

梭曼单链抗体酶 EP₆ 作用机理的计算机模拟

胡远东, 郑志兵, 王字玲, 焦克芳, 荣康泰, 李 松
(北京毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 在梭曼抗体酶 EP₆ 可变区(EP₆V)三维结构的基础上利用自动柔性分子对接方法获得了 P_RC_R-梭曼与 EP₆V 复合物的结构, 结构分析和相互作用能计算结果表明, 氢键和静电作用在 EP₆V 和 P_RC_R-梭曼结合中起关键作用, 抗体酶重链 Asn 52 和轻链 Tyr 95 在水解过程中起了关键作用, 在生理条件下水分子在水解过程中也将起重要作用。

关键词: 梭曼; 抗体酶; 蛋白质结构, 三级; 水解作用; 计算机模拟

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1000-300X(2001)01-0060-05

有机磷神经性毒剂梭曼可引起乙酰胆碱酯酶中毒及其“老化”, 是最难防治的毒剂, 因而寻找更好的梭曼防治方法已成为抗毒研究的主攻方向。用化学免疫方法防治梭曼中毒是其中探索方向之一, 抗体酶技术为梭曼的化学免疫提供了新的研究思路。王字玲等^[1]以 γ -羟基磷酸酯(γ -hydroxyphosphonate)作为半抗原, 用噬菌体抗体库技术获得了具有梭曼水解活性的单链抗体 EP₆, EP₆ 催化梭曼水解的 $k_{cat}/k_{uncat} = 122\ 419$, 比前人^[2~4]制备的梭曼单克隆抗体和单链抗体活性大幅度提高。高活性意味其结构的独特之处。为弄清 EP₆ 的作用机理, 了解其结构与催化作用的关系, 以便进一步改进半抗原的设计或改造抗体酶的结构, 王字玲等^[5]测定了 EP₆ 的核苷酸序列并进行了 EP₆ 可变区(EP₆V)三维结构的同源模建。本文在此基础上利用柔性对接的方法模拟了 EP₆V 与梭曼复合物结构, 并研究了梭曼水解反应机理。

1 材料和方法

所有模拟均在 SGI 02 工作站上采用 Molecular Simulations Inc(MSI)公司的 Insight II 98.0 可视化软件包完成。Affinity 被用于将梭曼对接到 EP₆ 的活性中心^[6,7]。Discover(MSI)用于能量极小化。所有极小化均采用相容价力场(consistent-valence forcefield, CVFF)。

1.1 半经验计算

梭曼分子(图 1)的静态性质和结构优化由 MOPAC 6.0 软件包中的半经验 AM1 方法完成。梭曼分子有 2 个手性中心, 能产生 4 个异构体, 选取 P_RC_R-梭曼进行研究。AM1 计算的静电荷用于下一步的分子对接, 优化的结构作为对接的初始结构。

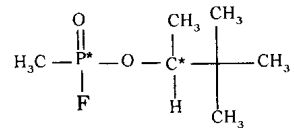


Fig 1. Schematic diagram of soman. *: the chiral atoms.

1.2 EP₆V 和 P_RC_R-梭曼的分子对接

应用 MSI 公司的 Affinity 模块软件^[6,7]将 P_RC_R-梭曼对接到 EP₆V 的活性部位。Affinity 是一套自动对接配体(客体)到受体(主体)的程序, 对给定的由配体分子和受体分子组成的体系, 它能自动地依据配体/受体复合物能量发现最佳的配体和受体结合结构。由于在全局或太大的构象空间发现受体-配体复合物结构比较困难, 因此先采用手动对接的方法确定梭曼与 EP₆V 的初始结构。

对于抗体, 最可能参与抗原-抗体相互作用的氨基酸残基一般位于其 6 个互补决定区(complementarity determining region, CDR)。先采用手动对接的方法将 P_RC_R-梭曼移到 6 个 CDR 区周围, 接着将 EP₆V 固

收稿日期 2000-04-21 接受日期 2000-11-06

基金项目 国家杰出青年科学基金资助项目(39825127)

作者简介 胡远东(1972-), 男, 湖北省监利人, 博士; 李 松(1963-), 吉林省长春市人, 研究员, 博士, 主要从事基于结构的药物研究。

定,用分子力学和分子动力学方法优化 P_{RCR} -梭曼和 EP_6V 复合物,以保证 P_{RCR} -梭曼与 EP_6V 复合物初始结构中没有不合理的接触,以此结构作为自动对接的初始结构。

接着利用 Affinity 将 P_{RCR} -梭曼对接到模建的 EP_6V 的结合部位,构建 P_{RCR} -梭曼与 EP_6V 复合物结构。对接时 EP_6 的结合部位选为 6 个 CDR 区。在对接的过程中,大多数参数选为缺省值,考虑了溶剂化效应,介电常数取基于距离的模式,与网格计算有关的其他参数取为缺省值。收集的构象个数为 10 个,选择构象的能量判据值为 125 kJ,配体分子每次允许移动最大距离为 0.3 nm,最大角度为 180.00° ,对梭曼分子中需要自由旋转的化学键均允许自由旋转。分子对接时结构优化采用蒙特卡洛极小化方法,每次优化 1000 步。

柔性构象搜寻结束后,进一步运用分子力学和分子动力学方法优化对接获得的所有结构以获得低能构象,优化仅集中在配体和结合区的氨基酸残基侧链上。

2 结果和讨论

2.1 EP_6 与梭曼分子对接模拟

构建梭曼抗体酶三维结构的目的之一就是为进一步了解其结合模式和催化性质。在抗体酶领域里研究最多和最深入的是催化酯水解或乙酰基转移反应的抗体酶,所有这类抗体酶都是使用共轭链接于牛血清白蛋白或血蓝蛋白的磷酸酯过渡态类似物 (transitional state analog, TSA) 通过免疫法引出的。通常半抗原的磷酸部分与芳香部分毗连或者被一个甲基分开。目前已获得了许多酯水解抗体酶或其 TSA 复合物的三维结构,它们的结构非常相似,特别是 TSA 的结合模式^[8]。诱导出 EP_6 的半抗原与酯水解抗体酶的半抗原在结构上比较相似,因此酯水解抗体酶的结构信息将为确定梭曼和 EP_6 的结合模式提供一定的线索。

分子对接是确定受体和配体复合物结构有效的方法之一。在对接过程中根据需要可以将受体和配体分别视为刚性的或柔性的,早期的研究中将配体和受体均作为刚性体处理,但这与抗体-抗原相互作用的实际情况偏差大。抗体 (Fab 17/9) 的三维结构为抗体-抗原识别的诱导契合机理提供了证据^[9]。关于苯甲脒/胰岛素的研究也表明,受体结构的微小

变化对配体对接有重要影响,在对接过程中有必要松弛受体结合部位,固定受体有可能导致错误的结论^[6,7]。因此使用配体和受体均处理为柔性体的算法来搜寻抗体酶/配体结构是适宜的。Affinity 将受体分为两部分有助于更快的搜寻配体和抗体酶复合物结构,节省计算时间。

使用 Affinity 将 P_{RCR} -梭曼对接到 EP_6V 的结合部位以考察梭曼和 EP_6V 之间的相互作用。在对接时选取 EP_6V 的 6 个 CDR 区作为结合区域,这一部分在对接过程中是柔性的。在整个空间进行构象搜寻,获得了一系列能量为 $766 \sim 837 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的低能构象。

表 1 列出了 P_{RCR} -梭曼- EP_6V 复合物几种不同构象的总能量,相互作用能(包括范德华相互作用和静电相互作用)和 EP_6V 中距配体 0.5 nm 以内的氨基酸残基。表 2 列出了复合物中的氢键及其对配体-受体相互作用的贡献。从表中可以看出静电相互作用非常重要,理论模拟和晶体衍射研究也表明在磷酸 TSA 和酯水解抗体酶的复合物中氢键是主要的相互作用^[10,11]。不同构象中与磷酰基的氧形成氢键的氢来自于氨基酸残基重链的 Asn 52, Asn 59, Thr 55, Thr 101 或轻链的 Tyr 95。这些残基对梭曼和 EP_6V 相互作用贡献大。梭曼附近(0.5 nm 以内)的氨基酸位于 H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 和 L-CDR3。不同构象的总能量和相互作用能没有明显差异。进一步优化后总能量和相互作用能差异仍然很小,因此依靠能量差异来判断构象合理性比较困难。

在以上结合模式中,梭曼分别通过与重链的 Thr 101, Asn 59, Thr 55, Asn 52 或轻链的 Tyr 95 形成强烈氢键与 EP_6V 结合,但在与重链 Thr 101, Asn 59, Thr 55 或轻链 Tyr 95 形成氢键的构象中,梭曼分子位于裂缝的外部,而不是在裂缝里。对于与重链 Asn 52 形成氢键的构象有两种结合模式,一种情况下梭曼分子位于 EP_6V 的外部并且梭曼分子远离轻链 Tyr 95,另一种情况下梭曼分子位于裂缝中(图 2)。后一种与许多晶体结构中抗原-抗体结合模式相符合,因此这是一种合理的构象。

复合物构象表明轻链 Tyr 95 的氧原子和梭曼磷原子之间的静电相互作用对于稳定复合物是重要的。轻链 Tyr 95 的酚羟基氧原子与梭曼磷酰基氧原子处于适合形成氢键的距离范围内,但相应的键角太小,不能形成氢键。氢原子的方向远离磷原子,表明磷原子与氢原子有一定的静电排斥作用,而带负

Tab 1. Docking result of P_RC_R-soman and EP₆V (kJ·mol⁻¹)

	E _t	VDW	Coulomb	IE _t	Sub5
1	-25603	-65.10	-61.80	-126.90	H33 ,H50 ,H52 ,H57 ,H59 ,H101 ,L90 ,L91 ,L93 ,L95
2	-25577	-38.31	-63.64	-101.94	H52 ,H56 ~ H60 ,H65
3	-25545	-53.00	-58.49	-111.49	H33 ,H47 ,H50 ~ H52 ,H55 ,H57 ~ H59 ,L90 ,L93 ,L95
4	-25563	-32.66	-106.43	-139.08	H33 ,H50 ~ H52 ,H55 ~ H59 ,L95
5	-25549	-19.05	-121.42	-140.46	H59 ,H101 ,L91 ~ L93 ,L95
6	-25551	-5.07	-106.34	-111.41	H101 ,H102 ,L31b ,L49 ,L91

E_t total energy of the complex between P_RC_R-soman and EP₆V ;VDW :Van der Waals interaction energy between P_RC_R-soman and EP₆V ; Coulomb :coulombic interaction energy ;IE_t total interaction energy ;Sub5 :the residues about 0.5 nm near soman in the complex between P_RC_R-soman and EP₆V.

Tab 2. Hydrogen bonds in the complexes and the contribution of special residue for the interaction energy

	H-bond donor	H-bond acceptor	Dist ^c /nm	AA number	VDW/kJ·mol ⁻¹	E _t /kJ·mol ⁻¹	IE _t /kJ·mol ⁻¹
1	H52:ND2	O11 ^a	0.291	H52	-3.22	-44.55	-47.77
1	L95:OH	O2 ^b	0.273	L95	-13.16	-11.76	-24.92
2	H59:ND2	O11	0.274	H59	-3.79	-64.39	-68.18
3	H52:ND2	O11	0.273	H52	-0.78	-52.96	-53.74
4	H55:OG1	O11	0.238	H55	14.97	-100.94	-85.97
5	L95:OH	O11	0.238	L95	13.97	-92.53	-78.56
6	H101:OG1	O11	0.239	H101	14.47	-100.36	-85.89

AA : amino acid. a : the oxygen atom from soman phosphoryl ; b : the oxygen atom from soman pinacolyl ; c : the distance between H-bond donor and acceptor.

电的氧原子与磷原子则有一定的静电吸引。

对于抗体酶或酶 催化速率(k_{cat})通常不是受实际的化学步骤限制,而是产物释放^[8]。产物抑制往往使抗体酶催化水解不能在有效的方式进行。梭曼水解产物与梭曼结构相似,其与抗体酶的相互作用可能对 EP₆ 催化水解梭曼有影响。前面对抗体酶的图形分析表明 EP₆V 的活性部位是一个长的裂缝,梭曼分子结合于其中,这种形状有利于产物的释放和消除,可能是 EP₆ 高活性的原因之一。

2.2 EP₆ 催化水解梭曼机理

从 Brimfield 等^[2]报道水解有机磷酸酯的抗体酶以来,催化梭曼水解的抗体酶研究已经取得了较大进展,但至今没见关于抗体酶催化水解梭曼的反应机理报道。抗体酶催化水解酯的机理已经有相应的报道,并且一些关键的氨基酸残基已由 X-衍射技术^[11~13]或计算机模拟^[14]确定。尽管诱导 EP₆ 的半抗原和诱导酯水解抗体酶的半抗原结构相似,但大

多数模拟酯水解过渡态的磷酸酯只是酯水解抗体酶的抑制剂。酯水解抗体酶没有水解有机磷酸酯化合物的功能。王学玲等^[1]报道的 EP₆ 是目前唯一确定了氨基酸序列且具有水解梭曼功能的抗体酶,多重序列对比显示 EP₆ 和其他酯类水解抗体酶是高度同源的,但它们可能有不同的反应机理。通过对目前获得晶体结构的酯水解抗体酶的序列进行对比发现,除了抗体 6D9(PDB Code :1HYX)外,它们的重链 His 35 都是保守的,并且晶体结构显示重链 His 35 会在催化反应中起关键作用,EP₆V 中该残基被 Glu 取代,其溶剂可及表面积为零,不能参与抗原-抗体相互作用,因此这两种催化抗体可能有不同的结合部位和关键活性催化残基。

生理条件下磷酸三酯和磷酸酐的水解通常是碱催化的,亲核试剂进攻磷原子且伴随着构象翻转^[15~17]。酶作用的磷酸酐水解反应过渡态一般是五配位的,稳定反应的过渡态将降低反应的活化能



Fig 2. The possible conformation of complexes between P_RC_R-soman and EP₆V. These pictures were drawn by Molscrip. The high contribution residues for combining were showed in ball-and-stick mode. Unimportant hydrogen atoms were omitted for clarity. Soman located between the residues of the heavy chain Asn 52 and the light chain Tyr 95 and formed hydrogen bond with the ε-hydrogen atom of heavy chain Asn 52, the electrostatic interaction between light chain Tyr 95 and soman is also important.

而使反应加速. 在动力学分析实验中, 梭曼水解反应发生在低碱性环境中^[1], 因此亲核进攻是在无明显碱催化时发生的, 抗体中氧负离子稳定化和其他静电相互作用将有重要影响.

重链的 Asn 52 和轻链的 Tyr 95 在水解催化机理中起重要作用. 重链的 Asn 52 与半抗原的氧原子直接形成氢键, 氢键的键长大约 0.14 nm, 酰胺的氢原子是氧负离子稳定部位. 轻链的 Tyr 95 有两种功能. 在米氏复合物形成阶段, Tyr 95 酚羟基(*p*-OH-C₆H₄-)的氧原子通过静电相互作用帮助重链的 Asn 52 固定梭曼的位置. 轻链的 Tyr 95 与梭曼之间的相互作用能仅仅低于重链的 Asn 52. 酚羟基的氢原子处于能与半抗原中烷氧基的氧原子形成氢键的范围, 但由于磷原子与氢原子的静电排斥, 氢原子的方向背离氧原子. 因此重链的 Asn 52 和轻链的 Tyr 95 一起通过氢键和静电相互作用稳定复合物. 在梭曼的水解阶段, 轻链的 Tyr 95 则可能参与和促进亲核试剂的形成.

由于在低碱性环境下的碱催化反应没有强的亲核试剂参与, 水分子对梭曼的水解非常重要. 水分子在抗体酶催化水解酯的反应机理中的重要性已报

道^[15,16]. 图 3 显示了可能的催化抗体催化梭曼水解反应机理. 首先, 轻链 Tyr 95 的酚羟基氧原子提供一对自由电子给活性水分子使之成为部分氢氧化物, 它将进攻梭曼磷酸基的磷原子. 接着轻链 Tyr 95 与重链 Asn 52 一起通过静电和氢键相互作用稳定刚形成的五配位氧负离子. 在五配位中间体生成后, 离去基团离去, 这是一个不可逆过程.

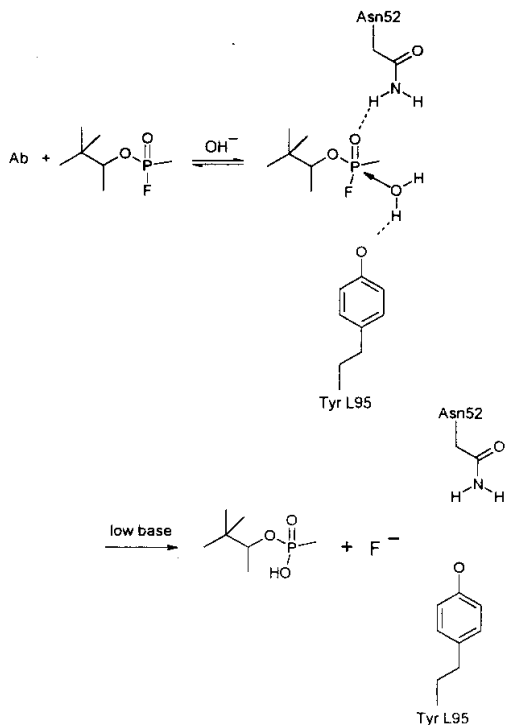


Fig 3. A possible mechanism of soman hydrolysis catalyzed by EP₆.

3 参考文献:

- [1] Wang ZL, Rong KT, Yang RF, Yun LH. γ -Hydroxyphosphonate inducing single-chain antibodies capable of catalyzing soman hydrolysis[J]. *Sci China B*, 2000, **43**(6): 649-656.
- [2] Brimfield AA, Lenz DE, Maxwell DM, Broomfield CA. Catalytic antibodies hydrolysing organophosphorus esters[J]. *Chem Biol Interact*, 1993, **87**(1-3): 95-102.
- [3] Zhao YM, Rong KT, Xu QH. Catalytic antibody capable of hydrolyzing nerve agent soman[J]. *Int Rev Armed Forces Med Serv*, 1996, **70**(1-3): 5-12.
- [4] 周永新, 荣康泰. 梭曼单链抗体的基因克隆和表达[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 1996, **10**(4): 272-276.

- [5] 王字玲,胡远东,焦克芳,李松,荣康泰. 梭曼单链抗体酶 EP₆ 一级结构的确定和三维结构的模建 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14(5):387 - 392.
- [6] Luty BA, Wasserman ZR, Stouten PFW, Hodge CN, Zacharias M, McCammon JA. A molecular mechanism/grid method for evaluation of ligand-receptor interactions [J]. *J Comp Chem*, 1995, 16(3):454 - 464.
- [7] Stouten PFW, Froemmel C, Nakamura H, Sander C. An effective solvation term based on atomic occupancies for use in protein simulations [J]. *Mol Simul*, 1993, 10(2 - 6):97 - 120.
- [8] Tawfik DS, Eshhar Z, Green BS. Catalytic antibodies : a critical assessment [J]. *Mol Biotechnol*, 1994, 1(1):87 - 103.
- [9] Rini JM, Schulze-Gahmen U, Wilson IA. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition [J]. *Science*, 1992, 255(5047):959 - 965.
- [10] Charbonnier JB, Gigant B, Golinelli-Pimpaneau B, Knossow M. Similarities of hydrolytic antibodies revealed by their X-ray structures : a review [J]. *Biochimie*, 1997, 79(11):653 - 660.
- [11] Charbonnier JB, Carpenter E, Gigant B, Golinelli-Pimpaneau B, Eshhar Z, Green BS, *et al.* Crystal structure of the complex of a catalytic antibody Fab fragment with a transition state analog : structural similarities in esterase-like catalytic antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(25):11721 - 11725.
- [12] Charbonnier JB, Golinelli-Pimpaneau B, Gigant B, Tawfik DS, Chap R, Schindler DG, *et al.* Structural convergence in the active sites of a family of catalytic antibodies [J]. *Science*, 1997, 275(5303):1140 - 1142.
- [13] Gigant B, Charbonnier JB, Eshhar Z, Green BS, Knossow M. X-ray structures of a hydrolytic antibody and of complexes elucidate catalytic pathway from substrate binding and transition state stabilization through water attack and product release [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(15):7857 - 7861.
- [14] Yuan YR, Xia ZX, Yang CH, Yang BH, Yeh M. A possible hydrolysis mechanism of beta-naphthyl acetate catalyzed by antibodies [J]. *Cell Res*, 1998, 8(3):219 - 230.
- [15] Fersht A. *Enzyme Structure and Mechanism* [M]. New York : WH Freeman and Co, 1985. 235 - 243.
- [16] Jencks WP. *Catalysis in Chemistry and Enzymology* [M]. New York : Dover Publications Inc, 1987. 169 - 181.
- [17] Corbridge DEC. *Phosphorus, an Outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology* [M]. New York : Elsevier Scientific Publishing Co, 1978. 271 - 279.

Computer modeling on the abzyme catalyzing soman hydrolysis

HU Yuan-Dong, ZHENG Zhi-Bing, WANG Zi-Ling, JIAO Ke-Fang, RONG Kang-Tai, LI Song
(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract : The P_{RCR}-soman was docked into the active sites of variable region of abzyme EP₆ (EP₆V) using the automated flexible docking procedure (Affinity), the complex structure of soman-EP₆V and the interaction energy between soman and EP₆V show H-bond and electrostatic interaction are important. The residues of the heavy chain Asn 52 and light chain Tyr 95 play a key role in the process of the soman hydrolysis, and

water molecule is also important in this process under the physiologic conditions.

Key words : soman ; antibodies, catalytic ; protein structure, tertiary ; hydrolysis ; computer, modeling

Foundation item : The project supported by National Distinguished Youth Scholar Award (39825127)

(本文编辑 石 涛)