

Hydroxamate 类抑制剂与 MMP-2 的分子对接研究

侯廷军 章 威 徐筱杰*

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘要 通过分子动力学模拟研究了 MMP-2 和 hydroxamate 抑制剂之间的作用模式. 在分子动力学模拟中, 对于催化区的锌离子和其共价结合的配体(包括抑制剂和组氨酸)采用了键合的模型. 从模拟的结果可以看到, R¹ 取代基和 MMP-2 的 S1 疏水口袋中的部分残基能形成很好的几何匹配, 从而可以产生很强的范德华和疏水相互作用. 模拟结果也表明, 两个抑制剂和 MMP-2 之间分别能形成 5 个和 8 个氢键, 抑制剂 B 比 A 活性更高的原因就是能够形成更加有利的氢键作用模式. 在整个模拟过程中, 催化锌都能保持好的五配位形式, 配位键的长度也处于稳定的状态. 预测得到的 MMP-2 和其抑制剂的相互作用模式对于全新抑制剂的设计提供了非常重要的结构信息.

关键词 gelatinase-A, MMP-2, 分子动力学, 分子对接, hydroxamate 抑制剂

Molecular Docking Simulations between Hydroxamates and MMP-2

HOU Ting-Jun ZHANG Wei XU Xiao-Jie*

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract The binding mode of MMP-2 with hydroxamate inhibitors was studied by using molecular dynamics (MD) simulations. In MD simulations, a bonded model for the catalytic zinc center was used to represent the bonded interactions between zinc center and enzyme/inhibitor. From the simulated results, it can be seen that the substituent on R¹ site will form good steric complementarity with the S1 hydrophobic pocket of MMP-2; consequently, produce strong van der Waals contacts and hydrophobic interactions. Moreover, the hydrogen bonds between receptor and ligand was critical for ligand binding, and two inhibitor can form 5 and 8 hydrogen bonds with MMP-2, respectively. The stronger binding affinity of B than A may be derived from the more favorable hydrogen-bonding interactions. In MD simulations, the coordination of the inhibitor's hydroxamate group to the catalytic zinc atom was maintained very well for the entire simulation time. The predicted complex structure of MMP-2 with hydroxamates will be very important for us to take into insight the potential mechanisms of the intermolecular interactions between inhibitor and receptor, especially with respect to the design of new compounds.

Keywords gelatinase-A, MMP-2, molecular dynamics, molecular docking, hydroxamate inhibitor

Matrix metalloproteinases (MMPs) 是一类含 Zn 的金属蛋白酶, 主要参与结缔组织的降解^[1]. 到目前为

止, 已经发现的 MMPs 家族的成员超过了二十种, 其中包括三种胶原蛋白酶 (collagenase), MMP-1, MMP

* E-mail: xiaojie@chemms.chem.pku.edu.cn

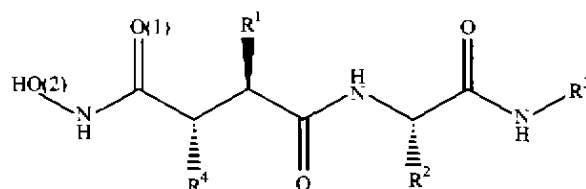
收稿日期: 2000-10-23, 修回日期: 2000-12-30, 定稿日期: 2001-03-06, 国家自然科学基金 (29873003) 资助项目

(Received October 23, 2000; Revised December 30, 2000; Accepted March 6, 2001)

-8 和 MMP-13; 两种白明胶酶 (gelatinase), MMP-2 和 MMP-9; 三种基质蛋白酶 (stromelysin), MMP-3, MMP-10 和 MMP-11. 除了这三个大类之外, 还有能降解非纤维蛋白的 matrilysin (MMP-7) 和 macrophage metalloelastase (MMP-12). 最近, MMPs 家族又增添了一个分支, 就是 Membrane Type MMPs (MT-MMPs), 目前包括四个成员, 从 MMP-14 到 MMP-17. MMPs 家族成员的催化区都包含两个锌离子, 一个起催化作用, 而另一个则起稳定结构的作用. 起催化作用的锌离子和周围三个组氨酸上的 N 原子形成配位键, 三个组氨酸包含在形如—VAA-HEXGHXXGXXH—的一段保守序列中. 除了 MMP-7 和 MMP-23 之外, 其他 MMP 在碳端都包含一个和 hemopexin 结构近似的结构保守区. 这个区域对 MMP 和其机体抑制剂 (tissue inhibitor) 的相互结合起了重要的作用.

在 MMPs 家族中, gelatinase 被认为是一个非常重要的药物设计靶点. gelatinase 可以通过分裂由第四类胶原蛋白组成的白血管基底膜来阻止肿瘤的生长和扩散, 因此 gelatinase 抑制剂的研究对于寻找新的抗癌药物具有非常重要的意义^[2-4]. gelatinase-A (MMP-2) 晶体结构的获得^[5], 使得我们能够从分子水平上研究此类酶抑制剂与酶活性中心的作用机

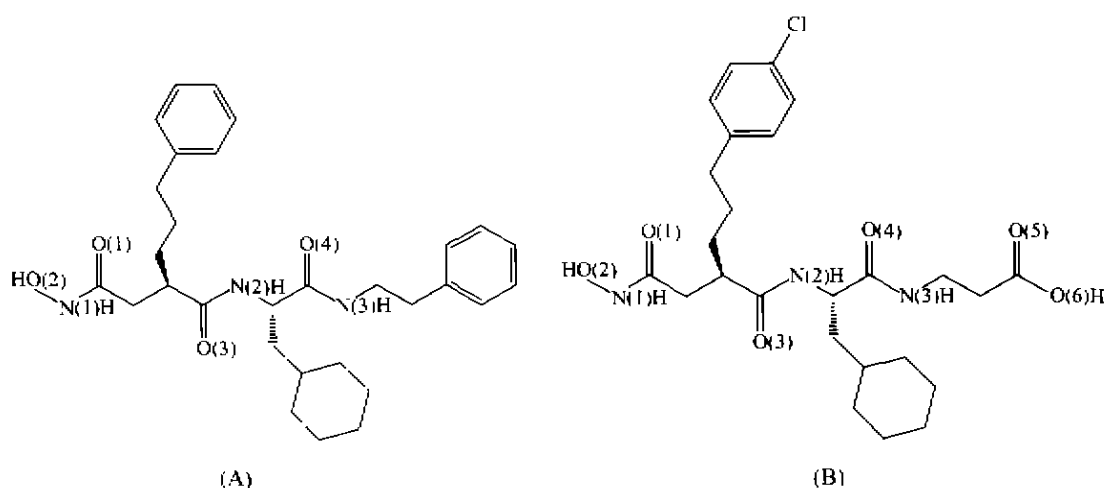
制, 为 gelatinase-A 抑制剂的设计提供一些重要的结构信息.



图式 1 MMPs 类抑制剂的特征结构

Scheme 1 The structural characteristics of MMPs inhibitors

根据 MMP 受体的特征, 人们设计了许多肽类和非肽类抑制剂, 大致结构如图式 1 所示 (以 hydroxamate 类抑制剂为例), 其中 O(1) 和 O(2) 和催化锌离子发生螯合. R^1 是抑制剂与 S1 疏水口袋相互作用的部分, 与抑制剂的活性密切相关. R^2 是暴露在水中的部分, 对抑制剂活性没有明显的影响, 但会影响药物的口服性. R^3 和 R^4 对活性也有一定的影响, 具体机理还不很清楚. 在研究中, 我们选取了两个 hydroxamate 类的抑制剂^[6], 这两个化合物对 MMP-2 都有较好的抑制活性, 分子结构如图式 2 所示, 抑制剂的结合自由能见表 2.



图式 2 两个 hydroxamate 抑制剂的二维结构

Scheme 2 The 2D structures of two hydroxamate inhibitors

1 计算方法

1.1 模型搭建

MMP-2 的晶体结构直接取自蛋白质结构数据

库 (PDB), PDB 编号为 1QIB. 和其它 MMPs 相似, MMP-2 的催化区结构也包括 5 个筒状的 β 折叠, 其中 4 个平行, 1 个为反平行, 还有 3 个很长的 α 螺旋, MMP-2 的催化区结构没有因为柔性 loop 区

(FLD)的插入而发生大的变化. 因为还没有获得 MMP-2 和其抑制剂相互作用的复合物结构, 因此我们首先应该搭建出分子动力学模拟的复合物的初始模型. MMPs 家族的成员在结构上非常保守, 而且受体和底物之间的作用模式非常相似. 可以通过 MMPs 家族其它成员复合物的晶体结构来搭建模拟的初始结构. 我们选取了 MMP-3 和 hydroxamate 抑制剂复合物的晶体结构作为参考结构 (PDB 编号: 1BIW)^[7]. 整个搭建过程分为三个步骤: 首先, 把 1QIB 和 1BIW 进行结构比对 (structural alignment); 把 hydroxamate 抑制剂从 1BIW 中取出, 放入 1QIB 中得到复合物结构; 把搭建得到的复合物模型进行人工调整以避免明显的原子碰撞, 仅调整活性位点附近部分残基的两面角.

1.2 分子力场

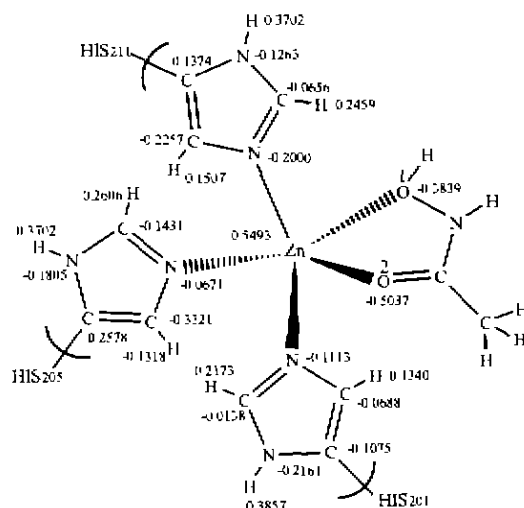
在模拟中, 对催化锌采用了五配位的键合模型. 与锌原子有关的键伸缩以及键角弯折的参数来自于文献[8]. 和 Hoop 等的处理方法相同, 所有与锌原子有关的两面角均设置为 0°. 和抑制剂中 N—O 基团有关的力场参数来自于 Taba 等的计算结果^[9]. 其它的力场参数均来自 AMBER 力场^[10]. 表 1 列出了与锌原子和 N—O 基团有关的力场参数.

表 1 催化锌和抑制剂上 hydroxamate 基团的力场参数
Table 1 The force field parameters for the catalytic zinc ions and some groups associated with hydroxamates

键参数	$K_r/(\text{kJ} \cdot \text{nm}^2)$	$R_{eq}/(\times 10^{-1} \text{nm})$	
Zn—NB	1 672	0.205	
Zn—OH	1 672	0.220	
Zn—O	1 672	0.205	
N—O	22 530	0.137	
键角参数	$K_\theta/(\text{kJ} \cdot \text{rad}^{-2})$	$\theta_{eq}/(^{\circ})$	
NB—Zn—NB	83.6	105.0	
NB—Zn—O	83.6	115.0	
CR—Zn—NB	83.6	126.0	
N—OH—HO	349.4	105.6	
OH—N—C	574.3	116.1	
H—N—OH	396.3	109.1	
两面角参数	$\nu/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\gamma/(^{\circ})$	n
HO—OH—N—C	25.1	180	1

对于结构锌原子, 考虑到它不直接影响底物和受体之间的结合, 计算则采用了非键模型, 部分电荷

即为形式电荷 (2|e|). 而对于催化锌原子, 由于采用了键合模型, 除了需要考虑键、键角和两面角参数外, 还需要得到正确的电荷分布. 一般来讲, 当抑制剂和受体结合时, 其电荷的分布和在溶液中自由状态的电荷分布肯定有明显的区别. 对本文研究的体系而言, 结合和非结合时, 由于发生电子的转移, 和锌原子螯合的两个 O 原子上的电荷会有很大的差别. 由于本文研究的体系还没有复合物结构, 因此还很难考察环境对抑制剂电荷的影响. 因此, 在本文中, 为了解决这个问题, 我们采用了两步的静电势 (ESP) 拟合来得到催化锌和其配体的部分电荷. 在第一步中, 我们计算锌原子, 三个组氨酸, 以及抑制剂上的两个螯合氧原子上的部分电荷. 图 3 是一个抑制剂和 MMP-2 结合的简化的理论模型, 这个模型仅仅包括催化锌, 三个组氨酸和抑制剂. $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{NHOH}$ 作为简化的抑制剂模型. 先采用半经验量化方法 AM1 来优化这个理论模型^[11], 然后用 Gaussian 98 中的 Hartree-Fock 方法来得到模型周围静电势分布, 计算采用 6-31* 基组^[12]. 最后采用约束静电势收敛方法 (Restrained Electrostatic Potential, RESP) 来得到模型的部分电荷分布^[13], 静电势拟合采用了 AMBER 6.0 模拟软件包中的 RESP 程序, 部分电荷如图式 3 所示. 在第二步中, 我们计算抑制剂上的部分电荷, 计算步骤和第一步中的相同, 但在这步计算中, 我们约束抑制剂上和锌原子螯合的两个 O 原子上的部分电荷, 这两个 O 原子上的部分电荷采用第一步中得到的数值.



图式 3 活性位点模型以及计算得到的静电势收敛电荷
Scheme 3 The partial charges for the active site model from the RESP fitting calculations

1.3 分子动力学模拟

所有分子动力学模拟均采用 AMBER 6.0 软件包.增加的力场参数以及得到的部分电荷均加入 AMBER 力场文件和数据库文件中.模拟温度为 300 K,溶剂采用 TIP3P 水模型.对于两个模拟体系,均在抑制剂周围加上 2 nm 的水分子层.在分子动力学模拟之前,对模型进行一系列的约束分子力学优化,对模型中的重原子分别采用 41.8, 4.18 和 0.42 kJ/(mol·nm)⁻²的谐振子回复力.然后,在没有约束条件下进行分子力学优化,最大优化步数为 20 000 步,收敛条件为能量梯度小于 0.21 kJ/(mol·nm)⁻¹.

分子动力学模拟分为两步.首先,进行 50 ps 的分子动力学模拟使得体系达到平衡.接着,进行 100 ps 的分子动力学模拟进行数据的收集.在数据收集时,每隔 200 fs 记录一次模拟体系的构象.在分子动力学模拟时,抑制剂、水分子以及抑制剂周围 1.6 nm 之内的残基没有任何约束,而其它的残基的重原子则外加一个 20.9 kJ/(mol·nm)⁻²的谐振子回复力.模拟中,采用 Shake 方法来约束体系中与氢原子有关的键伸缩.分子动力学模拟的步长为 1.5 fs,范德华相互作用的截断值(cutoff)设为 1.2 nm,而静电相互作用则采用 Ewald 加和法来处理.

2 结果与讨论

表 2 列出来从分子动力学得到的底物和环境(包括受体和溶剂)之间的平均相互作用能.从表中的数值可以看到,抑制剂 B 与环境的相互作用能明显低于抑制剂 A 与环境的相互作用能,这也可以在一定程度上解释了为什么抑制剂 B 比 A 的有更低结合自由能.当然非键相互作用能结合自由能有很大的区别,因为自由能中还包括其它的因素,比如去溶剂化能和熵效应等等.考虑到研究的化合物具有相似的结构,因此它们也可能具有相似的去溶剂化能和熵效应.非键相互作用可以在一定程度上反映受体和底物之间结合程度的强弱.

抑制剂和催化锌之间的配位对于抑制剂的活性起着非常重要的作用.表 3 中显示了催化锌和配体之间配位键的平均长度和标准偏差.表 3 中列出的配位键平均键长的标准偏差清楚地表明,在整个模拟过程中抑制剂和锌原子形成的配键都保持一种很稳定的状态.从已有的 MMPs 家族的复合物晶体结构可以知道,hydroxamate 抑制剂和锌原子形成的配键长度一般在 0.19 ~ 0.23 nm 之间,计算得到的数值基本处于这个范围.而且,在模拟过程中,催化锌原子都能保持一种较好的五配位形式.

表 2 抑制剂的结合自由能以及抑制剂的和环境之间的非键相互作用能

Table 2 The experimental binding affinities of inhibitors and the nonbonded between interactions inhibitors and their environments

No	$\Delta G_{\text{exp}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{total}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{vdw}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{elec}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{coul}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
A	-58.2	-437.0	-338.6	-219.4	121.0
B	-62.7	-505.7	-307.5	-283.2	84.9

表 3 锌原子和配体之间配位键的平均长度(nm)

Table 3 The average length of the coordinate bonds between zinc and ligands (nm)

	O ^c	O(1) ^c	NE2 HIS 201	NE2 HIS 205	NE2 HIS 211
A1	0.2041 (0.0083)	0.2308 (0.0080)	0.1967 (0.0083)	0.2176 (0.0081)	0.1969 (0.0083)
A2	0.2087 (0.0084)	0.2281 (0.0085)	0.2025 (0.0087)	0.2203 (0.0084)	0.2014 (0.0085)

2.1 R1 和受体间的相互作用

对于在 MMPs 家族的成员, S1 口袋是一个非常重要的结合位点,不同 MMP 的 S1 口袋处的残基也不同,根据已有的 X 射线衍射得到的晶体数据和同源性分析,可以根据 S1 口袋的深度把 MMP 分为两类.大多数的 MMP 由一个较深的 S1 口袋,例如 MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-8, MMP-13 等.但是有三个特殊的 MMPs (MMP-1, MMP-7, MMP-11),

它们的 S1 口袋较浅.图 1 显示从分子动力学得到的两个抑制剂和受体结合的平均构象,从这个图中可以看到,对于这两个抑制剂,受体上有四个残基能够与 a1 取代位置上的基团产生较好的几何匹配.这四个残基包括 Leu197, Val198, Leu218 和 Tyr223.在这四个疏水性残基中, Leu197, Val198 和 Leu218 具有较强的疏水性,它们能够和抑制剂形成较强的范德华和疏水性相互作用.而 Tyr223 能够和底物形成较强的

范德华相互作用. 在整个模拟过程中, Tyr223 上的苯环所在的平面和抑制剂上的苯环所在的平面的夹角在 $30^\circ \sim 50^\circ$ 之间, 而且两个苯环的质心距离在 $0.4 \sim 0.6$ nm 之间, 两个苯环之间可以形成较强的 π 堆积.

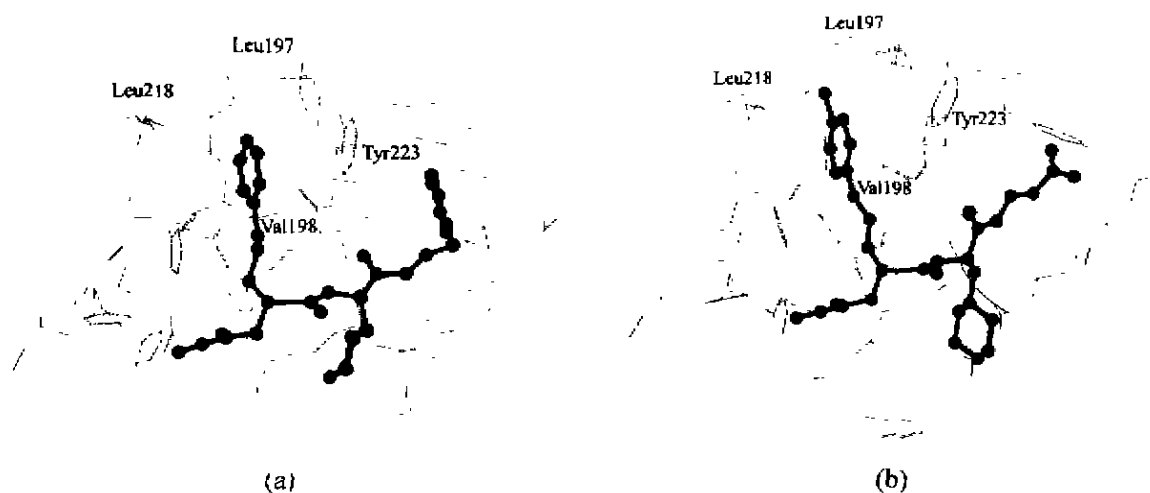


图1 从分子动力学模拟轨迹文件得到的复合物的平均构象
(a)抑制剂 A 和 MMP-2 的结合构象; (b)抑制剂 B 和 MMP-2 的结合构象(抑制剂在图中以球棍模型表示)

Fig. 1 The complexed structures from the averaged MD trajectories

(a) the complexed structure of inhibitor A and MMP-2; (b) the complexed structure of inhibitor B and MMP-2
(inhibitors are indicated by using stick-and-ball model)

2.2 底物和受体间的氢键相互作用

分子动力学的计算结果还表明, 这两个抑制剂都能和受体形成若干氢键, 而且这些氢键在整个分子动力学模拟过程中都能够很好地保持, 这些氢键的形成会直接影响底物与受体之间的结合. 表 4 列出这些氢键的平均长度以及标准偏差. 从表中可以看到, 抑制剂 A 和 MMP-2 之间一共形成了 5 个氢键, 涉及的残基包括 Gly162, Leu164, Glu202, Pro221 和 Tyr223. 而抑制剂 B 除了能够和 MMP-2 形成这五个氢键以外, 还能和 Glu202, Gly162 和 Asp161 形成另外三个氢键. 这些氢键的引入可以大大降低抑

制剂 B 和受体间的相互作用能, 从表 2 列出来底物和受体间的相互作用能可以清楚地看到, 抑制剂 B 和 MMP-2 间的静电相互作用 (-283.2 kJ/mol) 要明显低于抑制剂 A 和 MMP-2 之间的静电相互作用 (-219.4 kJ/mol). 这可能就是抑制剂 B 比抑制剂 A 具有更低自由能的主要原因. 在图 2 所示结构的 R^3 位置引入 $(CH_2)_2CO_2$ 基团以后, 其羧基上的 O 原子能够和 Asp161 上的 OD1 原子和 Gly162 上的 N 原子形成氢键, 这两个氢键的形成能够增强底物和受体之间的结合.

表 4 底物和受体间氢键的平均长度 (nm)

Table 4 The distance of hydrogen-bonds between inhibitors and protein (nm)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Inhibitor	O(1)	N(1)	N(1)	N(2)	O(3)	N(1)	O(5)	O(5)
Protein	O	O(2)	OE2	O	N	OE1	N	OD1
	GLY 162	LEU 164	GLU 202	PRO 221	TYR 223	GLU 202	GLY 162	ASP 161
A	0.3030 (0.0186)	0.3758 (0.0226)	0.2819 (0.0279)	0.3391 (0.0276)	0.2886 (0.0276)			
B	0.2812 (0.0138)	0.2838 (0.0102)	0.2825 (0.0134)	0.2894 (0.0119)	0.2987 (0.0174)	0.3466 (0.0234)	0.3619 (0.0559)	0.2952 (0.0341)

References

- 1 Birkedal - Hansen, H.; Moore, W. G. I.; Bodden, M. K.; Windsor, L. J.; Birkedal - Hansen, B.; DeCarlo, A.; Engler, J. A. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **1993**, *4*, 197.
- 2 Liotta, L. A.; Steeg, P. S.; Stetler - Stevenson, W. G. *Cell*, **1991**, *64*, 327.
- 3 Stetler - Stevenson, W. G.; Aznavoorian, S.; Liotta, L. A. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **1993**, *9*, 541.
- 4 Beckett, R. P.; Davidson, A. H.; Drummond, A. H. *Drug Discov. Today*, **1996**, *1*, 16.
- 5 Morgunova, E.; Tuuttila, A.; Bergmann, U.; Isupov, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Tryggyvason, K. *Science*, **1999**, 284, 1667.
- 6 Potter, J. R.; Beeley, N. R. A.; Boyce, B. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 2741.
- 7 Natchus, M. G.; Cheng, M. Y.; Wahl, C. I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 2077.
- 8 Hoops, S. C.; Anderson, K. W.; Merz, Jr., K. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 8262.
- 9 Taba, S.; Damodaran, K. V.; Merz, Jr., K. M. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 1225.
- 10 Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5179.
- 11 *MOPAC 7.0 User Guide*, Quantum Chemistry Program Exchange (QCPE), Indiana University, USA, **1993**.
- 12 *Gaussian 98 User Guide*, Gaussian, Inc., Pittsburgh, USA, **1998**.
- 13 Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 10269.

(Ed. SHEN Hong)

(DONG Hua - Zhen)