

含有 L-对硝基苯丙氨酸的 BAFF 改构体的分子动力学模拟与分析

蔡 棣, 田 泓, 姚文兵*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘 要 建立含有 L-对硝基苯丙氨酸(*p*-nitro-L-phenylalanine, pNO₂Phe)蛋白的分子动力学模拟方法, 分析了含有 pNO₂Phe 的蛋白具有免疫原性的构效关系, 为其他含有非天然氨基酸蛋白的动力学模拟研究提供参考。使用 CGenFF-paramchem 计算天然氨基酸中不存在的 L-对硝基苯丙氨酸的新的成键、键角、二面角信息与能量, 将新成键的键长、键角、二面角参数与相应的能量信息写入 CHARMM(chemistry at Harvard macromolecular mechanics) 力场参数文件中。重新定义 L-对硝基苯丙氨酸的 CHARMM 力场参数后, 利用纳米分子动力学(NAMD)成功对含有 L-对硝基苯丙氨酸的 B 淋巴细胞刺激因子(BAFF)进行动力学模拟。统计动力学模拟过程中的每一帧体系的温度, 作出的温度分布图符合正态分布, 证明了新定义力场参数的稳定性。模拟结果中, 蛋白的均方根偏差(RMSD)在趋近于 2.5, pNO₂Phe 残基的均方根涨落(RMSF)为 3.7, 显著高于分子的其他部位, 表明 pNO₂Phe 残基运动剧烈, 蛋白在该残基附近结构的可变性较大, 可能会产生新的构象表位, 为含有 pNO₂Phe 蛋白成为自体疫苗的设计提供了理论上的可行性。

关键词 纳米分子动力学(NAMD); 可视化分子动力学(VMD); 分子动力学模拟; CHARMM; L-对硝基苯丙氨酸; B 淋巴细胞刺激因子

中图分类号 Q61 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)02-0227-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170215

引用本文 蔡棣, 田泓, 姚文兵. 含有 L-对硝基苯丙氨酸的 BAFF 改构体的分子动力学模拟与分析[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2): 227-232.

Cite this article as: CAI Di, TIAN Hong, YAO Wenbing. Molecular dynamics simulation and analysis of BAFF which is incorporated with *p*-nitro-L-phenylalanine[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(2): 227-232.

Molecular dynamics simulation and analysis of BAFF which is incorporated with *p*-nitro-L-phenylalanine

CAI Di, TIAN Hong, YAO Wenbing*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In order to study the structure-function relationship in the protein which is incorporated with *p*-nitro-L-phenylalanine, the method of MD(Molecular Dynamics) simulation was established and successfully used in the analysis of protein which contains *p*-nitro-L-phenylalanine. The force field of CHARMM can only stimulate protein with natural amino acid in NAMD. Compared with phenylalanine, *p*-nitro-L-phenylalanine just has one more group of nitro. If the parameter of group of nitro was defined, the protein containing *p*-nitro-L-phenylalanine can be simulated. CGenFF-paramchem was used to calculate the energy and topological structure of *p*-nitro-L-phenylalanine's new bonds (r), angles (θ), dihedrals (φ) and improper angle (ψ). And then the new defined parameter and topology information was input into the related parameter files and topology files in CHARMM. On the basis of correct parameter, NAMD can successfully simulate the modified BAFF(B lymphocyte stimulator) which contains *p*-nitro-L-phenylalanine. The changes in structure indicated that there might be new B cell epitopes. The tempera-

ture distribution of each frame in the process of dynamics stimulation was in accord with normal distribution, which proved the defined force field parameters was feasible. The RMSD of whole protein solution system is 2.5. Calculate each residues' RMSF in BAFF, the RMSF of *p*-nitro-L-phenylalanine's residue is 3.7, which is obviously higher than that of the other residues in β -pleated sheet, and close to the loop rings, indicate that there might be variation in the area of *p*-nitro-L-phenylalanine residue and might produce new conformational epitopes. The results of MD stimulation will guide the immunogenicity experiments of *p*-nitro-L-phenylalanine modified proteins.

Key words nanoscale molecular dynamics (NAMD); visual molecular dynamics (VMD); molecular dynamics simulation; chemistry at Harvard macromolecular mechanics (CHARMM); *p*-nitro-L-phenylalanine; B lymphocyte stimulator

This study was supported by the Ph. D Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20120096110007) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81273426)

分子动力学模拟(molecular dynamics simulation, MDS)是根据牛顿力学的基本原理,通过相关计算机软件模拟大分子的相互作用和运动变化的研究方法。它不仅可以解释分子结构的合理性,还可以预测限制条件下分子的变化过程,指导设计相应的实验,检验计算机模拟出的结果^[1-2]。纳米分子动力学(nanoscale molecular dynamics, NAMD)是伊利诺伊大学开发的分子动力学分析软件,可以通过经典力场参数求解运动方程计算原子轨迹。NAMD 常用的 CHARMM^[3]、Amber^[4]、GROMOS^[5]等几种经典力场中,CHARMM 力场在含有大量原子体系的计算中,仍可保持稳定性与高计算效率,因此,常被用于生物大分子的分子动力学计算与模拟。NAMD 没有可视化界面,可视化分子动力学(visual molecular dynamics, VMD)软件是与 NAMD 配套的可视化软件。

分子动力学模拟技术飞速发展的同时,研究者不仅仅满足于用它分析只含有 20 种天然氨基酸的蛋白。对蛋白的侧链进行修饰可以增强蛋白的活性,或者使蛋白获得某种新功能。很多研究者也开始致力于开发侧链被修饰蛋白以及含有非天然氨基酸蛋白的动力学模拟方法。甲烷硫代磺酸盐(methanethio sulfonate, MTS)试剂可以与半胱氨酸结合形成二硫键,引入新的取代基。为了研究含 MTS 取代基蛋白的动力学过程,Islam 计算了 14 个侧链含 MTS 取代基的氨基酸的 CHARMM 力场参数^[6-7]。对于非天然氨基酸, Huang 等^[8]先利用 GAAMP 法计算氨基酸侧链参数,再将 GAAMP 的计算结果写入 CHARMM 力场参数中。参数定义完成,CHARMM 力场即可对含有相应氨基酸残基

的蛋白进行动力学模拟分析。

L-对硝基苯丙氨酸(*p*-nitro-L-phenylalanine, pNO₂Phe)定点引入系统可以将 pNO₂Phe 引入蛋白的任意位点,对蛋白进行改造。实验证明, pNO₂Phe 的引入使蛋白突破了免疫耐受,获得免疫原性,为自体疫苗的开发提供了新技术^[9-10]。然而,在 Huang 已定义力场参数的 17 个非天然氨基酸中并没有 L-对硝基苯丙氨酸。利用 NAMD 中的 CHARMM 力场对含有 L-对硝基苯丙氨酸的蛋白进行 MD 模拟,必需具备 4 个文件:蛋白的 PDB(记录蛋白原子坐标)与 PSF(记录蛋白的结构信息)文件,非天然氨基酸结构的拓扑文件(topology file)与力场参数文件(parameter file)。本实验将通过一系列数据库以及分子建模软件定义 pNO₂Phe 的拓扑文件与力场参数文件,使 NAMD 的 CHARMM 力场可以对 pNO₂Phe 的残基进行动力学计算。并将 pNO₂Phe 引入 smBAFF(84, 91 位突变为 Gly 的可溶 B 淋巴细胞刺激因子)^[11]的第 119 位(119pNO₂Phe-smBAFF),对引入 pNO₂Phe 的 smBAFF 分子进行分子动力学模拟。

1 工 具

1.1 数据库

RCSB 蛋白 PDB 数据库(罗格斯大学和加州大学圣地亚哥分校/圣地亚哥超级计算机中心)。

1.2 软件

NAMD/VMD, 分子动力学计算软件, 美国伊利诺伊大学。SWISS-MODEL, 在线同源建模软件, 瑞士生物信息研究所。Wavefunction Spartan 10, 分子计算建模软件, 波函数公司(日本 Wavefunction 公

司)。CGenFF-paramchem CHARMM, 力场参数计算工具, 美国肯塔基大学。

2 方 法

2.1 定义 pNO₂Phe 的 CHARMM 力场参数

2.1.1 制作 pNO₂Phe 的拓扑文件 CHARMM 力场的拓扑文件中描述了各个氨基酸残基内原子的成键信息。定义 pNO₂Phe 残基名为 PNP, Wavefunction Spartan 10 软件画出 pNO₂Phe 的结构, CGenFF-paramchem 软件计算 pNO₂Phe 内各项力学参数。在计算结果中, 将硝基的电荷数、原子之间的成键信息以及硝基与相邻 C 原子共 4 个原子间的键长、键角以及二面角数值计算结果写入 CHARMM27 蛋白水溶液体系的拓扑文件中。原子之间的拓扑结构如图 1 所示。

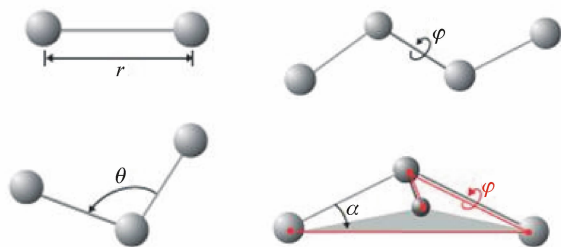


Figure 1 The four parameters, bond distance (r), angle (θ), dihedral (φ), and improper angle (ψ), which is measured by CGenFF-paramchem and is used to calculate potential energies of pNO₂Phe

2.1.2 制作 pNO₂Phe 的力场参数文件 CHAEMM 力场的参数文件中包含了相邻 2 个、3 个以及 4 个原子之间的作用力。CGenFF-paramchem 计算 pNO₂Phe 硝基附近各个原子间成键的键能, 并将计算结果写入 CHARMM27 蛋白水溶液体系的参数文件中。公式如下:

$$V(\text{bond}) = Kr(r - r_0) \times 2$$

$$V(\text{angle}) = K\theta(\theta - \theta_0) \times 2$$

$$V(\text{dihedral}) = K\varphi(1 + \cos(n(\varphi) - \delta))$$

2.2 制作 pNO₂Phe-smBAFF 的 PDB 与 PSF 文件

从 RCSB Protein data bank 获取 BAFF 的序列。将序列的第 84, 91 位修改为 Gly, 第 119 位修改为 Phe, 所得新的序列通过 SWISS-MODEL 同源建模获得蛋白的 PDB 文件, 记作 Phe. pdb。将 Phe. pdb 文件的第 119 位残基的名称修改为 PNP, 得到新的 PDB 文件记作 PNP0. pdb。用 VMD 的 Psfgen 工具对 PNP0. pdb 进行结构拓扑, 成功推测出 pNO₂Phe

残基中的各个原子信息并写入 PDB 与 PSF 文件, 得到成功引入 pNO₂Phe 的 smBAFF 的 PDB 与 PSF 文件, 记作 PNP. pdb 与 PNP. psf。

2.3 119pNO₂Phe-smBAFF 的分子动力学模拟

2.3.1 119pNO₂Phe-smBAFF 在球状水体中的动力学模拟 计算 PNP. pdb 最远原子距蛋白中心的距离, 设该距离为 r 。使用 VMD 中的 solvate 软件包, 在 PNP. PSF 周围添加水分子形成球状水体, 球状水体半径为 $r + 5\text{\AA}$ 。利用 NAMD 的 CHARMM 力场对蛋白水球体系进行动力学模拟。定义体系温度为 310 K, 步长为 0.5 fs, 平衡 500 步使体系能量最小化后, 再模拟 10 000 步。每隔 1 个步长计算一次非成键相互作用, 每隔 2 个步长计算一次总体静电相互作用。设定所有与氢原子相连的键均为刚性键, 忽略的原子-原子相互作用以及范德华力与电力截止点的力场参数如下, exclude: scaled1-4; 1-4scaling: 1.0; cutoff: 12.0; switching: on; switch-dist: 10.0; pairlistdist: 14.0。

2.3.2 计算 119pNO₂Phe-smBAFF 蛋白水溶液体系的均方根偏差 (RMSD) RMSD 反映了数据偏离平均值的程度。用 VMD 的 RMSD 分析工具分析方法“2.3.1”中动力学模拟的结果。作图说明蛋白水球体系能量平衡程度。

2.3.3 MD 模拟结果的温度分布 动力学模拟 10 000 步, 设置每隔 5 步输出一次体系的能量信息, 模拟结束后共得到 2 000 组 119pNO₂Phe-smBAFF 水溶液体系的能量信息, 对体系的温度进行统计, 每 0.5 K 作为一个区间, 作出体系的温度分布图, 而后用 EXCEL 对体系的温度图分布作正态分布曲线拟合。比较动力学模拟体系与正态分布曲线拟合程度, 计算两者的平均温度。

2.3.4 计算 119pNO₂Phe-smBAFF 蛋白各残基的均方根涨落 (RMSF) 119pNO₂Phe-smBAFF 水溶液体系动力学模拟结束后, VMD 根据模拟结果, 计算每个残基的平均 RMSF, 对蛋白进行着色, 评价 pNO₂Phe 残基在动力学模拟时运动的剧烈程度。

3 结 果

3.1 pNO₂Phe 的拓扑结果

比较 pNO₂Phe 和苯丙氨酸的结构, pNO₂Phe 只多出了一个硝基, 在苯丙氨酸拓扑结构文件基础上修改, 添加硝基基团, 并定义硝基的拓扑结构。

温度平均值为 314.7 K,正态分布拟合的平均温度为 314.5 K,两者的拟合度较高,证明了新定义力场参数在 MD 模拟过程中的可行性与稳定性。

3.5 119pNO₂Phe-smBAFF 各残基的 RMSF

119pNO₂Phe-smBAFF 水溶液体系的 RMSD 反映了蛋白整体在水溶液中的运动情况。为了分析具体残基的运动情况,计算了 119pNO₂Phe-smBAFF 蛋白中每个氨基酸残基的 RMSF。VMD 工具对 119pNO₂Phe-smBAFF 残基进行染色,按照 RMSF 由小到大的顺序依次染为蓝色、白色、红色。各氨基酸残基的 RMSF 染色情况如图 5 所示。119 位残基的 RMSF 达到 3.7,与 loop 环的 RMSF 相差无几。表明 119pNO₂Phe 残基在蛋白的引入位置运动剧烈,该残基附近蛋白构象的可变性较大。蛋白构象的改变会产生新的构象表位,这可能是引入 pNO₂Phe 后蛋白免疫原性增强的原因之一。

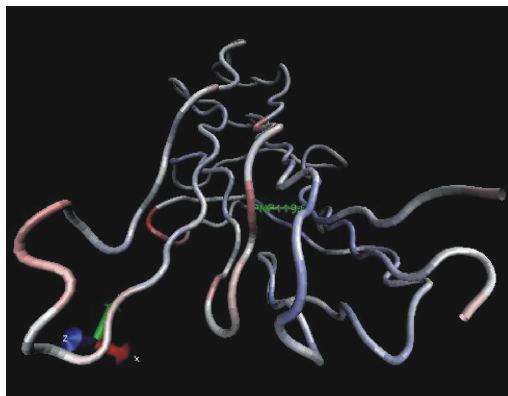


Figure 5 119pNO₂Phe-smBAFF is colored by the average RMSF per residue, blue denotes residues which moved less while red denotes more mobile residues during equilibration

4 讨论

针对自身免疫性疾病、恶性肿瘤等发病原因与自身蛋白的过量表达有关的疾病,临床上多利用单克隆抗体或可溶性受体等药物中和体内的致病蛋白。然而这一类药物用药量大、易引起超敏反应、需要长期反复使用。自体疫苗弥补了上述药物的不足。实验证明,通过 pNO₂Phe 定点引入系统改造蛋白,使蛋白获得免疫原性,可以成为一种制备自体疫苗的方法。

疫苗的免疫原性由免疫者对其表位的识别有关。表位分为序列表位与构象表位,分子结构的改变有可能产生新的构象表位。119pNO₂Phe-

smBAFF 分子动力学模拟结果说明,蛋白中引入 pNO₂Phe 残基的剧烈运动可能是蛋白产生免疫原性的原因,为含有 pNO₂Phe 蛋白成为自体疫苗的设计提供了理论上的可行性。定义 pNO₂Phe 的 CHARMM 力场参数的方法,也为其他含有非天然氨基酸蛋白的动力学模拟提供了依据。

实验所用 sBAFF 分子的 PDB 文件是通过 SWISS-MODEL 同源建模获得而没有直接使用 RCSB 数据库中的 sBAFF 的 PDB 文件,是因为 119 位引入 pNO₂Phe 后,会有很大的位阻作用,RCSB 的 sBAFF 结构 119 位引入 pNO₂Phe,会与 54 位、58 位和 125 位氨基酸残基发生重叠。先把 119 位氨基酸突变为苯丙氨酸再同过同源建模的方法获得蛋白的 PDB 文件可以有效避免这个问题。同源建模后 119 位氨基酸残基的伸展方向由原来的向蛋白的内部变为伸展向蛋白的外部。同源建模的蛋白模型中缺少了第 1~8 个氨基酸残基,在 RCSB 的 X 射线晶体衍射得到的结构中,这一氨基酸序列也未被定义^[12]。该肽段远离 pNO₂Phe 引入的位点,对 pNO₂Phe 残基附近的结构影响可以忽略不计。

参考文献

- [1] Kuhlman B, Dantas G, Ireton GC, et al. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy [J]. *Science*, 2003, **302** (5649): 1364–1368.
- [2] Shukla D, Meng Y, Roux B, et al. Activation pathway of Src kinase reveals intermediate states as targets for drug design [J]. *Nat Commun*, 2014, **5** (3397): 1–11.
- [3] Best RB, Zhu X, Shim J, et al. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone φ, ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles [J]. *J Chem Theory Comput*, 2012, **8** (9): 3257–3273.
- [4] Christen M, Huenenberger PH, Bakowies D, et al. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05 [J]. *J Comput Chem*, 2005, **26** (16): 1719–1751.
- [5] Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules [J]. *J Am Chem Soc*, 1995, **117** (19): 5179–5197.
- [6] Sezer D, Freed JH, Roux B. Parametrization, molecular dynamics simulation, and calculation of electron spin resonance spectra of a nitroxide spin label on a polyaniline α -helix [J]. *J Phys Chem B*, 2008, **112** (18): 5755–5767.
- [7] Islam SM, Stein RA, McHaourab HS, et al. Structural refinement from restrained-ensemble simulations based on EPR/DEER data;

- application to T4 lysozyme[J]. *J Phys Chem B*, 2013, **117**(17): 4740–4754.
- [8] Huang L, Roux B. Automated force field parameterization for non-polarizable and polarizable atomic models based on ab initio target data[J]. *J Chem Theory Comput*, 2013, **9**(8): 3543–3556.
- [9] Grunewald J, Tsao ML, Perera R, et al. Immunochemical termination of self-tolerance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(32): 11276–11280.
- [10] Grunewald J, Hunt GS, Dong L, et al. Mechanistic studies of the immunochemical termination of self-tolerance with unnatural amino acids[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(11): 4337–4342.
- [11] Gao H, Bian A, Zheng Y, et al. sBAFF mutants induce neutralizing antibodies against Baff[J]. *FEBS Lett*, 2007, **581**(4): 581–586.
- [12] Oren DA, Li Y, Volovik Y, et al. Structural basis of BLyS receptor recognition[J]. *Nat Struct Biol*, 2002, **9**(4): 288–292.

· 新药信息 ·

2017 年最值得关注的 12 个药物(2)

KTE-C19/CTL019 CAR-T 疗法在喧嚣两年并经历种种波折后, 2017 会再度吸引投资人的强烈关注。Kite 和诺华会在 2017 初完成提交 KTE-C19 和 CTL019 分别用于复发或难治性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤、儿童及青少年复发或难治性 B 细胞急性淋巴瘤的上市申请。考虑到 JUNO 近期发生的致死事件, FDA 对 CAR-T 这一前沿疗法的态度值得关注。

Rubraca/niraparib 2017 年, 已上市 PARP 抑制剂类药物的数据应该会增加至 3 家。Clovis Oncology 的 Rubraca 在去年 12 月获得 FDA 加速批准用于三线治疗 BRCA 突变阳性卵巢癌, Tesaro 的 niraparib 作为不用考虑 BRCA 突变状态的二线疗法正在等待 FDA 的审批结果。由于已获得优先审评资格, FDA 预计在 6 月底之前做出是否批准 niraparib 的决定。

Nuplazid Acadia 公司的 Nuplazid 在 2016 年 4 月 29 日获得 FDA 批准, 是 FDA 批准的首个选择性靶向 5-HT_{2A} 受体的药物, 也是 FDA 批准的首个治疗帕金森病性精神病的药物, 是帕金森病性精神病临床治疗的重大里程碑。

随后公布的 II 期研究一线阳性结果还提示 Nuplazid 具有治疗阿尔茨海默病精神病的潜力。Acadia 已经多次被谣传为大型生物制药公司的收购目标, 不仅这项 II 期研究的详细结果值得期待, Acadia 会被哪个巨头收购也很值得期待。

Epidiolex GW 制药公司也被盛传是巨头收购的潜在标的之一, 其吸引人之处主要是成功开发了一种来自大麻植物的非精神类成分 Epidiolex(大麻二酚, CBD)用于治疗儿童 Dravet 综合征和 Lennox-Gastaut 综合征(LGS), 这是两种极其罕见的癫痫类型。不过 12 月份刚刚公布的 Dravet 综合征 III 期研究数据略微让人失望, Epidiolex 可以减少总的癫痫发作次数, 但相比基线水平没有显著减少。不过业内对该药的期待依然很高, 2017 年也会公布 Epidiolex 用于寻求 US/EMA 批准治疗 LGS 和 Dravet syndrome 详细数据。

Verubecestat 在礼来失败之后, 制药行业仍在孜孜以求地寻找有望攻克阿尔茨海默病的药物。默沙东的 BACE 抑制剂 verubecestat 将在 2017 年中公布 III 期结果。考虑到这个领域惨不忍睹的临床成功率, 以及 EPOCH 研究未事先对患者的 A β 水平筛选分层, 大家对 verubecestat 的失败风险似乎已经有了预估。这项研究的数据也会直接影响 BACE 抑制剂类药物的开发前景。

Perjeta 由于生物类似物对 Herceptin 的冲击愈演愈烈, 罗氏迫切需要以 Perjeta 与 Herceptin 联用辅助治疗 HER2 阳性乳腺癌患者的数据来提高这类患者的临床治疗标准。医生和患者对此也期望甚高, 在转移性乳腺癌患者中, Perjeta 与 Herceptin 联用已经成为新的标准治疗方法。

(来源: 医药魔方)