

基质金属蛋白酶 S₁' 结合袋的分子动力学模拟

涂国刚, 王嘉琦, 熊胜涛, 匡滨海, 李少华*

(南昌大学药学院药物化学教研室, 南昌 330006)

摘要 研究基质金属蛋白酶(MMPs)的 S₁' 结合袋的分子动力学特点, 并从分子水平上研究其对于设计特异性抑制剂的結構特点。对去除抑制剂后的 MMP-7、MMP-2 和 MMP-3 原酶进行长时间分子动力学模拟。结果显示, MMP-7 和 MMP-2 的 S₁' 结合袋处于关闭状态, 而 MMP-3 的 S₁' 结合袋处于半关闭状态, 说明 S₁' 结合袋环区的柔性在结合抑制剂时发挥了重要作用。

关键词 基质金属蛋白酶; 分子动力学; S₁' 结合袋

中图分类号 O641 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)03-0219-04

Molecular dynamics simulation of matrix metalloproteinases S₁' binding pocket

TU Guogang, WANG Jiaqi, XIONG Shengtao, KUANG Binhai, LI Shaohua*

Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmaceutical Science, Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract To study the dynamic behavior of matrix metalloproteinases (MMPs) S₁' binding pocket, and the structural properties relevant for the design of specific inhibitors at the molecular level, long-time molecular dynamics simulation of *apo* proteases of MMP-7, MMP-2 and MMP-3 were performed. It was found that the S₁' binding pocket of MMP-7 and MMP-2 was closed, while S₁' binding pocket of MMP-3 was semi-closed. Thus, the flexibility of S₁' binding pocket loop region may play an important role in binding inhibitors.

Key words matrix metalloproteinase; molecular dynamics; S₁' binding pocket

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81160383); and Key Technology R&D Program of Jiangxi Province (No. 2010BSA18500)

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类锌离子和钙离子依赖的内肽酶,介导细胞外基质(ECM)的降解和组织重塑,还参与许多正常的生理过程,如排卵、胚胎发育、血管生成、创伤愈合等^[1]。但上调的MMPs参与了许多病理过程,如关节炎、肿瘤、多发性硬化症、阿尔茨海默病等^[2]。MMPs催化活性的调节包括转录、分泌、活化和抑制,抑制剂包括内源性组织抑制剂和外源性合成抑制剂^[3]。合成抑制剂一般都包含锌离子结合基(ZBG),如羟肟酸类、羧酸类^[4]、硫醇类^[5]、吡喃酮类衍生物^[6],与催化域锌离子结合。还有含新型ZBG的MMPs抑制剂,如氨基甲酰基磷酸酯类^[7]、羟基脲类^[8]、胍类^[9]、 β -内酰胺类、方

形酸类^[10]和二甲基吡啶胺类^[11]。

为了设计并提高MMPs抑制剂的选择性和活性,研究MMPs及其抑制剂的相互作用机制非常重要。运用X线晶体学法和NMR结构解析法有助于理解活性态的酶同其抑制剂的分子作用机制^[12]。另一方面,MMPs活性域(特别是疏水性的S₁'结合袋)的柔性和分子动力学研究也很重要。因此,本研究根据MMPs活性域的结构特点,即S₁'结合袋的形状,选取3种具有代表性的原酶,即浅袋MMPs(S₁'结合袋深度较浅,如MMP-1、MMP-7)、中袋MMPs(S₁'结合袋中等深度,如MMP-2、MMP-9)、深袋MMPs(S₁'结合袋深度较深,如MMP-3、MMP-12、MMP-14),分别做长时间分子动力学研

* 收稿日期 2012-11-01 * 通信作者 Tel:0791-86363223 E-mail:lishaohua0131@yahoo.com.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81160383);江西省科技支撑计划资助项目(No. 2010BSA18500)

究,并从分子水平上阐明其活性域 S'_1 结合袋的分子动力学和结构特点。

1 方法

在 Dell Precision 工作站上完成分子动力学计算,所用程序为 Gromacs-4.5.4,分析及图示用 VMD-1.9.1 软件。计算中选用的各项参数除特别说明外均使用缺省值。选用人基质溶解素(MMP-7,1MMQ)^[13]、人明胶酶 A(MMP-2,1QIB)^[14]和基质溶解素 I(MMP-3,1G4K)^[15]建立模型。首先去除酶活性域的配体,并用 Gromos96 43b1 真空力场分别进行 200 步最陡下降法和 200 步共轭梯度法能量优化,以释放由于从酶中去除原有配体可能导致的酶结构内部不合理的张力。模型中碱性氨基酸(如精氨酸、赖氨酸)被质子化;而酸性氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)被去质子化,对于其 pK_a 和生理 pH,组氨酸被设为中性态。除了 MMP-3 的 His179 被质子化在 ϵ 位,其余所有的组氨酸均被质子化在 δ 位。为了保持催化域和结构域组氨酸的正确取向,防止锌离子和钙离子逸出酶而进入溶剂中,根据晶体结构中锌离子和钙离子与其相应配基的距离及键角,采用距离限制法使锌离子和钙离子处于正确的配位态,并限定锌离子和钙离子与其相应配基的键角与晶体结构一致,锌离子和钙离子的形式电荷设为 +2^[16]。

用 Gromacs 程序包对 MMP-7、MMP-2 和 MMP-3 分别在水溶液中进行动力学模拟^[17]。将酶质心置于八面体盒子中心,溶质原子到盒子壁距离 1.0 nm,采用 SPC 水模型在盒子内填充水分子。为保持体系的总电荷为 0,体系中加入 Na^+ 或 Cl^- ,除去相应位置的水分子。采用 Gromos96 43a1 力场,将体系分别以最陡下降法和共轭梯度法分别进行 500 步能量优化,然后进行 100 ps 的约束溶质分子动力学模拟,再在 300 K 下分别固定酶主链和侧链各分子动力学模拟 1 ns,模拟时采用宏观正则系综(NVT 系综),最后进行 10 ns 的无约束分子动力学模拟,模拟时采用等温等压系综(NPT 系综)。分子动力学模拟积分步长取 2 fs,每隔 100 步记录一次轨迹。静电相互作用采用 Particle-Merrell Ewald(PME)算法,范德华相互作用取截断半径为 1.0 nm,温度耦合用 V-rescale 法,压力耦合用 Parrinello-Rahman 法^[18]。

2 结果与讨论

模拟结束后用 C_α 的 RMSD 评估体系的稳定性^[19],相对于起始结构,MMP-7、MMP-2 和 MMP-3 的 RMSD 分别是 1.19 Å、1.59 Å 和 1.75 Å,说明体系已稳定。另外,在整个模拟过程中,酶的二级结构保持不变。

MMPs 主要由 4 部分组成:保守的催化域(酶的活性中心)、前肽结构域(使酶以酶原的形式存在)、信号肽结构域(引导翻译后的新生肽进入胞浆)和 C-末端血红素结合蛋白结构域(识别底物及与内源性抑制剂相互作用)。MMPs 的催化域呈球形,包括 4 个平行的 β 片层,1 个反平行的 β 片层和 3 个长 α 螺旋,1 个与 3 个组氨酸螯合的催化锌离子,1 个与 3 个组氨酸及 1 个天冬氨酸螯合的结构钙离子和至少 2 个以八面体形式螯合的结构钙离子。MMPs 都有个疏水性的结合腔,即 S'_1 结合袋。根据 S'_1 结合袋的形状可以将 MMPs 分成 3 类:浅袋 MMPs、中袋 MMPs 和深袋 MMPs。MMP-1 和 MMP-7 的 S'_1 结合袋属于浅袋,其大小分别由精氨酸和酪氨酸的侧链限制,而多数 MMPs 在对应的位置是亮氨酸,与精氨酸和酪氨酸横跨 S'_1 结合袋不同,亮氨酸位于 S'_1 结合袋顶部,含亮氨酸的 MMPs 分中袋 MMPs 和深袋 MMPs 两类。MMP-2 和 MMP-9 的属于中袋,而 MMP-3、MMP-12 和 MMP-14 的 S'_1 结合袋属于深袋。图 1 显示的是 3 种具有代表性酶经催化锌离子及 3 个组氨酸叠合后的 S'_1 结合袋氨基酸(活性态构型,抑制剂未显示)。图 1-A 显示 Tyr214 限制了 MMP-7 S'_1 结合袋的深度,使其成为浅袋 MMP,而在对应的位置 MMP-2 和 MMP-3 都是残基 Leu197,MMP-2 的 Thr229 插入 S'_1 结合袋使其成为中袋 MMP,在对应的位置 MMP-3 是未插入 S'_1 结合袋的 Leu226,使其成为深袋 MMP(图 1-B,C)。

去除抑制剂后的原酶进行分子动力学研究,含配体 X 线晶体结构与动力学后原酶结构经骨架叠合(图 2,图 3)。结果表明:MMP-7 的 Tyr214 进一步插入 S'_1 结合袋,使 S'_1 结合袋处于关闭状态(图 2-A 和图 3-A);MMP-2 的 Leu197、Phe223、Thr227 和 Thr229 插入 S'_1 结合袋,使 S'_1 结合袋处于关闭状态(图 2-B 和图 3-B);MMP-3 的 His224 插入 S'_1 结合袋,使 S'_1 结合袋处于半关闭状态(图 2-C 和图 3-C)。这些氨基酸处于 S'_1 结合袋的环区,因各 MMP

的 S₁'结合袋的环区没有同源性,所以针对环区结构可以设计选择性的 MMPs 抑制剂。例如,MMP-3 的 226 位是非极性的 Leu 残基,而 MMP-2 的相应位置是极性且含氢键供体的 Thr229 残基;MMP-2 的 230 位是带电荷的 Lys 残基,而 MMP-3 的相应

位置是不带电荷的 Thr 残基。深袋 MMPs 可以容纳含不同长度 P₁'基的配体,而浅袋 MMPs 和中袋 MMPs 只能容纳含较短 P₁'基的配体。模拟结果与文献报道的 IC₅₀ 相符,即 P₁'位含三苯基的吡喃酮类化合物对 MMP-3 的选择性强于 MMP-2^[20]。

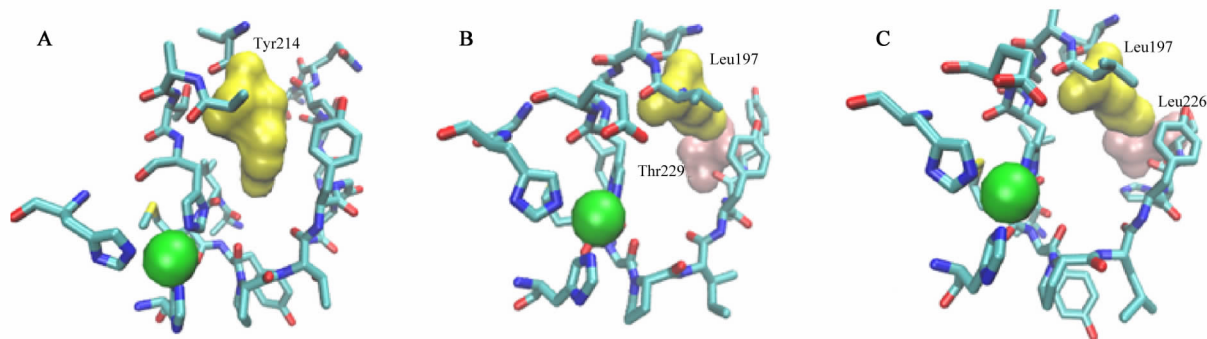


Figure 1 Residues forming the S₁' binding pocket of MMP-7 (A), MMP-2 (B), and MMP-3 (C)

The key residue that distinguishes shallow pocket is represented by yellow molecular surface. Residue that discriminates between intermediate and deep pocket sizes is represented by pink molecular surface.

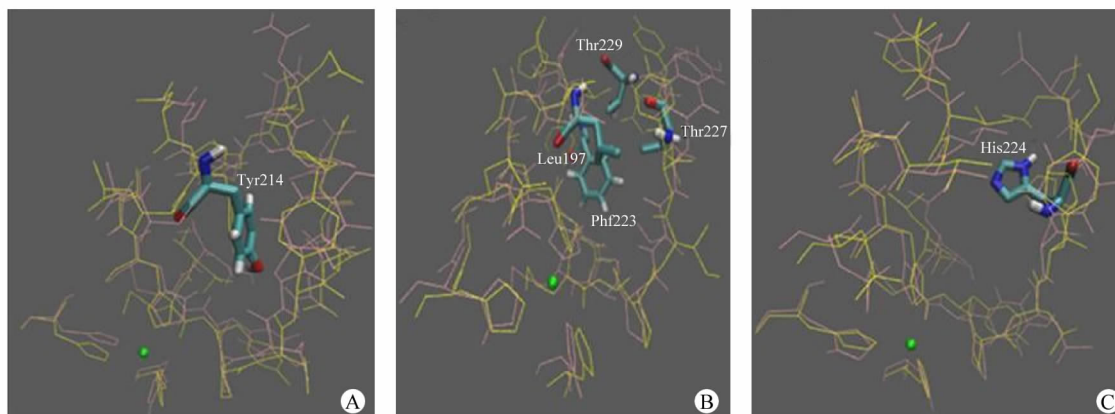


Figure 2 X-ray crystallographic structures and *apo* proteases after MD are shown by superimposition of backbone atoms

A: MMP-7, B: MMP-2, C: MMP-3. X-ray crystallographic structures are represented by yellow lines. *Apo* proteases after MD are represented by pink lines. Residues that block S₁' binding pocket are represented by licorice

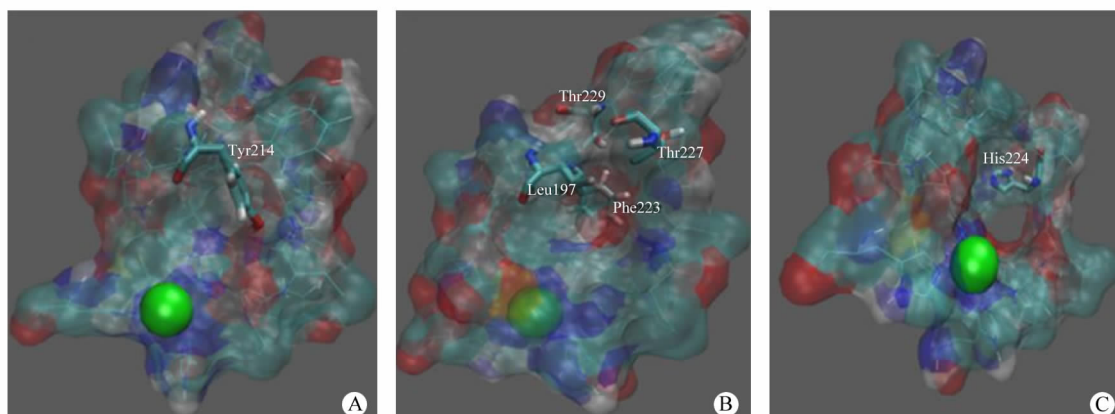


Figure 3 Transparent molecular surface of *apo* proteases after MD. Residues that block S₁' binding pocket are represented by licorice
A: MMP-7, B: MMP-2, C: MMP-3

3 结 论

为了研究浅袋、中袋和深袋3种基质金属蛋白酶 S₁' 结合袋的分子动力学特点,本研究对其执行了长时间分子动力学模拟。结果表明,S₁' 结合袋环区的柔性在结合抑制剂时发挥了重要作用:对于浅袋 MMPs,其 S₁' 结合袋的软性相对较小;对于深袋 MMPs,是可以容易定义的管状 S₁' 结合袋;对于 MMP-2,观察到了两个稳态,一个是类似于 MMP-3 的管状 S₁' 结合袋,但是较浅,另一个是 S₁' 结合袋关闭的构型。动力学模拟结果与实验结果相符,即在 P₁' 位含长取代基的抑制剂具有更强的选择性,抑制 MMP-3 的活性比 MMP-2 强。分子动力学模拟的结果有助于特异性 MMPs 抑制剂的研发。

参 考 文 献

- [1] Whittaker M, Floyd CD, Brown P, *et al.* Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors [J]. *J Chem Rev*, 1999, **99**(9): 2 735 - 2 776.
- [2] Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer [J]. *Chem Biol*, 1996, **3**(11): 895 - 904.
- [3] Nagase H, Meng Q, Malinovskii V, *et al.* Engineering of selective TIMPs [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, **878**(1): 1 - 11.
- [4] Puerta DT, Lewis JA, Cohen SM. New beginnings for matrix metalloproteinase inhibitors: identification of high-affinity zinc-binding groups [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(27): 8 388 - 8 389.
- [5] Skiles JW, Gonnella NC, Jeng AY. The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2004, **11**(12): 2 911 - 2 977.
- [6] Puerta DT, Griffin MO, Lewis JA, *et al.* Heterocyclic zinc-binding groups for use in next-generation matrix metalloproteinase inhibitors: potency, toxicity, and reactivity [J]. *Biol Inorg Chem*, 2006, **11**(2): 131 - 138.
- [7] Reich R, Katz Y, Hadar R, *et al.* Carbamoylphosphonate matrix metalloproteinase inhibitors 3: *in vivo* evaluation of cyclopentyl-carbamoylphosphonic acid in experimental metastasis and angiogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(10): 3 925 - 3 929.
- [8] Campestre C, Agamennone M, Tortorella P, *et al.* N-Hydroxyurea as zinc binding group in matrix metalloproteinase inhibition: mode of binding in a complex with MMP-8 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**(1): 20 - 24.
- [9] Auge F, Hornebeck W, Decarme M, *et al.* Improved gelatinase selectivity by novel zinc binding groups containing galardin derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, **13**(10): 1 783 - 1 786.
- [10] Onaran MB, Comeau AB, Seto CT. Squaric acid-based peptidic inhibitors of matrix metalloproteinase-1 [J]. *J Org Chem*, 2005, **70**(26): 10 792 - 10 802.
- [11] Jacobsen FE, Lewis JA, Cohen SM. A new role for old ligands: discerning chelators for zinc metalloproteinases [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**(10): 3 156 - 3 157.
- [12] Lovejoy B, Cleasby A, Hassell AM, *et al.* Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor [J]. *Science*, 1994, **263**(5 145): 375 - 377.
- [13] Browner MF, Smith WW, Castellano AL. Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteinases [J]. *Biochemistry*, 1995, **34**(20): 6 602 - 6 610.
- [14] Dhanaraj V, Williams MG, Ye QZ, *et al.* X-ray structure of gelatinase a catalytic domain complexed with a hydroxamate inhibitor [J]. *Croat Chem Acta*, 1999, **72**(2/3): 575 - 591.
- [15] Dunten P, Kammloft U, Crowther R, *et al.* X-ray structure of a novel matrix metalloproteinase inhibitor complexed to stromelysin [J]. *Protein Sci*, 2001, **10**(5): 923 - 926.
- [16] Manzetti S, McCulloch DR, Herington AC, *et al.* Modeling of enzyme-substrate complexes for the metalloproteinases MMP-3, ADAM-9 and ADAM-10 [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2003, **17**(9): 551 - 565.
- [17] Sun TD, Zhao X, Huang XR. Assessing the credibility of VDAC structure with molecular dynamics simulation approach [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2011, **32**(2): 327 - 331.
- [18] Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, *et al.* GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation [J]. *J Chem Theory Comput*, 2008, **4**(3): 435 - 447.
- [19] Sun H, Jiang YJ, Yu QS, *et al.* Molecular dynamics simulations on the role of structural Mg²⁺ ions in phosphoryl transfer catalyzed by GSK-3 β [J]. *Acta Phys Chim Sin*, 2011, **27**(1): 207 - 212.
- [20] De Oliveira CAF, Zissen M, Mongon J, *et al.* Molecular dynamics simulations of metalloproteinases types 2 and 3 reveal differences in the dynamic behavior of the S₁' binding pocket [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, **13**(34): 3 471 - 3 475.