

• 研究论文 •

FKBP12 蛋白与其抑制剂结合的分子动力学模拟和结合自由能计算

扈国栋 张少龙* 张庆刚
(山东师范大学物理与电子科学学院 济南 250014)

摘要 FKBP12 (FK506-binding protein-12)是一种具有神经保护和促神经再生作用的蛋白. 采用分子动力学模拟取样, 运用 MM-GBSA 方法计算了 FKBP12 和 3 个抑制剂(GPI-1046, **308** 和 **107**)的绝对结合自由能, GPI-1046 的结合能最小, **308** 小于 **107** 的结合能. 通过能量分解的方法考察了 FKBP12 蛋白的主要残基与抑制剂之间的相互作用和识别, 计算结果表明: 3 个抑制剂具有相似的结合模式, Ile56 和 Tyr82 主要表现为氢键作用, Tyr26, Phe46, Val55, Ile56, Trp59, Tyr82, Tyr87 和 Phe99 形成疏水作用区. 计算结果和实验结果吻合.

关键词 分子动力学; MM-GBSA; 结合自由能; FKBP12; 抑制剂

Molecular Dynamics Simulations and Free Energy Calculation of FKBP12 Protein and Its Inhibitors

Hu, Guodong Zhang, Shaolong* Zhang, Qinggang
(College of Physics and Electronics, Shandong Normal University, Jinan 250014)

Abstract FKBP12 (FK506-binding protein-12) plays important roles in the treatment of nerve injuries and neurodegenerative disorders. In the paper, the absolute binding free energies of FKBP12 with three potent inhibitors (GPI-1046, **308** and **107**) were calculated by molecular dynamics simulations with an MM-GBSA method, finding that GPI-1046 has the weakest binding energy, and **308** has weaker binding energy than **107**. The analysis of detailed interaction energies provides insight into the protein-ligand binding mechanism. The results show that the three inhibitors bind to FKBP12 in very similar binding models, the inhibitors form hydrogen bonds with Ile56 and Tyr82, and the hydrophobic pocket is formed by Tyr26, Phe46, Val55, Ile56, Trp59, Tyr82, Tyr87 and Phe99. The calculated data agree well with the experimental ones.

Keywords molecular dynamics; MM-GBSA; binding free energy; FKBP12; inhibitor

FKBPs (FK506-binding proteins) 属于亲免疫素 (immunophilin) 家族, 具有异构酶活性, 可催化结合肽及蛋白底物的肽-脯氨酸顺反子的转换. 该家族蛋白可以与免疫抑制剂结合^[1~3]. FK506 是一种免疫抑制剂, CalcineurinB 和 FKBP12 的结合区为效应区, FKBP12 和 FK506 结合的部分为结合区. 研究发现 FK506 具有神经保护和促神经再生的作用^[4~6], FKBP12 与神经细胞再生过程相关, 并且其在神经系统中的浓度高于其在免疫系统中的浓度^[7], 所以可以以 FKBP12 为基础寻找神经退化

性疾病预防药物的. 研究表明 FK506 的神经营养活性只与其结合区的结构有关^[8~10]. 基于 FK506 与 FKBP12 结合的结构特征, 研究只具有神经营养活性而没有免疫抑制作用的小分子化合物, 对于治疗中风后遗症、中枢神经末梢创伤和神经变性紊乱, 如帕金森氏症和老年痴呆症具有重要意义^[11]. 1997 年 Steiner 等^[12]合成 GPI-1046[即 3-pyridin-3-ylpropyl-(2S)-1-(3,3-dimethyl-2-oxo-pentanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylate]抑制剂; 2003 年饶子和小组^[11]合成了 (3R)-4-(p-Toluenesulfonyl)-1,4-thiazane-3-carboxylic

* E-mail: slzhan@sdu.edu.cn

Received April 30, 2008; revised November 24, 2008; accepted January 13, 2009.

国家自然科学基金(Nos. 10474060, 10504017)和山东省自然科学基金(No. Q2006A06)资助项目.

acid-*L*-leucine ethyl ester(简记作 **308**)和(3*R*)-4-(*p*-Toluenesulfonyl)-1,4-thiazane-3-carboxylic acid-*L*-phenylalanine benzyl ester(简记作 **107**)抑制剂, 并与其它抑制剂进行了比较. FKBP12 的活性位点如图 1 所示, 抑制剂分子的分子结构见图 2, 结合模式见图 3, FKBP12 蛋白主要通过 Ile56 和 Tyr82 与抑制剂形成氢键, Tyr26, Phe46, Val55, Tyr59, His87 和 Ile90 形成疏水作用区^[15]. 了解 FKBP12 和抑制剂间原子水平上的作用模式, 对于设计更有效的抑制剂具有重要的意义.

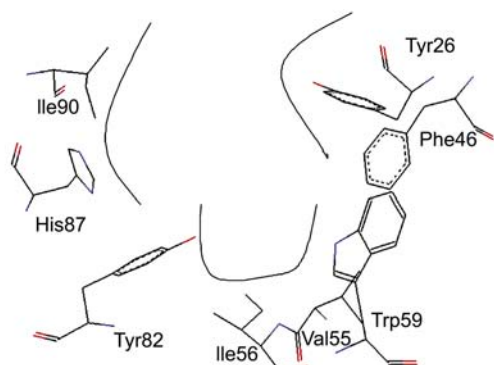


图 1 FKBP12 的活性位点

Figure 1 The schematic representation of the active site of FKBP12

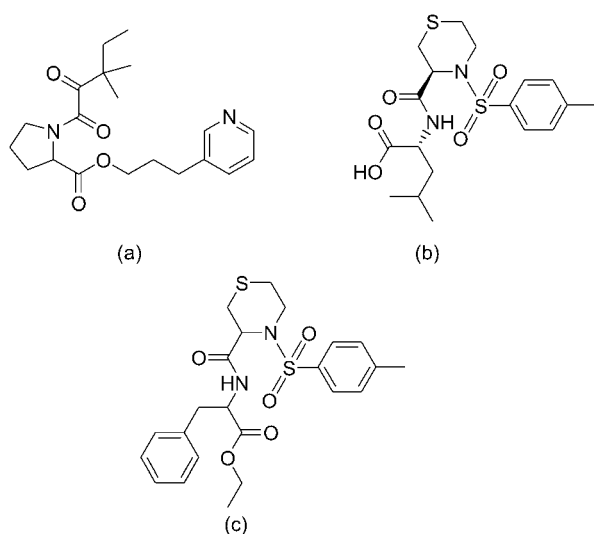


图 2 抑制剂 GPI-1046 (a), **308** (b)和 **107** (c)的分子结构

Figure 2 Molecular structure of the inhibitors GPI-1046 (a), **308** (b) and **107** (c)

分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟和自由能计算是目前研究生物分子的结构及其动力学和热力学性质的重要工具. 准确的自由能预测能更好地理解生物分子的结构和功能, 有助于合理的药物设计. 在过去的 20 多年中, 人们对自由能计算方法进行了广泛的研究, 提出了多种有效的计算方法, 其中 MM-PBSA/GBSA 方法是目前应用很广的一种基于经验方程的自由

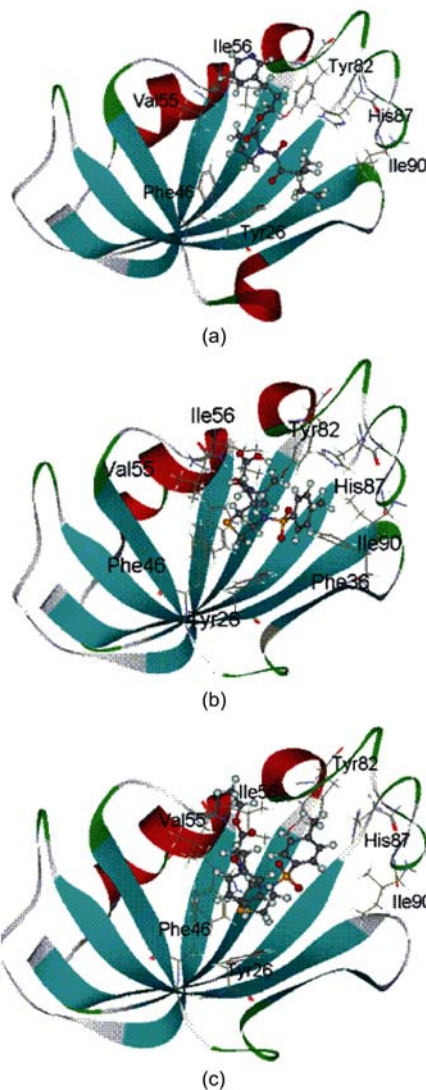


图 3 GPI-1046 (a), **308** (b), **107** (c)和 FKBP12 的结合模式

Figure 3 The binding models of FKBP12 and inhibitors GPI-1046 (a), **308** (b) and **107** (c)

能计算方法^[13,14]. 这种方法主要是利用动力学取样, 把能量分解成真空下的范德华作用能、静电作用能、溶剂化能和构象变化引起熵变的作用. 该方法已经广泛应用到生物大分子与大分子以及大分子与小分子相互作用的体系.

本文采用分子动力学取样, 用 MM-GBSA 方法计算了 FKBP12 蛋白和 GPI-1046, **308**, **107** 三个抑制剂的结合能, 采用其他计算方法研究了蛋白和这三个抑制剂间的结合模式, 研究结果和饶子和等^[11]的结果很好符合.

1 模型与计算

1.1 分子动力学模拟

分子动力学(MD)模拟的初始构象取自蛋白质库, 分别是 FKBP12 单体^[16] (PDB ID: 1FKS), FKBP12-GPI-1046

复合物^[12](PDB ID: 1F40), FKBP12-308 复合物^[11] (PDB ID: 1J4I) 和 FKBP12-107 复合物^[11] (PDB ID: 1J4I). FKBP12 蛋白的参数取自 Amber 的 FF03^[17]力场, 小分子抑制剂的参数取自 Amber 的 GAFF^[18]力场. 小分子抑制剂各原子的部分电荷先用 Gaussian 03^[19]在 HF/6-31G*水平上计算静电势, 再用 Amber 中的 RESP^[20]电荷拟合程序算出.

分子动力学(MD)模拟采用 Amber9^[21]中的 sander 程序. 先对四个模拟体系在真空中进行优化, 以除去原子间过近的接触, 再在四个模拟体系外加上 1.2 nm 的 TIP3P^[22]水分子层以模拟溶剂, 为使系统呈电中性, 加入了一个氯离子. 在模拟过程中, 先约束溶质[约束力常数为 2.1×10^5 kJ/(mol·nm²)]对系统进行 500 步的最陡下降法, 500 步的共梯度法优化, 然后在 70 ps 内把系统从 0 K 加热到 300 K, 随后进行 90 ps 的常温 300 K, 常压 101 kPa 的动力学平衡, 最后是无限制的 2.5 ns 的分子动力学演化. 为了能以较长的步长进行模拟, 采用 SHAKE^[23]法限制所有含氢原子键的伸缩, 模拟使用的步长是 2 fs, PME^[24]方法用来计算长程的静电相互作用, 使用了周期性边界条件, 非键相互作用的截距(cutoff)为 1.2 nm. 在模拟过程中, 监测了系统的总能量、温度、密度随时间波动的情况, 计算了 FKBP12 主链原子相对于最初构象的均方根偏差(RMSD).

1.2 MM-GBSA 自由能计算

用 MM-GBSA 方法计算了 FKBP12 和抑制剂的结合自由能. 该方法从复合物的 MD 模拟轨迹中每隔一定的时间间隔取出体系的结构, 通过式(1)计算出平均结合自由能.

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{protein}} + G_{\text{ligand}}) \quad (1)$$

其中 ΔG_{bind} 是结合自由能, G_{complex} , G_{protein} 和 G_{ligand} 分别是复合物、蛋白质和抑制剂的自由能. 它们各自通过对气相下的内能 E_{gas} , 溶剂化自由能 G_{sol} 和熵的贡献 TS 三项求和得到.

$$E_{\text{gas}} = E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{ele}} \quad (2)$$

E_{gas} 是标准力场能, 它包括成键的键伸缩能 E_{bond} , 键角弯折能 E_{angle} 和二面角扭转能 E_{torsion} 以及非成键的范德华能 E_{vdw} 和静电能 E_{ele} .

$$G_{\text{sol}} = G_{\text{el}} + G_{\text{nonel}} \quad (3)$$

G_{sol} 是溶剂化能, 包括极性溶剂化能 G_{el} 和非极性溶剂化能 G_{nonel} , 通过广义波恩(Generalized Born, GB)模型^[25]计算了极性溶剂化能 G_{el} , 非极性部分 G_{nonel} 通过经验公式 $G_{\text{nonel}} = \gamma \text{SASA} + b$ ^[26]得到, 溶剂的可接触表面积(SASA)

采用 LCPO 方法计算, 本研究中 $\gamma = 3.01$ kJ/(mol·nm²), $b = 0$. $T\Delta S$ 项采用正则模分析法用 Amber9 程序中的 Nmode 模块计算.

1.3 能量分解

能量分解采用 GBSA (generalized Born/surface area) 方法, 这一方法把各个残基对能量的贡献近似分为分子力学方法计算的真空分子内能、GB 模型计算的极性溶剂化能和 LCPO^[27,28]模型计算的非极性溶剂化能, 并且把能量分解到残基的主链原子和侧链原子上. 能量分解可以考察蛋白中各残基对结合抑制剂所做的贡献, 以确定与抑制剂结合中起主要作用的残基, 作用的强弱, 作用的性质等, 为更高效抑制剂的设计、筛选提供有益的帮助.

2 结果和讨论

2.1 动力学特征

为了评价 MD 模拟的质量, 用 Amber 中的 ptraj 程序分析了系统的总能量和 FKBP12 主链原子的均方根偏差随时间的变化. 图 4 显示了主链原子的均方根偏差(RMSD)随时间变化的情况. 总能量的平均波动量低于 0.8%, 说明系统在 MD 模拟过程中是稳定的^[15]. 在模拟中, 单体的均方根偏差比复合物的要高(图 4), 说明 FKBP12 在结合抑制剂后柔性减弱了.

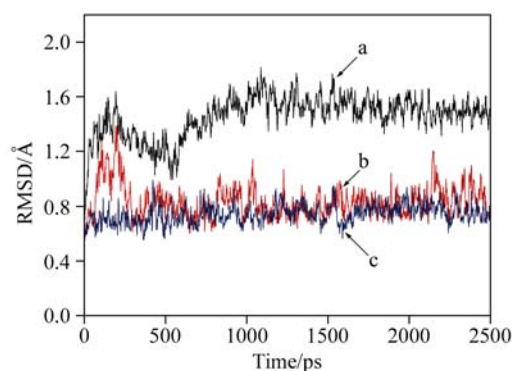


图 4 MD 模拟中主链原子的均方根偏差 FKBP12 (a), FKBP12-GPI-1046 (b)和 FKBP12-308 (c)

Figure 4 Root-Mean-Square D (RMSD) of the backbone atoms on unbounded FKBP12 (a), FKBP12-GPI-1046 (b) and FKBP12-308 (c) in MD simulations

图 5 显示 FKBP12-107 复合物的晶体结构与分子动力学模拟最后 1 ns 轨迹的平均结构的对比, 可以看到 MD 模拟的结构和晶体结构基本复合. 基于以上分析, 随后的 MM-GBSA 计算是从 1500~2500 ps 的模拟轨迹中每隔 20 ps 抽取一个状态进行的.

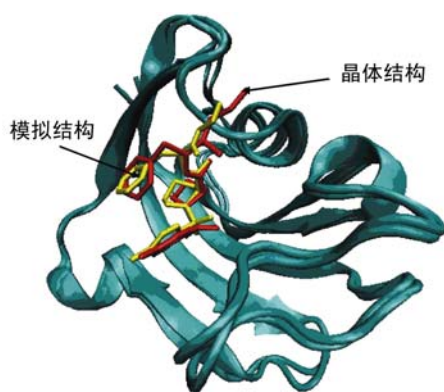


图5 FKBP12-107复合物的晶体结构和MD模拟最后1 ns平均结构的对比

Figure 5 The crystal structure of the FKBP12-107 superimposed with the averaged structure obtained from the last 1 ns MD trajectory

2.2 MM-GBSA 结合自由能

复合物的结合能由公式(1)计算得出, G_{complex} , G_{protein} 和 G_{ligand} 通过对动力学轨迹中 51 个构象的计算取平均得到, 计算时, 删掉了各个构象中的水分子. 表 1 列出了抑制剂 GPI-1046, **308** 和 **107** 结合 FKBP12 蛋白时的结合自由能, 分别是 -24.88 , -32.03 和 -49.47 kJ/mol, 这说明抑制剂结合蛋白时 **107** 结合最牢固, **308** 优于 GPI-1046, 这一计算结果与饶子和小组^[11]用 AutoDock 3.01 中的 SAR 方法计算的结果一致(表 1). 表 1 中列出了结合自由能的各个组成部分的贡献, 这有助于理解抑制剂和蛋白的结合模式, 真空中的静电作用能分别是 -53.57 , -117.64 和 -72.31 kJ/mol, 真空中范德华作用能分别是 -152.10 , -154.07 和 -172.30 kJ/mol, 非极性溶剂化能分别是 -22.08 , -21.16 和 -22.92 kJ/mol, 真

表 1 MM-GBSA 计算所得到的能量(kJ/mol)^a

Table 1 Results of MM-GBSA methods (kJ/mol)

Item	FKBP12-GPI-1046	FKBP12- 308	FKBP12- 107
ΔE_{ele}	-53.57	-117.64	-72.31
ΔE_{vdw}	-152.10	-154.07	-172.30
ΔE_{gas}	-205.67	-271.71	-244.61
ΔG_{nonel}	-22.08	-21.16	-22.92
ΔG_{el}	105.39	172.47	130.98
ΔG_{Tnonel}	-174.18	-175.23	-195.22
ΔG_{Tele}	51.86	54.78	58.63
ΔG_{tot}	-122.37	-120.40	-136.54
$T\Delta S$	-97.48	-88.37	-87.07
ΔG_{bind}	-24.88	-32.03	-49.47
Reference ^[11]	-20.66	-34.71	-39.27

^a E_{ele} 为真空静电作用能, E_{vdw} 为真空范德华作用能, E_{gas} 为 $E_{\text{ele}} + E_{\text{vdw}}$, G_{nonel} 为非极性溶剂化能, G_{el} 为 GB 方法计算的极性溶剂化能, G_{Tnonel} 为 $E_{\text{vdw}} + G_{\text{nonel}}$, G_{Tele} 为 $E_{\text{ele}} + G_{\text{el}}$, G_{tot} 为 $E_{\text{gas}} + G_{\text{el}} + G_{\text{nonel}}$, $T\Delta S$ 为构象熵乘温度, G_{bind} 为 GB 方法计算的结合自由能.

空下的静电作用能、真空中范德华作用能和非极性溶剂化能有利于结合抑制剂^[29,30]. 计算发现对结合自由能贡献大的主要是非极性部分, 分别是 -174.18 , -175.23 和 -195.22 kJ/mol, 而极性部分不利于抑制剂和蛋白的结合, 作用能分别是 51.86 , 54.78 和 58.63 kJ/mol.

2.3 主要残基的贡献

为了更加深刻地理解 FKBP12 和抑制剂的相互作用模式, 用 GBSA 方法计算了所有残基的贡献. 由图 6 可知, 实验中发现的作用较大的残基在我们的计算结果中都得到了体现, 除此之外, 计算结果还说明: Phe99 在结合三个抑制剂时作用明显; Ile91 在结合 **308** 和 **107**, Tyr59 在结合 GPI-1046 中的作用也较明显.

对于 FKBP12 和 GPI-1046 抑制剂的复合物, Ile56 的 N 和 GPI-1046 的 O(3)间有一个氢键, 占有率是 71.1%(表 3), Tyr82 侧链的 O 和 GPI-1046 的 O(1)之间形成的氢键, 占有率是 80.4%(表 3), Val55, Ile56, Tyr82 是 GPI-1046 作用的主要残基(图 6).

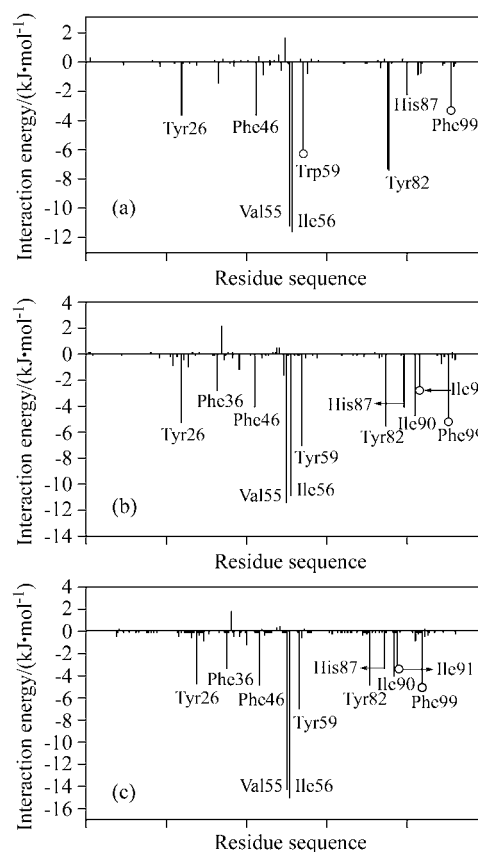


图6 FKBP12 与抑制剂 GPI-1046 (a), **308** (b)和 **107** (c)结合的相互作用谱

标号的为总能量大于 2 kJ/mol 的残基, 标圆圈的为实验未发现的有较大贡献的残基

Figure 6 The interaction spectrum for FKBP12 and inhibitors GPI-1046 (a), **308** (b) and **107** (c)

The residues of total energy more than 2 kJ/mol are marked with residues number, and the residues marked with circle were not observed in the experiment

对于 FKBP12 和 **308** 抑制剂的复合物, Asp37 中的 OD1, OD2 带负电, **308** 中的 H(6), H(7)带正电, Asp37 和 **308** 间存在很大的静电吸引力(图 7), Asp37 侧链的真空静电作用能为 -15.47 kJ/mol, 但 Asp37 的总的溶剂化能是 21.37 kJ/mol(表 2); Glu54 主链 O 和 **308** 中的 O(4) 之间存在一个氢键, 在模拟中, 占有率为 39.6% , 这是因为 Glu54 中的 O 和 **308** 中 O(3), O(5) 的距离较近且都带负电(图 7), 存在静电排斥力, 降低了氢键的作用, Glu54 真空中的总作用能为 -23.86 kJ/mol, 总的溶剂化能是 22.21 kJ/mol(表 2); Ile56 的 N 和 **308** 的 O(3) 间有一个稳定的氢键, 占有率是 99.6% (表 3, 图 7), Tyr82 侧链的 O 和 **308** 的 O(1) 之间形成稳定的氢键, 占有率是 94.6% (表 3, 图 7), 表 2 中 Ile56 的主链的真空静电作用能和 Tyr82 的侧链的真空静电作用能也说明这一点. Asp37 和 Glu54 真空中的总的作用能较大, 有利于与抑制剂 **308** 结合, 但 Asp37 和 Glu54 的溶剂化能也较大, 与真空中的作用能相抵消; Ile56 和 Tyr82 主要表现为氢

键相互作用; Tyr26, Phe36, Phe46, Val55, Ile56, Trp59, Tyr82, Tyr87, Ile90, Ile91 和 Phe99 形成疏水作用区.

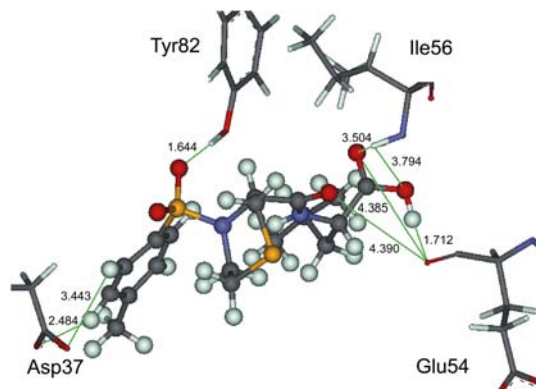


图 7 FKBP12-**308** 复合物中 **308** 和关键残基的相对位置和距离(Å)

Figure 7 Relative geometries and distances (Å) of **308** and key residues of FKBP12 in FKBP12-**308** binding complex

表 2 用 GB 方法进行能量分解的主要贡献残基各部分能量值(kJ/mol)^a

Table 2 Energy contribution of the key residues computed by GB method (kJ/mol)

No.	GPI-1046				308				107			
	S_{ele}	B_{ele}	T_{vdw}	T_{gbsol}	S_{ele}	B_{ele}	T_{vdw}	T_{gbsol}	S_{ele}	B_{ele}	T_{vdw}	T_{gbsol}
Tyr26	-0.75	-0.17	-4.68	1.13	-0.96	-0.63	-6.35	2.76	-0.59	-0.59	-5.69	2.13
Phe36	-0.17	0.08	-1.30	-0.04	-0.88	-1.25	-2.95	2.34	-0.72	-1.46	-3.72	2.47
Asp37	-2.26	0.25	-1.46	3.68	-15.47	1.17	-4.81	21.37	-13.30	0.88	-4.98	19.36
Phe46	-0.04	0.42	-4.35	-0.75	-0.50	0.33	-4.94	1.09	-0.54	0.33	-5.56	0.88
Glu54	-7.23	-4.22	-4.85	17.94	-4.93	-17.19	-1.74	22.21	-1.51	-1.92	-3.68	7.03
Val55	-0.88	-2.55	-11.71	3.93	-0.38	-4.52	-8.75	1.42	-1.97	-2.89	-10.66	1.30
Ile56	-1.21	-4.52	-10.33	4.52	-1.76	-6.65	-6.18	3.80	-2.30	-7.36	-9.33	4.10
Trp59	-0.75	-0.25	-6.48	0.96	-1.50	-0.38	-8.50	3.43	-0.88	-0.67	-8.45	2.97
Tyr82	-7.65	0.04	-8.99	9.24	-14.55	0.04	-5.39	14.01	-11.21	0.04	-6.31	12.71
His87	0.63	-0.17	-3.18	0.50	-0.79	0.67	-6.39	2.51	-0.50	0.88	-5.31	1.59
Ile90	-0.59	-0.04	-1.05	0.75	-0.54	0.42	-4.07	-0.84	0.42	0.33	-3.43	-1.34
Ile91	-0.84	0.79	-0.92	0.13	-1.25	0.75	-2.41	0.46	-0.75	0.17	-3.26	0.42
Phe99	-0.08	0.13	-2.55	-0.92	-2.05	0.17	-4.40	1.05	-2.05	0.17	-4.10	0.71

^a S_{ele} 代表侧链的真空静电作用能, B_{ele} 代表主链的真空静电作用能, T_{vdw} 代表总的范德华作用能, T_{gbsol} 代表总的溶剂化能.

表 3 主要残基的氢键分析

Table 3 The hydrogen bonds of the key residues

Inhibitor	Donor ^a	Acceptor ^b	Distance ^c /Å	Angle ^d /($^{\circ}$)	Freq. ^e /%
GPI-1046	Tyr82-OH-HH	GPI-O(1)	2.893 ± 0.21	157.44 ± 12.44	80.40
	Ile56-N-H	GPI-O(3)	3.160 ± 0.19	153.62 ± 11.56	71.10
308	Tyr82-OH-HH	TST-O(1)	2.778 ± 0.15	159.52 ± 10.79	99.60
	Ile56-N-H	TST-O(3)	3.050 ± 0.18	160.19 ± 9.65	94.60
107	Tyr82-OH-HH	SUB-O(4)	2.814 ± 0.16	155.67 ± 11.83	99.30
	Ile56-N-H	SUB-O(3)	2.982 ± 0.17	155.89 ± 11.73	96.80

^a 供体原子, ^b 受体原子, ^c 距离, ^d 角度, ^e 占有率.

对于 FKBP12 和 **107** 抑制剂的复合物, 从图 2 和图 6 中可以看出 **107** 和 **308** 具有相似的结合模式, 这是因为它们有相似的化学结构. 但 FKBP-**107** 的总的结合能比 FKBP-**308** 多 17.44 kJ/mol(表 1), 主要体现在 Phe46, Val55 和 Ile56 的作用能差别较大(图 6, 表 2), Phe46 的苯基和 **107** 的苯基间距离较近, 存在 π - π 相互作用^[31](图 8), 而在 **308** 对应的位置是异丙基(图 2); Val55, Ile56 和 **107** 的乙基接近, 从而存在较大的范德华作用能, 而 **308** 对应的位置是一个氢原子(图 2), Glu54 的静电作用能在 **308** 中明显比 **107** 的高(表 2), 在 **308** 中的 O(4)连接氢原子, 而在 **107** 中对应的 O(1)连接的是一个乙基, 没能和 Glu54 的 O 形成氢键(图 8), 这说明: **107** 的乙基代替 **308** 中的氢原子和 **107** 的苯基替代 **308** 的异丙基对于提高 FKBP12 和抑制剂的结合能效果明显. **308** 和 **107** 抑制剂在结构上的差异是总结合能存在差异的原因.

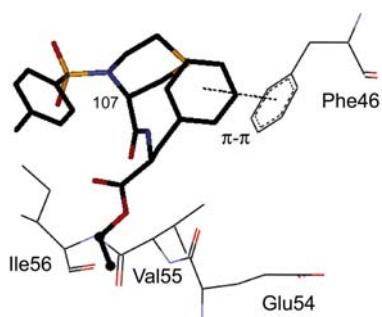


图 8 FKBP12-**107** 复合物中 **107** 和关键残基的相对位置
Figure 8 Relative geometries of **107** and key residues of FKBP12 in FKBP12-**107** binding complex

3 结论

本工作对 FKBP12 单体和 FKBP12 的复合物进行了 2500 ps 的分子动力学模拟, 用 MM-GBSA 方法计算了 FKBP12 和抑制剂的结合自由能, 计算结果和饶子和小组的计算结果一致. 计算也显示范德华相互作用能和非极性溶剂化能是形成复合物的主要驱动力. 用 GBSA 方法计算了各个残基和抑制剂的作用, 发现 Tyr26, Phe46, Val55, Ile56, Tyr59, Tyr82, His87 和 Phe99 是对抑制剂分子的结合起关键作用的氨基酸残基, 能量分解很好地阐明了 FKBP12 和抑制剂的作用模式, 晶体学中提到的作用模式在模拟中得到了再现. 我们的研究结果为基于 FKBP12 结构进行合理化药物设计和小分子数据库虚拟筛选提供了线索^[32].

References

1 Rosen, M. K.; Schreiber, S. L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 384.

2 Fischer, G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1425.
 3 Schreiber, S. L.; Liu, J.; Albers, M. W.; Rosen, M. K.; Standaert, R. F.; Wandless, T. J.; Somers, P. K. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2545.
 4 Lyons, W. E.; George, E. B.; Dawson, T. M.; Steiner, J. P.; Snyder, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 3191.
 5 Gold, B. G.; Storm-Dickerson, T.; Austin, D. R. *Restor. Neurol. Neurosci.* **1994**, *6*, 287.
 6 Gold, B. G.; Katoh, K.; Storm-Dickerson, T. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 7509.
 7 Steiner, J. P.; Dawson, T. M.; Fotuhi, M.; Glatt, C. E.; Snowman, A. M.; Cohen, N.; Snyder, S. H. *Nature* **1992**, *358*, 584.
 8 Steiner, J. P.; Connolly, M. A.; Valentine, H. L.; Hamilton, G. S.; Dawson, T. M.; Hester, L.; Snyder, S. H. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 421.
 9 Hamilton, G. S.; Huang, W.; Connolly, M. A.; Ross, D. T.; Guo, H.; Valentine, H. L.; Suzdak, P. D.; Steiner, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1785.
 10 Hamilton, G. S.; Steiner, J. P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5119.
 11 Sun, F.; Li, P.; Ding, Y.; Wang, L.; Bartlam, M.; Shu, C.; Shen, B.; Jiang, H.; Li, S.; Rao, Z. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3194.
 12 Steiner, J. P.; Hamilton, G. S.; Ross, D. T.; Valentine, H. L.; Guo, H.; Connolly, M. A.; Liang, S.; Ramsey, C.; Li, J. H.; Huang, W.; Howorth, P.; Soni, R.; Fuller, M.; Sauer, H.; Nowotnik, A. C.; Suzdak, P. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2019.
 13 Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 889.
 14 Wang, W.; Donini, O.; Reyes, C.; Kollman, P. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 211.
 15 Xu, Y.; Wang, R. X. *Protein* **2006**, *64*, 1058.
 16 Michnick, S. W.; Rosen, M. K.; Wandless, T. J.; Karplus, M.; Schreiber, S. L. *Science* **1991**, *252*, 836.
 17 Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J.; Kollman, P. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1999.
 18 Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157.
 19 Frish, M. J.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A. Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochter-

- ski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, Rev. B.05, Gaussian, Inc. Pittsburgh, PA, **2003**.
- 20 Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Bayly, C.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1357.
- 21 David, A. C.; Thomas, E. C. III.; Tom, D.; Holger, G.; Ray, L.; Kenneth, M. M. Jr.; Alexey, O.; Carlos, S.; Bing, W.; Robert, J. W. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668.
- 22 Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madurs, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- 23 Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *J. Chem. Phys.* **1977**, *23*, 327.
- 24 Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089.
- 25 Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127.
- 26 Sitkoff, D.; Sharp, K. A.; Honig, B. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1978.
- 27 Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127.
- 28 Weiser, J.; Shenkin, P. S.; Still, W. C. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 217.
- 29 Hu, J.-P.; Sun, T.-G.; Chen, W.-Z.; Wang, C.-X. *Acta Chim. Sinica* **2006**, *64*, 2079 (in Chinese).
(胡建平, 孙庭广, 陈慰祖, 王存新, 化学学报, **2006**, *64*, 2079.)
- 30 Tan, J. J.; Chen, W. Z.; Wang, C. X. *J. Mol. Struct. (Theorchem)* **2006**, *766*, 77.
- 31 Ding, Y.; Mei, Y.; Zhang, J. Z. H.; Tao, F. M. *J. Comput. Chem.* **2007**, *29*, 275.
- 32 Jiang, Y.-J.; Zeng, M.; Zhou, X.-B.; Zou, J.-W.; Yu, Q.-S. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 1751 (in Chinese).
(蒋勇军, 曾敏, 周先波, 邹建卫, 俞庆森, 化学学报, **2004**, *62*, 1751.)

(A0804305 Li, L.; Zheng, G.)