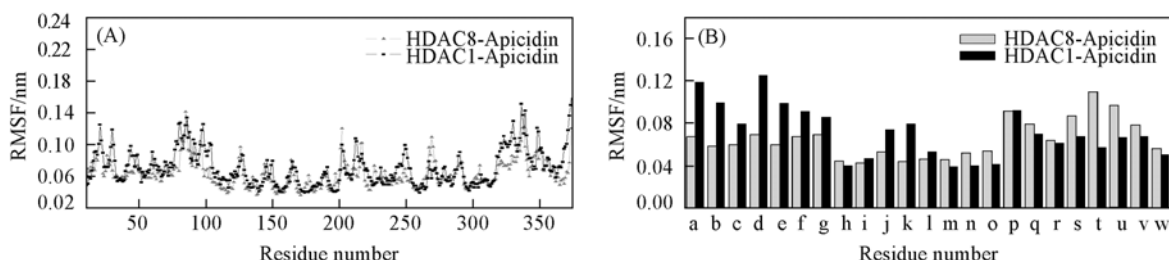


Fig. 6 Average RMSF for amino acid residues of complexes during the last 800 ps

(A) All residues; (B) residues in the active pocket (around  $Zn^{2+}$  demarcated by asterisk). a. Met30; b. Lys31; c. pro32; d. Glu98; e. Asp99; f. Gys100; g. Pro101; h. His140; i. His141; j. Gly149; k. Phe150; l. Cys151; m. Acp174; n. His178; o. Asp181; p. Glu203; q. Tyr204; r. Phe205; s. Gly268; t. Asp269; u. Arg270; v. Leu271; w. Tyr303.

两个复合物体系 3500 ps 模拟时间内的氢键存在情况如图 7 所示, 根据氢键形成标准: 氢受体-氢供体-氢原子组成的角度小于  $60^\circ$ , 并且受体和供体之间距离小于 0.35 nm. 在模拟过程中, 尤其是体系达到平衡的 2200 ps 之后, Apicidin 与 HDAC1 形成了两个持续存在的氢键, 分别是 Apicidin 中 Aode 侧链羰基氧和 Tyr303 侧链羟基之间 (供体: Tyr303 OH, 氢原子: Tyr303 HH, 受体: Aode 侧链 O=C) [图 7(A), 0 号氢键], Apicidin 中 Aode 羰基氧和 His178 咪唑氨基之间 (供体: His178 N $\epsilon$ 2, 氢原子: His178 H $\epsilon$ 2, 受体: Aode O=C) [图 7(A), 11 号氢键], 而在 Apicidin 和 HDAC8 的分子动力学模拟中未发现持续存在的氢键. 因此, Apicidin-HDAC1 复合物的结合更加稳定, 与 Apicidin 对 HDAC1 的抑制活性 ( $IC_{50} = 2$  nmol/L) 高于 HDAC8 ( $IC_{50} > 1000$  nmol/L) 实验结果一致.

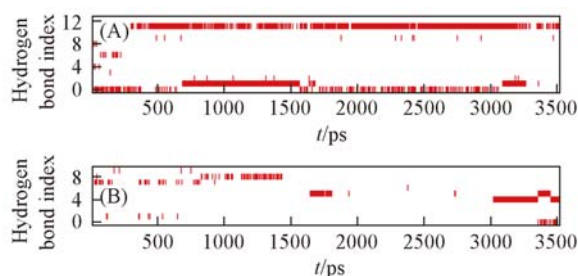


Fig. 7 Hydrogen bond existence maps during the 3500 ps molecular dynamics simulation of apicidin-HDAC1 (A) and apicidin-HDAC8 (B)

Shadow zone represents that the location of donor, receptor and hydrogen atom is suitable for the hydrogen bond while white zone represents unsuitable.

### 3 结 论

采用同源建模、分子对接和分子动力学模拟方法研究了环肽类 HDACi Apicidin 与 HDACs 的相互作用, 在分子水平上探讨 Apicidin 选择性抑制 HDAC1 和 HDAC8 的原因. HDAC1 活性口袋入口处 Arg270 的稳定性及 Aode 侧链羰基氧和 Tyr303 侧链羟基之间、Aode 羰基氧和 His178 咪唑氨基之间的两个持续氢键是 Apicidin 对 HDAC1 抑制活性高于 HDAC8 的重要原因. 应用计算机分子对接模拟不仅可以探讨抑制剂与酶之间的作用方式, 还可以合理地指导设计 HDACi 分子, 改进 HDACi 结构优化效率, 加快和提高多肽类 HDACi 化学合成研究进程和水平, 为新型多肽类 HDACi 的研究开发提供新思路和新策略.

### 参 考 文 献

- [1] Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., *et al.*. Nature[J], 1997, **389**: 251—260
- [2] Pennisi E.. Science[J], 1997, **275**: 155—157
- [3] Ng H. H., Bird A.. Trends. Biochem. Sci. [J], 2000, **25**: 121—126
- [4] Maulucci N., Chini M. G., Micco S. D., *et al.*. J. Am. Chem. Soc. [J], 2007, **129**: 3007—3012
- [5] Rodriquez M., Terracciano S., Cini E., *et al.*. Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2006, **45**: 423—427

- [ 6 ] Darkin-Rattray S. J. , Gurnett A. M. , Myers R. W. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J] , 1996 , **93** : 13143—13147
- [ 7 ] Paris M. , Porcelloni M. , Binaschi M. , *et al.* . J. Med. Chem. [J] , 2008 , **51** : 1505—1529
- [ 8 ] Vannini A. , Volpari C. , Filocamo G. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J] , 2004 , **101** : 15064—15069
- [ 9 ] CHU Hui-Ying(楚慧郢) , ZHENG Qing-Chuan(郑清川) , ZHAO Yong-Shan(赵勇山) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2008 , **29**(12) : 2398—2402
- [ 10 ] Somoza J. R. , Skene R. J. , Katz B. A. , *et al.* . Structure[J] , 2004 , **12** : 1325—1334
- [ 11 ] Fiser A. , Sali A. . Methods Enzymol. [J] , 2003 , **374** : 461—491
- [ 12 ] Laskowski R. A. , Moss D. S. , Thornton J. M. . J. Mol. Biol. [J] , 1993 , **231** : 1049—1067
- [ 13 ] Vriend G. , Sander C. . J. Appl. Cryst. [J] , 1993 , **26** : 47—60
- [ 14 ] Colovos C. , Yeates T. O. . Protein Sci. [J] , 1993 , **2** : 1511—1519
- [ 15 ] Huey R. , Morris G. M. , Olson A. J. , *et al.* . J. Comput. Chem. [J] , 2007 , **28** : 1145—1152
- [ 16 ] van der Spoel D. , Lindahl E. , Hess B. , *et al.* . J. Comput. Chem. [J] , 2005 , **26** : 1701—1719
- [ 17 ] Yan C. L. , Xiu Z. L. , Li X. H. , *et al.* . Proteins[J] , 2008 , **73** : 134—149

## Selective Inhibition Study of Apicidin Towards Class I HDACs by Molecular Dynamics Simulation

LI Xiao-Hui<sup>1\*</sup> , ZHAO Jun-Wei<sup>1</sup> , TENG Hu<sup>1</sup> , NISHINO Norikazu<sup>2</sup> , XIU Zhi-Long<sup>1\*</sup>

(1. *School of Environment and Biological Science and Technology,*

*Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;*

2. *Graduate School of Life Science and Systems Engineering,*

*Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu 808-0196, Japan)*

**Abstract** The selective inhibitory activity of cyclic tetrapeptides apicidin towards class I histone deacetylases (HDACs) was studied by molecular dynamics simulation. The 3D structure of HDAC1 was constructed by homology modeling using the X-ray structure of HDAC8 as template. Furthermore, the 3500 ps molecular dynamics simulations were performed on both apicidin-HDAC1 and apicidin-HDAC8 complexes, which were obtained by molecular docking. As a result, the Arg270 locating at the entrance of the HDAC1 active pocket played a crucial role in forming stable interactions with apicidin. There were two lasting hydrogen bonds between apicidin and HDAC1 during the molecular dynamics simulation, while none between apicidin and HDAC8. This difference could be another important reason for the high inhibitory activity of apicidin to HDAC1.

**Keywords** Apicidin; Histone deacetylase; Molecular dynamics; Homology modeling; Molecular docking

(Ed. : Y, I)