

文章编号 1006-8147(2017)02-0132-06

论著

抗感染药物作用新靶点 CrtN 蛋白的结构及其与抑制剂萘替芬的作用机制研究

索慧荣

(天津医科大学第二医院药学部, 天津 300211)

摘要 目的:研究抗感染药物作用新靶点 CrtN 的结构及其与抑制剂萘替芬的作用机制,为新型 CrtN 抑制剂的发现奠定基础。方法:采用同源建模获得 CrtN 的三维结构,然后用分子动力学方法优化初始结构,并用 Ramachandran 图评估结果,最后通过活性位点搜索、分子对接和动力学模拟研究抑制剂萘替芬与 CrtN 的作用模式。结果:通过同源建模和动力学优化获得合理的 CrtN 结构用于药物与靶点的相互作用研究。对 CrtN 进行活性位点搜索,确定 Site 4 口袋作为萘替芬的结合位点。通过分子对接及动力学模拟发现萘替芬与 M51、P53、I55、I85、P146、Y150、Y190、L311、L376 等形成疏水作用,与 Y354 形成阳离子- π 键作用。结论:首次对 CrtN 的三维结构进行研究,阐明了疏水和阳离子- π 键作用是萘替芬对 CrtN 产生抑制活性的重要分子基础。关键词 CrtN;萘替芬;同源建模;分子动力学;分子对接

中图分类号 R9

文献标志码 A

Study on the structure of anti-infective new target CrtN and its interaction mechanism with the inhibitor of naftifine

SUO Hui-rong

(Department of Pharmacy, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To study the structure of anti-infective new target CrtN and its interactions with the inhibitor naftifine, thus providing insights into the design of new CrtN inhibitors. **Methods:** The structure of CrtN was built using homology modeling and optimized by molecular dynamics, and its quality was estimated by Ramachandran plot. Through binding site prediction and docking and molecular dynamics, the interaction mode of CrtN with its inhibitor naftifine was investigated. **Results:** After homology modeling and molecular dynamics, the reasonable structure of CrtN was obtained. Binding site prediction showed Site 4 of CrtN was the binding site of naftifine. Docking and molecular dynamics suggested that naftifine formed hydrophobic interactions with M51, P53, I55, I85, P146, Y150, Y190, L311 and L376, and cation- π interaction with Y354. **Conclusion:** This study shows the hydrophobic interactions and cation- π may be the main interactions resulting in inhibitory activity of naftifine against CrtN.

Key words CrtN; naftifine; homology modeling; molecular dynamics; docking

金黄色葡萄球菌(金葡菌)是造成人类感染性疾病的重要病原菌^[1]。研究发现,金葡菌产生的金黄色类胡萝卜素是决定致病能力的重要因子^[2],能够帮助金葡菌抵御外界环境中的氧化应激伤害并逃避宿主体内的先天免疫机制^[3-7]。基因突变及敲除研究表明,4,4'-脱氢鲨烯合酶(CrtM)和4,4'-脱氢鲨烯脱氢酶(CrtN)是金黄色类胡萝卜素生物合成途径中的关键酶,这两种酶的缺失或失活能够阻断金黄色类胡萝卜素的产生,使金葡菌的致病性大大降低^[6-10]。蓝乐夫等课题组对已上市药物进行筛选,发现萘替芬能有效抑制金黄色类胡萝卜素的合成($IC_{50}=296\text{ nmol}$)^[6]。进一步研究发现,萘替芬可竞争性抑制金黄色色素生物合成通路中的关键酶 CrtN

($IC_{50}=8.83\text{ }\mu\text{mol}$)。但萘替芬抑制金葡菌金黄色类胡萝卜素合成的活性是体外抑制 CrtN 酶活性的 30 倍的?原因目前还不明确。研究者后续对萘替芬的结构进行优化,得到活性更好的两个化合物 5 m 和 8^[11-12]。这两个化合物的活性同样有上述现象发生,推测原因如下:(1)抑制剂萘替芬在金葡菌的胞质中可能会累积,导致细胞内浓度升高从而更好的发挥抑制作用;(2)在金黄色类胡萝卜素的生物合成途径中,CrtN 催化 3 个连续的反应,萘替芬抑制金黄色类胡萝卜素的合成能力可能是抑制 3 个反应的叠加效应,因此表现为菌体内抑制活性是体外 CrtN 酶抑制活性的 30 倍^[6,11-12]。萘替芬还可有效抑制临床分离得到的重要 MRSA 菌株对小鼠的感染。CrtN 是一个潜力巨大的抗金葡菌感染的药物靶点^[6,12],为现有抗生素替代品的研究与开发提供了新的切入点。然

作者简介 索慧荣(1989—),女,药师,学士,研究方向:药物分子与靶点相互作用;E-mail:niuniufirstgirl@sina.com。

而,目前 CrtN 蛋白的晶体结构仍未测得,阻碍了其抑制剂的研发。通过同源性搜索发现,来自菠萝泛菌的八氢番茄红素脱氢酶(CrtI)与 CrtN 具有一定的同源性且晶体结构已经被测定^[13]。因此,本文以 CrtI 为模板模建了 CrtN 的三维空间结构,并用分子动力学模拟方法对初始模型进行优化;然后搜索了 CrtN 中可能的药物结合空腔,与其抑制剂萘替芬进行分子对接,阐明了 CrtN 与萘替芬的相互作用模式。

1 材料与方法

1.1 研究对象 金黄色葡萄球菌中 CrtN 的氨基酸序列来源于 NCBI 数据库(登录号:WP_000686169.1),萘替芬的结构来源于 Drugbank 数据库。

1.2 方法

1.2.1 同源序列搜索与比对 通过 BLASTp 搜索 PDB 数据库(Protein Data Bank)发现 CrtI(PDB 编号:4DGK)与 CrtN 的同源性高于 30%,覆盖范围大于 90%。所以,选取 CrtI 蛋白的晶体结构作为模板来模建 CrtN 的三维结构。采用多序列比对软件 ClustalW 对目标序列和模板序列进行比对,参数使用默认值。

1.2.2 同源模建及模型评估 根据上述序列比对结果,在 Modeller 9.16^[14]软件对 CrtN 的三维结构进行同源模建。利用 Modeller 自带的优化和打分程序对生成的结构进行初步优化和排序,输出排序前 5 的 PDB 结构模型。然后使用 Ramachandran 图^[15]和 Verify_3D^[16]方法对生成模型的质量进一步评估,以避免初步打分对结果造成偏差。选取评估结果最优的构象进行分子动力学优化和后续分析。

1.2.3 CrtN 分子动力学模拟 分子动力学模拟及分析采用 Gromacs 5.1^[17]软件包在 DELL 工作站 T7600 上完成。以同源模建得到的最优 CrtN 结构作为分子动力学模拟的初始结构,选用 GROMOS96 力场,添

加 10 nm 的周期性立方体水盒子,水分子采用 TIP3P 模型,使用钠/氯离子中和体系电荷。利用 Lenard-Jones 方法计算范德华作用力,非键截断距离设为 1.4 nm,用 PME 方法计算静电相互作用。优化过程中,先采用最陡下降法优化 5 000 步,再采用共轭梯度法优化 5 000 步。然后在 NVT 系综下模拟 200 ps,步长为 1 fs;再在 NPT 系综下模拟 1 ns 以平衡体系,步长为 2 fs。最后在体系温度为 300 K,压强为 1×10^5 Pa 条件下进行 500 ns 的分子动力学模拟,步长为 2 fs,分别采用 Nose-Hoover 和 Berendsen 耦合的方法保持温度和压强不变,选用 SHAKE 算法约束键长。利用 Ramachandran 图随时检查优化所得结构的合理性。

1.2.4 分子对接 利用 AutoDock 4.2^[18]软件对优化得到的 CrtN 的最终结构进行空间搜索,寻找可能的药物结合口袋。用 Cherm3D 对配体结构进行能量优化。然后运用 AutoDock 4.2 预测萘替芬及底物 4,4'-去氢鲨烯与受体 CrtN 的结合,对接之前先对受体和抑制剂进行预处理,加氢加电荷;用 AutoGrid 计算格点能量,对接算法采用拉马克遗传算法(LGA),抑制剂与蛋白受体之间的结合情况用半经验的结合自由能评价。对接参数采用默认值。

1.2.5 CrtN-萘替芬复合物的分子动力学模拟 利用 PRODRG 创建萘替芬的拓扑文件,与 CrtN 合并形成 CrtN-萘替芬复合物的拓扑文件,进行 100 ns 的分子动力学模拟,其他具体参数参照 1.2.3。

2 结果

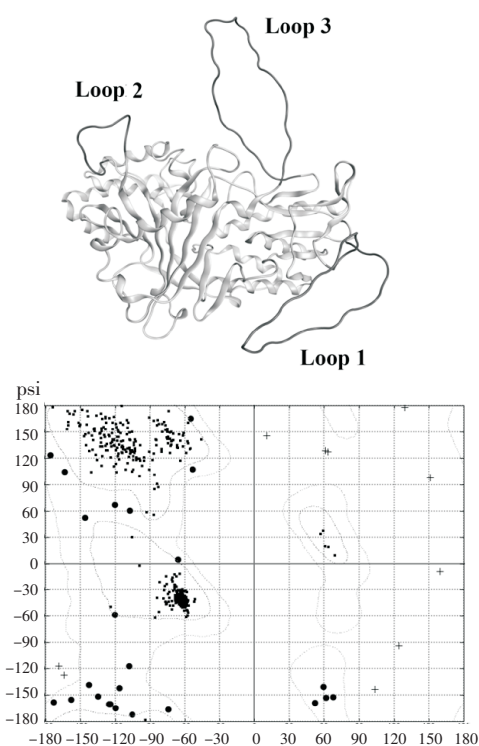
2.1 同源序列搜索与比对 通过同源性搜索发现,已知结构蛋白 CrtI(PDB 编号:4DGK)与 CrtN 的同源性最高,为 31%,序列覆盖范围为 99%。因此,以 CrtI 为模板构建 CrtN 的三维空间结构,二者序列比对结果如图 1。



图1 CrtN与CrtI(PDB号:4DGK)序列比对结果

Fig 1 Sequence alignment of CrtN and CrtI (PDB ID: 4DGK)

2.2 同源建模结果及模型评估 通过 Modeller 同源建模,获得打分最高的 CrtN 结构模型(图 2A),与模板 CrtI C α 的均方根偏差 RMSD 为 6.0 Å。其中核心区域变化比较小,主要偏差发生在蛋白表面 Loop 1~3 区域,此区域的结构在模板中没有被解析出来。Ramachandran 图(图 2B)分析发现模建蛋白 92.8% 的残基 Φ 和 ψ 角落在最佳区域,5%落入许可区域,2.2%落在不允许区域。结果说明,模建结构的氨基酸二面角是合理的。采用 Verify_3D 检验模建蛋白氨基酸序列与其三维结构的兼容性,结果为模型蛋白的验证分值为 155.25,落在期望最低值 103.22 和最高值 229.37 之间,说明模型蛋白无不兼容残基。



■表示相应氨基酸落在最佳区域,●表示在许可区域,+表示在不允许区域

图 2 同源建模获得的 CrtN 三维结构带状图和 CrtN 模建结构的 Ramachandran 图

Fig 2 The ribbon structure of CrtN obtained through homology modeling (A) and its Ramachandran plot (B)

2.3 CrtN 分子动力学模拟 对模建的 CrtN 结构进行 500 ns 的分子动力学优化。从图 3A 可以看出,体系在 100 ns 左右达到平衡,100 ns 后的构象与起始构象的主链 RMSD 平均值在 7.4 Å 左右。而主链的均方根波动 RMSF(图 3-B)揭示出,在 Loop 1(残基 D265~K294)、Loop 2(残基 F335~L347)和 Loop 3(残基 T434~D463)处存在明显的波动,说明该处结构的柔性较其它部分要大得多。对轨迹中最后 100 ns 的构象进行聚类,提取中心构象进行结构分析发

现,与分子动力学优化之前的结构相比,Loop 1~3 区域的结构变得更加有序(图 4-A)。Ramachandran 图(图 4-B)结果表明,优化后 92.2% 的残基 Φ 和 ψ 角落在最佳区域,7.8% 的残基落入许可区域,没有残基落在不允许区域,此结构可以用于后续药物与靶点的相互作用研究。

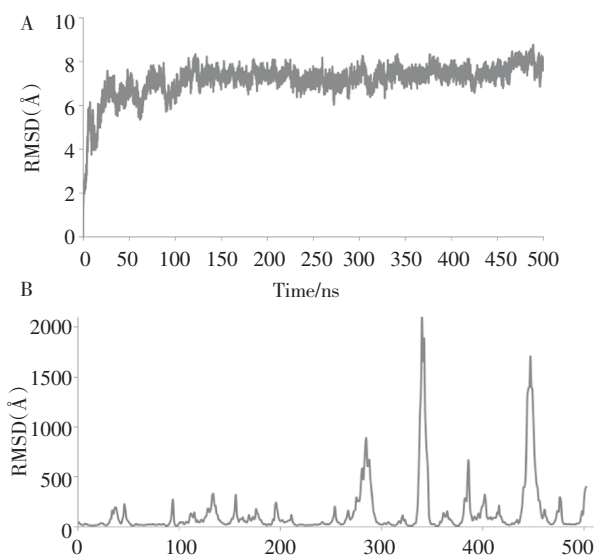
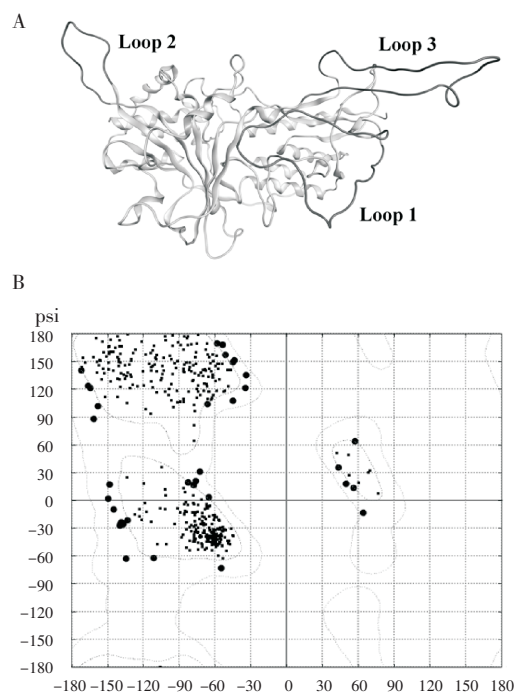


图 3 CrtN 结构进行 500 ns 分子动力学优化的主链 RMSD (A) 和 RMSF (B) 结果

Fig 3 The RMSD (A) and RMSF (B) of the CrtN chain atoms during 500 ns molecular dynamics



■表示相应氨基酸落在最佳区域,●表示在许可区域

图 4 分子动力学优化之后的 CrtN 三维结构带状图和 Ramachandran 图

Fig 4 The ribbon structure of CrtN optimized by molecular dynamics (A) and its Ramachandran plot (B)

2.4 分子对接 利用软件对 CrtN 进行空间搜索得到 4 个可能的活性位点,见表 1,推测 Site 1 为 FAD 的结合位点,Site 4 为底物结合位点。萘替芬是 CrtN 的竞争抑制剂,很可能是与 4,4'-去氢鲨烯竞争性的结合在底物结合位点上。因此,本研究以上述 Site 4 定义活性位点,利用 AutoDock 对接来研究萘替芬与 CrtN 的相互作用机制。对接结果表明,萘替芬结合在由疏水性氨基酸 M51、P53、I55、I85、P146、L311、L376 和极性氨基酸 G52、S147、Y150、Y190、H327、Y354、Y374 形成的空腔中(图 5-A),除了显著的疏水作用以外,萘替芬的叔胺基团还与 Y354

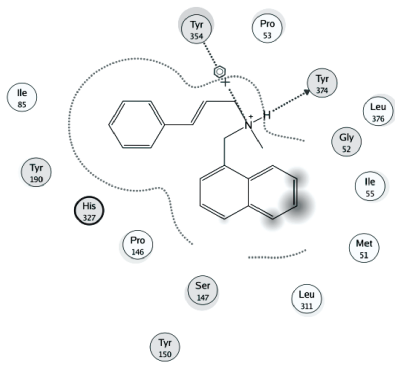
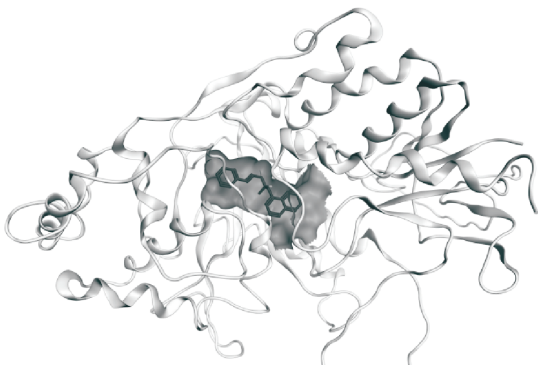
的苯环形成阳离子- π 键,与 Y374 的酚羟基形成氢键(图 5-B),推测此叔胺基是萘替芬的重要药效团。底物 4,4'-去氢鲨烯与抑制剂的结合口袋大致相同。半经验的结合自由能计算得出,萘替芬与 CrtN 之间的结合自由能最低,为-16.78 kcal/mol;底物对 CrtN 的结合自由能最高,为-26.03;经结构改造的化合物 5m 和 8 对 CrtN 的结合自由能相近,这与抑制活性 IC₅₀ 趋势相同(表 2)。以上结果得出,疏水作用、阳离子- π 键作用等是萘替芬对 CrtN 产生抑制活性的重要分子基础,由此推断萘替芬等抑制剂都是可逆性竞争抑制剂。

表 1 对 CrtN 结构进行空间搜索得到的 4 个活性位点

Tab 1 The four active sites detected in CrtN

Site	Size	Residue
1	314	I6, <u>G7</u> , <u>A8</u> , <u>G9</u> , V10, <u>T11</u> , L13, I28, F29, <u>E30</u> , K31, N32, N40, Q41, L42, M51, <u>G52</u> , <u>P53</u> , K145, S147, D148, N151, M152, M221, Y222, A225, Q226, A229, Q230, K233, <u>L241</u> , E244, I245, E246, Q247, I248, D302, L303, D304, Y305, S306, C307, S308, A309, L311, Y374, L376, E381, L382, F426, P428, D430, F431, E432, Q433, Y435, V460, S461, R462, F469, A470, <u>G471</u> , A472, <u>S473</u> , H475, P476, G477, A478, G479, V480, V483, S486
2	163	N151, M152, L155, V156, Q247, S306, C307, P380, E381, L382, K383, T384, G385, S386, T434, Y435, H436, A437, K438, F439, G440, S441, A442, N453, Y454, Y455, R456, P457, Q458, N459, V460, S461, R462, D463, Y464
3	153	G9, V10, L13, E30, N32, N40, Q41, L42, Y222, A225, Q226, A229, Q230, K233, I239, L241, N242
4	100	G52, <u>P53</u> , <u>T54</u> , <u>I55</u> , I85, Y86, R144, <u>P146</u> , F186, Y190, V214, <u>H327</u> , N328, V329, <u>Y354</u> , <u>Y356</u> , <u>Y374</u>

带下划线的氨基酸是通过 CrtI 的活性位点推测出来的 CrtN 中可能与 FAD 或底物结合的氨基酸



A 为萘替芬结合在 Site 4 底物结合位点的空腔中;B 为萘替芬与 CrtN 的相互作用模式图

图 5 萘替芬与 CrtN 的对接结果

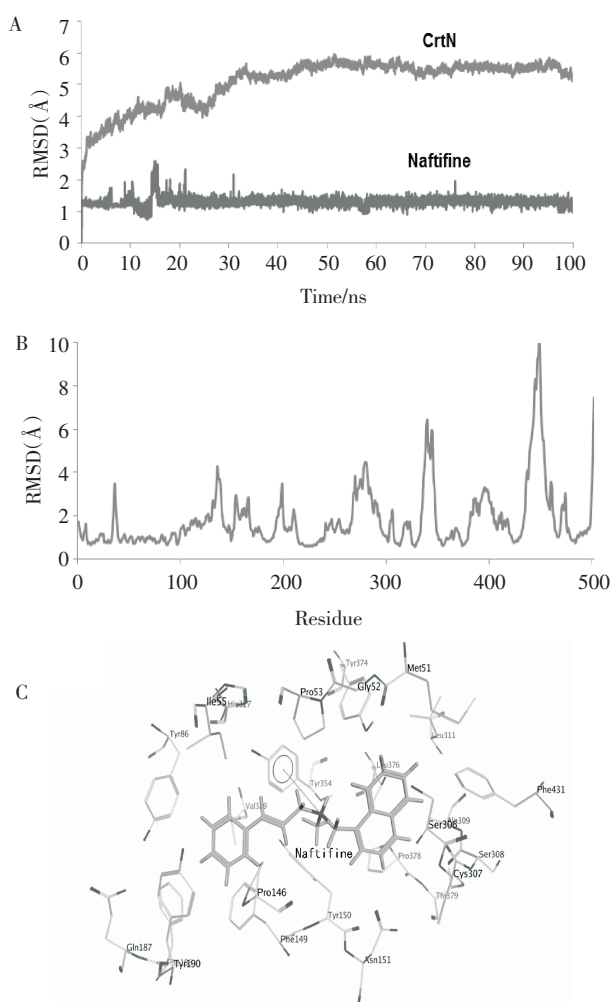
Fig 5 The docking results of CrtN with naftifine

表 2 底物及抑制剂的结构、活性及其与 CrtN 的结合自由能

Tab 2 The structures, activities and binding free energy of the CrtN substrate and inhibitors

项目名称	底物	抑制剂		
	4,4'-去氢鲨烯	萘替芬	5m	8
IC ₅₀ (μmol)	--	8.83 ^[6]	0.34 ^[11]	0.32 ^[12]
结构				
结合自由能(kcal/mol)	-26.03	-16.78	-20.35	-21.05

2.5 复合物分子动力学模拟 为了探究小分子化合物与蛋白结合的稳定性,我们对萘替芬与 CrtN 结合的复合物结构进行了 100 ns 的分子动力学模拟。RMSD 显示,30 ns 之后 CrtN 和萘替芬的构象均趋于稳定(图 6-A)。与 2.3 部分蛋白体系的分子动力学模拟相比,复合物体系中 CrtN 残基的 RMSF 数值显著降低(图 6-B),说明蛋白整体波动性减小,主要波动发生在 Loop 区。经过 100 ns 的分子动力学模拟之后,萘替芬稳定结合在 Site 4 位点,以疏水作用为主,其主要官能团叔胺基还与 Y354 的苯环形成阳离子- π 键(图 6-C)。但是在动力学模拟 30 ns 体系趋于稳定之后,Y374 的位置偏离了萘替芬,导致其酚羟基与萘替芬的叔胺基之间的氢键消失,说明此氢键作用不稳定,推测萘替芬及其类似物主要是以疏水作用和阳离子- π 键作用与 CrtN 结合的。



A. CrtN 主链及萘替芬的 RMSD; B. CrtN 的 RMSF; C. 经过 100 ns 模拟之后,萘替芬与 CrtN 的相互作用模式

图 6 CrtN-萘替芬复合物体系的分子动力学模拟

Fig 6 Results of the molecular dynamics of CrtN -Naftifine complex

3 讨论

金黄色葡萄球菌是人类重要的病原菌,CrtN 蛋白作为一个成药性好的抵抗耐药性金葡菌感染的靶点,具有良好的应用前景。萘替芬是一种丙烯胺衍生物,FDA 批准用于临床抗真菌感染。虽然有研究发现萘替芬是通过抑制鲨烯环氧酶 SE 而导致真菌细胞消解的,但是其中的具体机制仍不明确^[19]。CrtN 是金葡菌中的一种脱氢酶,与 SE 的催化反应类型截然不同,它们的序列同源性只有 10%,但是它们的底物具有类似的骨架结构(脱氢鲨烯和鲨烯)。最近有研究发现,CrtN 也能将鲨烯催化为脱氢鲨烯^[20],因此,CrtN 和 SE 可能具有相同的底物结合机制。但是不管底物还是萘替芬与 SE 的结合机制目前都不明确,无法作为萘替芬与 CrtN 结合机制研究的参考对象。

采用分子对接方法研究抑制剂萘替芬与 CrtN 的相互作用方式,首先要寻找二者的结合位点。Schaub 等^[13]研究者通过将 CrtI 与其同源蛋白 mxPPOX^[21]进行空间结构叠合确定了 FAD 和底物分别与 CrtI 可能的结合位点。考虑到 CrtI 与 CrtN 的同源性,我们将二者的结构叠合,由 CrtI 的活性位点推测出,CrtN 中与 FAD 结合的氨基酸位点可能有:G7、A8、G9、T11、E30、G38、G52、P53、I245、T275、A276、G471 和 S473;与底物结合的氨基酸位点可能有:P53、T54、I55、K145、P146、S147、D148、F149、H327、Y354、Y356 和 Y374。与软件预测的 Site 1~4 位点相比较,我们认为 Site 1 为 FAD 的结合位点,Site 4 为底物结合位点。

本研究对获得的 CrtN 三维结构进行活性位点搜索,结合文献挖掘分析确定 Site 4 位点为 CrtN 的底物结合位点。萘替芬是 CrtN 的可逆性竞争抑制剂,其作用位点很可能也在 Site 4 处。通过分子对接及动力学模拟,我们探究了萘替芬与 CrtN 的相互作用模式,推测萘替芬主要是通过疏水作用和静电作用与 CrtN 的底物竞争性结合从而发挥抑制作用的,但是由于分子对接及动力学模拟方法的局限性,无法研究抑制剂与酶作用过程中是否有化学键的断裂和生成,只能后续通过量子化学计算方法进一步研究。

综上,本研究采用同源模建方法首次模建了 CrtN 的三维结构,并用分子动力学模拟的方法对初始结构进行优化,然后利用分子对接和动力学模拟方法研究萘替芬抑制 CrtN 的机制。结果阐明了疏水作用和阳离子- π 键作用是萘替芬对 CrtN 产生抑制活性的重要分子基础。以上研究结果为进一步研究 CrtN

的结构与功能关系提供了理论依据,同时为萘替芬类抑制剂的进一步结构优化指明方向,也为开展全新药物设计提供思路。

参考文献:

- [1] Lowy F D. Staphylococcus aureus infections[J]. N Engl J Med, 1998, 339(8): 520
- [2] Kloos W E, Jorgensen J H. Staphylococci. in Manual of Clinical Microbiology[M]. edn. 4. Washington DC: American Society for Microbiology, 1985:143-153
- [3] Liu C I, Liu G Y, Song Y, et al. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks Staphylococcus aureus virulence[J]. Science, 2008, 319 (5868): 1391
- [4] Clauditz A, Resch A, Wieland K P, et al. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of Staphylococcus aureus and its ability to cope with oxidative stress[J]. Infect Immun, 2006, 74(8): 4950
- [5] Liu G Y, Essex A, Buchanan J T, et al. Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity[J]. J Exp Med, 2005, 202(2): 209
- [6] Chen F, Di H, Wang Y, et al. Small-molecule targeting of a diapophytoene desaturase inhibits S. aureus virulence[J]. Nat Chem Biol, 2016, 12(3): 174
- [7] Liu G Y, Essex A, Buchanan J T, et al. Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity[J]. J Exp Med, 2005, 202(2): 209
- [8] Pelz A, Wieland K P, Putzbach K, et al. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from Staphylococcus aureus[J]. J Biol Chem, 2005, 280(37): 32493
- [9] Kim S H, Lee P C. Functional expression and extension of staphylococcal staphyloxanthin biosynthetic pathway in Escherichia coli[J]. J Biol Chem, 2012, 287(26): 21575
- [10] 陈菲菲, 狄红霞, 蓝乐夫. 金黄色葡萄球菌重要毒力因子的功能及其抑制剂研究进展[J]. 科学通报, 2013, 58(36): 3743
- [11] Wang Y, Chen F, Di H, et al. Discovery of potent benzofuran-derived diapophytoene desaturase (CrtN) inhibitors with enhanced oral bioavailability for the treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) infections[J]. J Med Chem, 2016, 59 (7): 3215
- [12] Wang Y, Di H, Chen F, et al. Discovery of benzocycloalkane derivatives efficiently blocking bacterial virulence for the treatment of methicillin-resistant S. aureus (MRSA) infections by targeting diapophytoene desaturase (CrtN)[J]. J Med Chem, 2016, 59(10): 4831
- [13] Schaub P, Yu Q, Gemmecker S, et al. On the structure and function of the phytoene desaturase CRTI from Pantoea ananatis, a membrane-peripheral and FAD-dependent oxidase/isomerase [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39550
- [14] Webb B, Sali A. Comparative protein structure modeling using Mod[J]. Cur Bio Inform, 2014, 47(47): 5
- [15] Kleywegt G J, Jones T A. Phi/psi-chology: Ramachandran revisited[J]. Structure, 1996, 4(12): 1395
- [16] Eisenberg D, Luthy R, Bowie J U. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles [J]. Methods Enzymol, 1997, 277: 396
- [17] 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
- [18] Morris G M, Goodsell D S, Halliday R S, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. J Comput Chem, 1998, 19(14): 1639
- [19] Gupta A K, Ryder J E, Cooper E A. Naftifine: a review[J]. J Cutan Med Surg, 2008, 12(2): 51
- [20] Furubayashi M, Li L, Katabami A, et al. Construction of carotenoid biosynthetic pathways using squalene synthase[J]. FEBS Letters, 2014, 588(3): 436
- [21] Corradi H R, Corrigall A V, Boix E, et al. Crystal structure of protoporphyrinogen oxidase from Myxococcus xanthus and its complex with the inhibitor acifluorfen[J]. J Biol Chem, 2006, 281(50): 38625

(2016-05-11 收稿)