

## Bcl-2 蛋白与 Bak 蛋白肽片段复合物的三维结构建模与分析

郑灿辉,周有骏\*,朱 驹,陈 军,李耀武,盛春泉,宋云龙,蒋庆锋,吕加国

(第二军医大学药学院药物化学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的:探讨抗肿瘤药物新靶点 Bcl-2 蛋白与底物蛋白的相互作用。方法:以同源建模的方法构建 Bcl-2 蛋白与底物 Bak 蛋白的肽片段的复合物的三维结构,并对此结构模型的合理性进行验证。比较复合物结构模型中 Bcl-2 的活性腔与自由状态结构的差异,分析它与底物肽相互作用的重要位点和残基,并计算它与两类抑制剂的分子对接。结果:构建的 Bcl-2 复合物结构模型合理,通过比较发现建模的结构模型中活性腔特别是 3 前后的部位与自由状态有较大的结构变化,蛋白活性腔侧部的一些酸性碱性极性残基及底部的一些疏水残基对于结合底物蛋白并发挥功能非常关键,这些结果与生物学残基突变实验数据得到了较好的相互验证。结论:本研究构建了合理的 Bcl-2 蛋白与底物 Bak 蛋白肽片段的复合物的三维结构。

[关键词] Bcl-2 蛋白;同源建模;分子对接

[中图分类号] R 914; O 641 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1085-04

### Bcl-2 protein fusion with Bak Peptide: homology modeling and analysis

ZHENG Can-hui, ZHOU You-jun\*, ZHU Ju, CHEN Jun, LI Yao-wu, SHENG Chun-quan, SONG Yun-long, JIANG Qing-feng, LÜ Jia-guo (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the interactions between Bcl-2 protein, a new target for anticancer agents, and its substrate proteins. **Methods:** A homologous 3D model of Bcl-2 protein fusing with Bak peptide was established and the reliability of the model was assessed. The active-site cavities of Bcl-2 in the complex and in free state were compared. The key residues and the active sites of Bcl-2 protein for interaction with the substrates were identified, and their fusion with 2 representative inhibitors was analyzed. **Results:** The constructed complex had a reliable structure. Obvious changes were found in the active sites of Bcl-2 protein in the constructed complex, especially in the regions around 3. The acid and basic residues on the side of active sites and the hydrophobic residues in the bottom of active sites were important for binding with the substrate proteins, which accorded well with the results of biological residue mutation experiments. **Conclusion:** We have successfully constructed a reliable complex model of Bcl-2 protein binding with Bak peptide.

[KEY WORDS] Bcl-2 protein, homology modeling, molecular docking

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10):1085-1088]

Bcl-2 蛋白家族对细胞凋亡通路起着重要的调节作用。许多肿瘤中可见 Bcl-2 蛋白的过度表达,研究表明包括 Bcl-2 在内的抗凋亡亚家族成员的过度表达阻止了正常的生理凋亡,是肿瘤产生及发生耐药的重要原因之一<sup>[1]</sup>。

近些年研究者对 Bcl-2 蛋白家族的作用机制进行了大量探索,发现其抗凋亡亚家族成员(包括 Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白)是通过与促凋亡亚家族成员(包括 Bak、Bad 蛋白)结合来发挥作用的。残基突变实验<sup>[2]</sup>证明前者表面的疏水凹槽非常重要,它通过和后者 Bcl-2 蛋白家族保守区域(BH)3 结合而发生相互作用。已得到的 Bcl-x<sub>L</sub> 与 Bak、Bad 的 BH3 肽段结合的复合物高分辨三维结构(PDB 编号分别为 1BXL, 1G5J)<sup>[3,4]</sup>进一步证实了这一点。从 Bcl-2 蛋白家族发挥作用的分子机制可见,干扰 BH3 区域与过度表达的 Bcl-2 的表面疏水凹槽的结合将促进

肿瘤细胞的凋亡是抗肿瘤治疗的新策略。

通过同源蛋白 Bcl-x<sub>L</sub> 的相关结构比较<sup>[3-5]</sup>可推测 Bcl-2 活性腔在结合底物蛋白或肽时结构发生了较大的诱导契合,其复合物的结构变化甚至比 2 个蛋白自由状态结构之间的差别还大(根据结构 C 原子的均方根偏差值)。因此本研究采用其高度同源蛋白对应复合物结构<sup>[3]</sup>为模板,通过建模的方法构建 Bcl-2 与底物肽的复合物三维结构模型,就其合理性加以验证,详细分析了它与自由状态结构 1 G H<sup>[6]</sup> 的差异,探讨它与底物肽相互作用的重要位

[基金项目] 第二军医大学博士创新基金(2005 年度)。Supported by the Innovation Fund for Doctorate Candidates of Second Military Medical University(for 2005)。

[作者简介] 郑灿辉,博士生, E-mail: canhui\_zheng@yahoo.com.cn  
\*Corresponding author. E-mail: zhouyoujun2006@yahoo.com.cn

点和残基,并计算它与几类抑制剂<sup>[7]</sup>的分子对接。

## 1 材料和方法

1.1 序列来源和设备 本研究中同源模建的模板 Bcl-x<sub>L</sub> 和 Bak 的 BH3 肽片段的复合物 NMR 结构 (1BXL) 和 Bcl-2 自由状态结构 1GJH 从 Brookhaven Protein Databank (PDB) 数据库中获取。Bcl-2 和 Bcl-x<sub>L</sub> 全长序列数据 (编号分别为 P10415, Q07817) 从 SWISSPROT 数据库中获取。所有的计算在 Origin300 服务器上由 SYB YL6.9 (TRIPOS 公司,美国)、Insight 2000 (Accelry 公司,美国)、Autodock3.05<sup>[8]</sup> 软件包完成。

### 1.2 三维结构模型构建

1.2.1 序列联配 采用 Insight 2000 中 Align2D 模块联配 Bcl-2 与 Bcl-x<sub>L</sub> 的序列,确定序列的一致性和相似性。计算时设置打分矩阵为 Blosum62 和合适的插入罚分和空位延伸罚分值,并根据已有的经验知识对联配结果进行手工调整。

1.2.2 建立模型 根据 1.2.1 项下序列联配结果用 Insight 2000 的 Modeler 模块构建蛋白的结构模型。共运行了 50 次 Modeler 计算,在建模过程中采用中等优化水平,并生成全氢。接着用考察三维结构与氨基酸序列兼容性的 Profile-3D 程序对得到的结构模型进行初步评价打分。

1.2.3 能量优化及合理性评价 选择初步评价较好的结构模型在 SYB YL6.9 中进行能量优化,以消除结构中不合理的碰撞和张力。能量计算相关参数设置如下:Amber95 (4.1) 力场,Amber 95\_All 电荷,考虑 1.2 nm 范围内的非键相互作用,介电常数为  $4r$  ( $r$  为电荷间距离)。能量优化采用逐步放开的策略,先优化所有的侧链,而后是除 Bak 肽片段骨架以外的所有原子,最后是整个蛋白,最终优化至能量梯度收敛于  $20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$ 。优化后的结构模型用 Profile-3D 和 Ramachandran 图来验证其合理性。

1.3 蛋白结构的叠合 将建模得到的结构模型与 Bcl-2 自由状态的核磁结构 (1GJH) 以靶点蛋白不包括 N 端、C 端和环区的所有残基 (N11-D34、V92-G203) 的 C 原子为叠合点进行叠合,观察 Bcl-2 蛋白活性腔骨架及关键残基位置的改变。

1.4 分子对接 用 SYB YL6.9 构建抑制剂分子结构,进行分子力学优化和模拟退火计算,选取代表性低能构象用于下一步的分子对接研究。

采用 Autodock3.05 将 2 个抑制剂对接到 Bcl-2 建模结构的活性腔中。受体蛋白的格点盒子的大小

以包括复合物中肽底物为标准,用 Autogrid 程序自动生成打分的格点文件。运用 Lamarckian 遗传算法,将局部能量搜索与遗传算法相结合,以半经验势函数作为能量打分函数<sup>[8]</sup>,对小分子构象和位置进行全局搜索,对每个配体进行 50 次独立的对接实验。对配体的 50 次对接结果进行成簇分析,最后依据最低对接能和成簇分析的情况来选取合理的蛋白抑制剂结合模式。接着用 SYB YL6.9 的 Minimize Subset 模块对抑制剂蛋白对接复合物进行局部优化。

## 2 结果

2.1 序列联配及同源模建结果 本研究序列联配结果表明 Bcl-x<sub>L</sub>、Bcl-2 的全长序列一致性为 40.1%,相似性达到 50.9%,且已知对于生物功能非常重要的 BH1-4 区域内的序列一致性更高。说明通过 1BXL 结构来模建 Bcl-2 复合物的结构在理论上是合理的。

建模得到的结构模型示意图如图 1,用 Ramachandran 图和 Profile-3D 对其进行了评价。分析 Ramachandran 图发现主链二面角、落于最佳区域的残基占 90.8%,落于附加允许区域的占 7.2%,落于一般允许区域的占 1.3%,而落于不允许区域的只占 0.7%,说明了蛋白主链结构合理。用 Profile-3D 评价的结果显示没有不兼容残基 (所有兼容分值 > 0),总得分为 88.26 大于预期值 78.38,说明得到的三维结构与氨基酸序列兼容性非常好。以上结果均说明得到的蛋白结构模型非常合理。

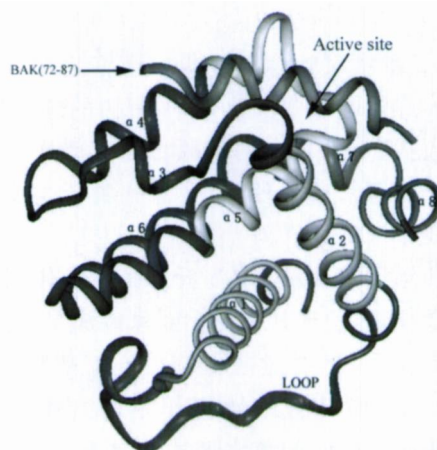


图 1 建模的 Bcl-2 复合物结构的条带示意图

Fig 1 Ribbon sketch of modeling Bcl-2 complex structure

### 2.2 Bcl-2 复合物结构模型及其活性腔的结构特征

2.2.1 Bcl-2 复合物三维结构总体特征 建模得到的复合物中 Bcl-2 的拓扑结构是由 7 个螺旋通过

不同长度环区连接而组成(图 1)。其中 2 个疏水的螺旋(5、6)构成了蛋白的核心,它们两侧分别被接近平行的两性螺旋(3、4)和(1、2)包围,而以接近垂直方向包绕这 2 个核心螺旋的是 7、8。模建得到的 Bcl-2 复合物结构中 Bak 的 BH3 肽片段形成螺旋结合于蛋白靠近 2、3、4、5 和 8 的一侧。

2.2.2 Bcl-2 活性腔的重要位点和残基 如图 2 所示,蛋白表面结合 Bak 的 BH3 肽的活性腔是一个开口较大,内部有 3 个较深口袋 P1、P2、P3 的狭长腔(体积为  $0.365 \text{ nm}^3$ )。它是由在空间上互相靠近的 BH1~3 区域与 3、4 共同构成的。BH1(136~155)包括部分 4、5 及它们之间的环区,BH2(187~202)包括了 7 和 8,BH3(93~107)包括了大部分的 2。

分析复合物的结构发现 Bak 的 BH3 肽形成的螺旋一侧的 4 个疏水性残基 Val74、Leu78(P1)、Ile81(P2)、Ile85(P3)分别指向活性腔内的疏水口袋,与底部的疏水残基及一些其他残基的疏水部分发生疏水作用。复合物中 Bcl-2 的碱性酸性残基 Arg146 和 Glu136 分别靠近 Bak 肽上呈相反性质的残基 Asp83 和 Arg76,相互以静电作用相结合。另外位于蛋白活性腔一侧,侧链指向活性腔内部的 Tyr202 可以与底物肽的骨架原子形成氢键结合。

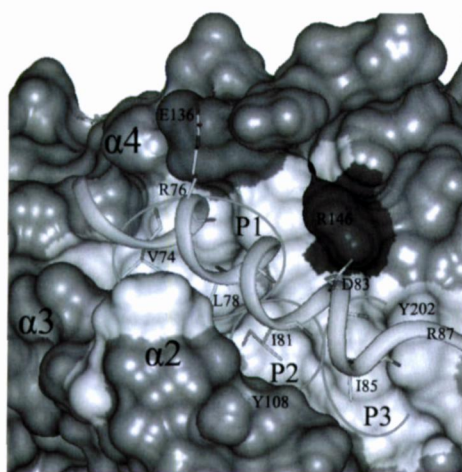


图 2 Bcl-2 结合 Bak 肽段的活性腔表面示意图

Fig 2 Surface sketch of active sites of Bcl-2 bound to Bak peptide

2.2.3 模建复合物结构与自由状态结构比较 如图 3 所示,通过叠合比较模建的结构模型和 Bcl-2 自由状态的核磁结构(1GJH),发现蛋白活性腔结构变化最显著的部位位于 3 前后的部位(R109-A126)。在复合物结构中 3 前后部位的骨架向活性腔外侧

移动,而 2 C 端和 3 分别有一定程度的增加和解开螺旋。这些骨架的变化使得蛋白活性腔的开口变大,能更好地容纳底物肽,使它们结合得更充分。另外 4 与 5 之间转角及 8 靠近 C 末端的部位也有一定程度的变化。

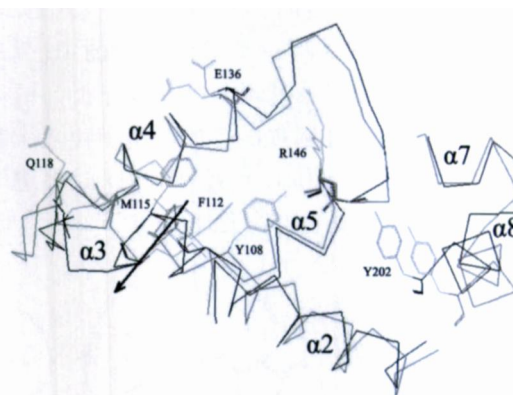


图 3 2 个 Bcl-2 结构在活性腔部位的 C 叠合图

Fig 3 Superimposed C sketch of active sites in 2 Bcl-2 structures

The structures of free Bcl-2 (1GJH) are colored in light gray. Arrow indicate the dominant changing direction of the complex(free Bcl-2) backbone

复合物结构中 3 附近的重要残基位置发生了较大的改变。如 2 C 末端的 Y108,它的显著改变使得蛋白能更好地容纳作用于 P2 的底物肽中的疏水残基 Ile81,这个改变也可能是促使 2 C 末端螺旋延长的原因。此部位内还有几个参与构成疏水位点的残基(F112、M115、Q118)也发生了较大的位置改变。另外位于活性腔侧部的关键残基 E136、R146 和 Y202 的 C 原子的位置或侧链在蛋白结合底物后也发生较大的变化。而构成除 3 附近外其他部位疏水位点的关键疏水残基在复合物结构中变化较小,使得活性腔这些疏水位点的形状变化不大。

2.3 抑制剂对接计算结果 为了证实我们模建的 Bcl-2 复合物结构的合理性以及初步研究 Bcl-2 与小分子抑制剂的结合情况,我们计算了 Bcl-2 与两类抑制剂的分子对接。对接计算得到的结合自由能 CG 的为  $-29.887 \text{ kJ/mol}$ ,比 HA14-1 的  $-20.691 \text{ kJ/mol}$  低,和已知前者亲和力( $IC_{50}$  为  $0.230 \mu\text{mol/L}$ )比后者( $IC_{50}$  为  $9 \mu\text{mol/L}$ )高的实验结果吻合。

由图 4 可见,CG 的 2 个苯环分别深入蛋白活性腔 P2、P3 口袋形成疏水作用,结构中的多个酚羟基分别与 Arg146、Glu136、Asp111 的侧链形成氢键。另外 CG 的没食子酸部分的苯环与 Tyr202 侧链接近平行,它们之间有一定的苯环堆积作用,这一作用在设计新的抑制剂时值得考虑。而 HA14-1 的骨架

环和疏水侧链占据了活性腔的 P1 口袋形成疏水作用,结构中的氨基与 Glu136 的侧链形成了氢键,而略带负电性的氯原子靠近带正电的 Arg146。由于活性腔较大,2 个抑制剂都仅占据了活性腔的部分区域,设计与活性腔有更充分结合的较长抑制剂将具有更高的亲和力。如已知实际结合模式的 N-酰基磺酰胺类抑制剂<sup>[9]</sup>跨越了活性腔的 P1-3 疏水口袋形成疏水氢键等多个作用,就具有很高的亲和力。蛋白与这几类抑制剂结合的残基和位点大部分都包括 2.2.2 的重要位点和残基中,同时也进一步说明 Bcl-2 复合物模建结构合理。

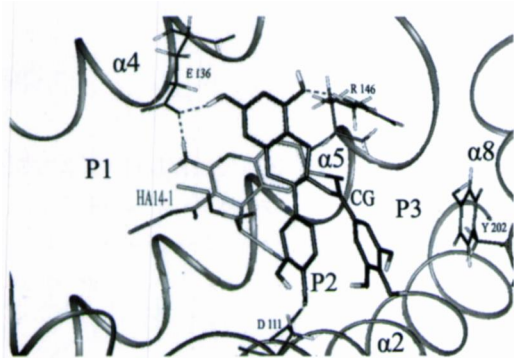


图 4 CG, HA14-1 与 Bcl-2 的对接结合模式

Fig 4 Binding mode of CG and HA14-1 to Bcl-2

The residues shown are key residues surrounding the ligands. The hydrogen bonds are indicated with dotted lines. The protein structure is from CG/Bcl-2 complex

### 3 讨论

本研究通过同源模建的方法构建了 Bcl-2 蛋白与底物 Bak 蛋白的肽片段的复合物的三维结构。构建蛋白和肽片段复合物的方法可以先模建蛋白部分,然后将肽片段对接到蛋白相应部位,最终用能量优化的方法来构建较合理的结构。而本研究中由于模板中具有肽片段的对应结构,因此直接将底物肽片段部分一起模建,这样更有利于复合物模型中两部分接触面上的残基符合空间约束条件以及具有合理的立体化学几何。本研究还对对接后的模型进行了局部能量优化,这在一定程度上模拟了抑制剂对蛋白的诱导效应,使得抑制剂的结合模式更加合理。

验证结果表明所构建的 Bcl-2 复合物结构模型合理,通过分析模建的结构模型得到蛋白与底物蛋白结合后在活性腔特别是 3 前后的部位发生了较大的结构改变,蛋白活性腔侧部的一些酸性碱性极性残基及底部的一些疏水残基对于结合底物蛋白发挥功能非常关键。通过测试 Bak BH3 肽的 Ala 突

变体分别与 Bcl-2 和 Bcl-x<sub>L</sub> 的亲和力,证实底物肽形成的疏水作用和两个静电作用对于结合的确很重要<sup>[3, 10]</sup>。残基突变实验<sup>[2, 3]</sup>和特征序列 NWGR 在 Bcl-2 蛋白家族中高度保守<sup>[11]</sup>也进一步验证了活性腔 R146 的重要性。

这些结果与生物学残基突变实验数据得到了较好的相互验证。本研究还计算了几类抑制剂的分子对接,进一步证实了模建的 Bcl-2 复合物结构的合理性,也初步了解了它们与 Bcl-2 的结合模式。这对于我们深入理解生理情况下 Bcl-2 蛋白与底物蛋白相互作用的分子机制,及指导设计竞争性抑制该相互作用的小分子抑制剂具有较大意义。

### [参考文献]

- [1] Reed JC, Miyashita T, Takayama S, et al. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy[J]. *J Cell Biochem*, 1996, 60: 23-32.
- [2] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax[J]. *Nature*, 1994, 369: 321-323.
- [3] Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, et al. Structure of Bcl-x<sub>L</sub>-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis[J]. *Science*, 1997, 275: 983-986.
- [4] Petros AM, Nettlesheim DG, Wang Y, et al. Rationale for Bcl-x<sub>L</sub>/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies[J]. *Protein Sci*, 2000, 9: 2528-2534.
- [5] Muchmore SW, Sattler M, Liang H, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-x<sub>L</sub>, an inhibitor of programmed cell death[J]. *Nature*, 1996, 381: 335-341.
- [6] Petros AM, Medek A, Nettlesheim DG, et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 3012-3017.
- [7] 郑灿辉,朱 驹,周有骏,等. Bcl-2 蛋白家族作用机制及其抑制剂的研究[J]. *药学进展*, 2004, 28: 97-103.
- [8] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. *J Comp Chem*, 1998, 19: 1639-1662.
- [9] Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours[J]. *Nature*, 2005, 435: 677-681.
- [10] Zha J, Harada H, Osipov K, et al. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-x<sub>L</sub> and pro-apoptotic activity[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 24101-24104.
- [11] Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644: 83-94.

[收稿日期] 2006-06-09

[修回日期] 2006-10-06

[本文编辑] 尹 茶