

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.03.027

肺炎克雷伯碳青霉烯酶与 β -内酰胺酶抑制蛋白复合物的运动模式

左柯¹, 杜文义¹, 代田洋¹, 刘 崑¹, 梁 立¹, 胡建平^{1,2}

(1. 成都大学四川抗菌素工业研究所药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室, 成都 610106;

2. 乐山师范学院化学学院, 乐山 614004)

摘要: 肺炎克雷伯碳青霉烯酶能水解临床治疗多药耐药菌感染的碳青霉烯类抗生素, 严重削弱革兰氏阴性菌感染的治疗效果. 开发新型有效专一的肺炎克雷伯碳青霉烯酶抑制剂有助于提高此类抗生素的治疗有效率. β -内酰胺酶抑制蛋白能竞争性抑制肺炎克雷伯碳青霉烯酶的活性. 通过粗粒化模型分析肺炎克雷伯碳青霉烯酶- β -内酰胺酶抑制蛋白复合物的运动模式. 结果表明, 结合 β -内酰胺酶抑制蛋白后, 肺炎克雷伯碳青霉烯酶的运动模式发生较大变化. 使用分子对接和分子动力学模拟方法得到一系列环硼酸类 β -内酰胺酶抑制剂与肺炎克雷伯碳青霉烯酶的结合模式, 并从氢键和能量的角度解释该类抑制剂的识别机制与构象-抑制活性间的关系. 本研究为后续基于肺炎克雷伯碳青霉烯酶结构的抑制剂设计提供了一定的理论依据.

关键词: 肺炎克雷伯碳青霉烯酶; β -内酰胺酶抑制蛋白; 粗粒化模型; 分子对接; 抑制剂设计

中图分类号: Q5, R9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)03-0585-10

Motion pattern of the complex involved in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases and β -lactamase inhibitor protein

ZUO Ke¹, DU Wen-Yi¹, DAI Tian-Yang¹, LIU Wei¹, LIANG Li¹, HU Jian-Ping^{1,2}

(1. Key Laboratory of Medicinal and Edible Plants Resources Development of Sichuan Education Department,

Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. College of Chemistry, Leshan Normal University, Leshan 614004, China)

Abstract: Carbapenems, used in clinical treatment of multi-drug resistance bacterial infection, can be hydrolyzed by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, which weaken the treatment effect of gram negative bacterial infection. It's an important means to develop novel, potent and specific *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase inhibitors for improving the efficiency of these antibiotics in clinical treatment. And β -lactamase inhibitor protein can competitively inhibits the activity of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. The movement patterns of complex involved in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase and β -lactamase inhibitor protein are analyzed by coarse-grained models. The results indicate the movement patterns of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase change obviously after inhibited by β -lactamase inhibitor protein. Then, the binding modes between the series of cyclic boronic acid β -lactamase inhibitors and

收稿日期: 2015-11-04

基金项目: 国家自然科学基金(11247018, 11147175); 四川省教育厅科研重点项目(12ZA066); 乐山市科技计划项目(14SZD018)

作者简介: 左柯(1992-), 男, 四川成都人, 硕士研究生, 研究方向为计算机辅助药物分子设计.

通讯作者: 胡建平. E-mail: hujianping@emails.bjut.edu.cn

Klebsiella pneumoniae carbapenemase are released through the ways of molecular docking and molecular dynamics simulation, and the relationship between the recognition mechanism and conformation-inhibition activity of these inhibitors are explained from the angle of hydrogen bonds and energy. This research provides a theoretical basis of the subsequent design of the inhibitor based on the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase structure.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases; β -lactamase inhibitor protein; Coarse-grained models; Molecular docking; Inhibitor design

1 引言

肺炎克雷伯碳青霉烯酶(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, KPC)是一种丝氨酸 β -内酰胺酶,属于 Ambler 分类中的 A 类。KPC 能水解具有广谱抗菌活性的头孢菌素类以及被认为是“最后依靠”的 β -内酰胺类抗生素——碳青霉烯类^[1-4]。碳青霉烯类抗生素是目前抗菌谱最广、抗菌活性最强的非典型 β -内酰胺类抗生素,包括亚胺培南(Imipenem)、美罗培南(Meropenem)、多利培南(Doripenem)、尔他培南(Ertapenem)、比阿培南(Biapenem)等。至今,报道的 KPC 有 12 种^[5],其中以 KPC-2 的发生率最高。虽然 KPC 最初被发现于肺炎克雷伯菌,但因为 KPC 由质粒介导产生,细菌通过交流可获得该酶的基因,现已在肠杆菌科细菌(如:大肠埃希菌、肠炎沙门菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌等)中发现该酶的存在。KPC 已对全球范围内革兰氏阴性菌多重耐药株感染的临床治疗造成了严重的威胁^[6-8]。

KPC-2 包含两个结构域,其中一个结构域为较大的 α 螺旋,另一个则是由位于 α 螺旋侧面的 5 个 β 折叠片组成。两个结构域之间形成一个裂隙,而该酶的催化活性位点就位于该裂隙的深处。与其他 A 类 β -内酰胺酶相比,KPC 拥有一套高效的水解机制^[9]。这套机制主要有两部分协同完成:一是位于活性位点的 S70 参与向底物羰基碳的亲核进攻,导致底物 β -内酰胺键断裂, β -内酰胺环开环;另一部分则是由 E166 和 N170 夹持的去酰基化水分子对 β -内酰胺-乙酰基酶中间体发起亲核进攻,使得 β -内酰胺底物去乙酰化,从活性位点上解离。而这一过程受助于一个由 S70 和 T237 主链 N 原子组成的摆放正确的氧离子空穴(Oxyanion hole)吸引羰基氧原子。

β -内酰胺酶抑制蛋白(β -Lactamase inhibitor protein, BLIP)是一个从土壤细菌 *Streptomyces clavuligeris* 中分离得到的 18 kDa 的蛋白,其结构

的主体为 7 股 β 折叠,两端各有一个 α 螺旋,通过 loop 与 β 折叠相连。整体呈片状,可较大幅度地弯曲。能有效抑制多种 A 类 β -内酰胺酶。BLIP 能识别微摩尔的 SHV-1(*K. pneumoniae*);纳摩尔的 TEM-1(*E. coli*)、SME-1(*S. marcescens*)和 BlaI (*Bacillus anthracis*);以及皮摩尔的 K1(*Proteus vulgaris*)^[10]。Melinda 等^[11]的研究发现,BLIP 是一种极其有效(低于纳摩尔级)的 KPC 酶抑制剂,并解析出了 KPC-2-BLIP 复合物的晶体结构(PDB 代码:3E2K)。晶体结构显示 BLIP 对 KPC-2 的抑制作用与其两段 loop 区(D49 和 F142)有关。

此外,在寻找有效的丝氨酸碳青霉烯酶抑制剂的过程中,含硼酸药效团的丝氨酸 β -内酰胺酶抑制剂成为了被关注的焦点。该类抑制剂对酶的亲和力取决于其硼酸基与催化中心丝氨酸侧链间形成的共价加合物结构能否有效地模仿乙酰化或去乙酰化反应过程中的四面体过渡态^[12]。基于此机理,Hecker 等设计合成了一系列具有环硼酸结构的新型抑制剂,并通过体外和体内试验发现该类化合物为广谱抑制剂^[12]。

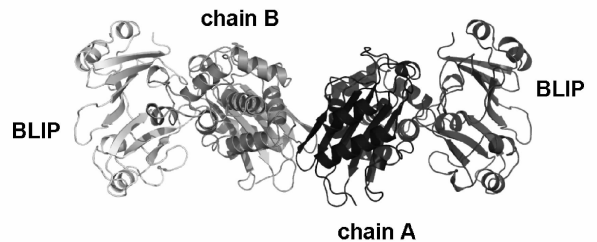


图 1 KPC-2-BLIP 复合物的结构
Fig. 1 The structure of KPC-2-BLIP complex

目前,KPC-2-BLIP 复合物的构象变化及其与生物学功能间有着怎样具体的联系,环硼酸类抑制剂识别机制-抑制活性关系等问题尚不明确。本文通过高斯网络模型和各向异性网络模型组成的粗粒化分析方法^[13]考察了该复合物的运动性及构象变化,并对 BLIP 的抑制机制做进一步分析。为后

续基于 KPC-2 结构的 β -内酰胺酶抑制剂的药物设计提供一些理论信息. 图 1 给出了 KPC-2-BLIP 复合物二聚体晶体结构.

2 研究方法

2.1 高斯网络模型

高斯网络模型 (Gaussian network model, GNM) 是一种将蛋白质三维结构简化为一个弹性网络,并用氨基酸的 C_α 原子代替整个氨基酸,作为网络节点的分子模拟模型. 在 GNM 中,当两个节点间的距离低于截断半径(本工作中为 7.3 \AA)时,两节点用一弹性系数固定的弹簧连接^[14,15]. 因此,网络的拓扑结构可以写成一个 $N \times N$ 的 Kirchhoff 矩阵(Γ),矩阵中的元素则可表示为^[14,16]:

$$\Gamma_{ij} = \begin{cases} -1 & \text{if } i \neq j \text{ and } R_{ij} \leq r_c \\ 0 & \text{if } i \neq j \text{ and } R_{ij} > r_c \\ -\sum_{i,j \neq j} & \text{if } i = j \end{cases} \quad (1)$$

式中, R_{ij} 表示第 i 和第 j 个 C_α 原子间的距离; r_c 为截断半径.

所以,第 i 个残基与第 j 个残基均方涨落 (Mean-square fluctuation) 的交叉相关性即可根据该矩阵按下式求出:

$$(\Delta R_i \cdot \Delta R_j) = \frac{3k_B T}{\gamma} [\Gamma^{-1}] \quad (2)$$

其中, k_B 表示 Boltzmann 常数; T 表示绝对温度; γ 为弹性系数.

而每个原子的涨落值与温度因子(B-factor, B 因子)可以通过下式转化:

$$B_i = \frac{8\pi^2 (\Delta R_i \cdot \Delta R_i)}{3} \quad (3)$$

在 GNM 中,蛋白质的运动被分解为以矩阵 Γ 所决定的各类运动模式再叠加,大大简化了计算.

2.2 各向异性网络模型

GNM 只能提供节点的运动幅度,而不能提供绝对运动的方向信息^[17,18]. 在各向异性网络模型 (Anisotropic network model, ANM) 中,蛋白质也被简化为一个弹性网络,与 GNM 类似(本次工作中的截断半径设为 13 \AA),但在 ANM 中原子的涨落是各向异性的. 蛋白质的运动模式是由 $3N \times 3N$ 的 Hessian 矩阵(H)所决定:

$$H = \begin{pmatrix} h_{11} & h_{12} & \cdots & h_{1N} \\ h_{12} & h_{22} & \cdots & h_{2N} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ h_{N1} & h_{N2} & \cdots & h_{NN} \end{pmatrix} \quad (4)$$

其中的每个元素 h_{ij} 都是 3×3 的矩阵,具体表示如下:

$$h_{ij} = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial x_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial y_i \partial x_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial y_i \partial y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial y_i \partial z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial z_i \partial x_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial z_i \partial y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial z_i \partial z_j} \end{pmatrix} \quad (5)$$

2.3 分子对接

分子对接是计算机辅助药物设计 (Computer aided drug design, CADD) 中的一种重要手段. AutoDock 4.2 是一款由 Scripps 研究所 Olson 课题组开发的开源分子模拟软件包,由 AutoGrid 和 AutoDock 两个子程序组成. 前者用于格点中的能量计算,后者则负责分子构象的搜索与评价^[19]. AutoDock 4.2 采用拉马克遗传算法 (Lamarckian genetic algorithm, LGA) 优化对接体系. 该算法在结合全局搜索和局部搜索的能量结果基础上,采用半经验自由能评价函数评价受体和分子间的能量匹配,以及范德华相互作用、氢键相互作用、静电相互作用等计算结果. 并在分子对接过程中充分考虑蛋白质侧链柔性和小分子单键旋转.

考虑到本文中的 KPC-2 为同源二聚体结构,故仅选取 A 链用于对接,对接前删去其结合的 BLIP. 对接所用的配体小分子结构由 ChemBioDraw Ultra 12.0 绘制,经 ChemBio3D Ultra 12.0 下的 MM2 能量优化(最小均方根梯度值为 0.001) 后生成. 以 S70、E166 和 N170 三个氨基酸坐标确定对接格子中心,格子的长宽高均为 40 \AA . 每次对接采集 128 个构象,其余参数均为缺省值. 定义 128 个构象成簇后,最大簇中能量最低的构象为最优对接结果.

2.4 分子动力学模拟

以 KPC-2 与环硼酸类 β -内酰胺酶抑制剂对接复合物模型作为分子动力学 (Molecular dynamics, MD) 模拟的初始构象,使用 AMBER 12 软件^[20] 进行模拟. 模拟力场为 AMBER 力场,大分子力场参数基于实验值拟合^[21],模拟温度设为 300 K ,模拟溶剂为 TIP3P 水模型^[22].

模拟时,将复合物置于去头八面体水盒子中,复合物距离盒子壁 0.8 nm ,共向盒中加入水分子 8207 个. 之后开始进行能量优化,优化过程分两步完成. 第一次约束溶质,优化 10000 步,约束力常数设为 $2.091 \times 10^5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$,包括

5000 步最陡下降法优化和 5000 步共轭梯度法优化. 第二次去约束能量优化, 同样优化 10000 步. 前 5000 步为最陡下降法, 后 5000 步为共轭梯度法, 收敛条件为能量梯度小于 $4.182 \times 10^{-4} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$. 能量优化完成后开始 MD 模拟, 先进行约束动力学模拟, 约束力常数为 $4.182 \times 10^3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, 共进行 200 ps; 之后进行 18000 ps 的无约束恒温 MD 模拟. 采用 SHAKE 算法^[23] 约束键长, 非键半径为 1 nm; 积分步长设为 2 fs 每隔 20 ps 采集一次构象, 共采集 2000 个构象.

3 结果与讨论

3.1 粗粒化模型的可靠性

B 因子可以用于表征蛋白分子的柔性. 图 2 分别给出了 KPC-2 和 KPC-2-BLIP 体系的粗粒化

模型计算所得的 B 因子与实验测定的 B 因子的相关性. 需要说明的是, 由于通过 Discovery Studio 2.5 补全的残基(KPC-2 的 N293~Q295, BLIP 的 S139~Y143)没有实验 B 因子, 无分析意义, 故未将其纳入分析计算. 图中 1~262, 263~524 分别表示 KPC-2 A 链和 B 链 C_α 的原子序号, 525~685, 686~846 则表示 BLIP C_α 的原子序号. 经计算, 二体系的相关系数 R 均为 0.59, 考虑到分析的样本容量分别为 524 和 846, 说明二体系的相关性均很高. 证明了由 GNM 分析得到的结果和后续的 ANM 分析方法的可靠性. 从图 2(A)和图 2(C)中可以看出, 通过 GNM 模拟得到的 B 因子一般略高于实验值, 这可能是因为实体晶体内部的堆积效应在一定程度上限制了原子, 而在 GNM 简化处理过程中消除了这种限制造成的.

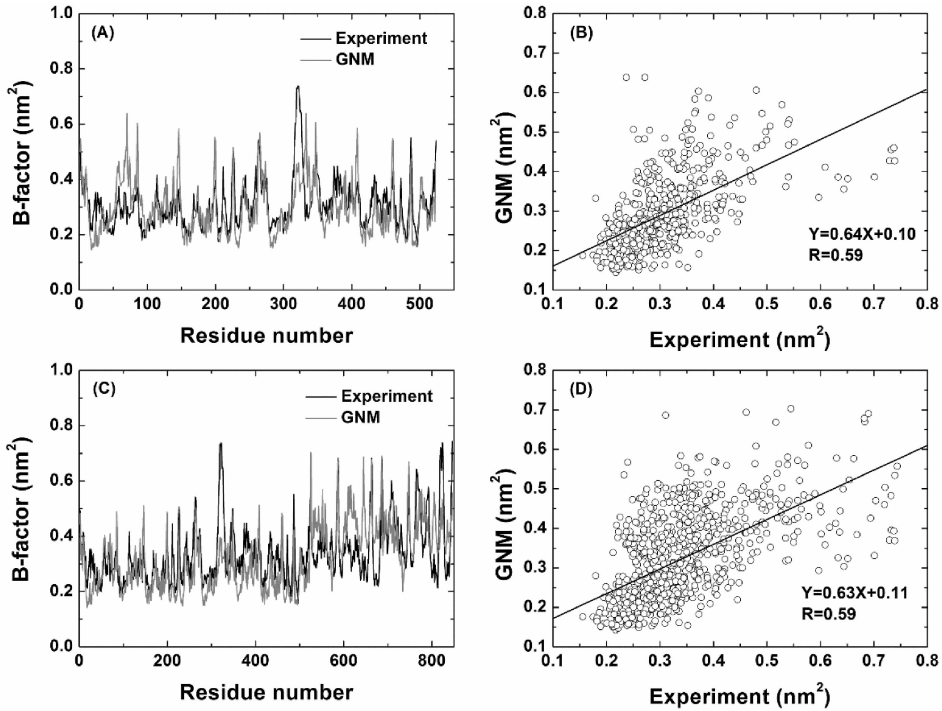


图 2 KPC-2 与 KPC-2-BLIP 体系的计算 B 因子与实验 B 因子的相关性.

A: KPC-2 的实验与计算 B 因子; B: KPC-2 实验 B 因子与计算 B 因子的子相关性; C: KPC-2-BLIP 的实验与计算 B 因子; D: KPC-2-BLIP 的实验与计算 B 因子的相关性.

Fig. 2 Correlation of the experimental and calculated B-factors for the KPC-2 and KPC-2-BLIP systems.

A: Experimental and calculated B-factor for KPC-2 system; B: Correlation of experimental B-factor and the calculated values for KPC-2 system; C: Experimental and calculated B-factor for KPC-2-BLIP system; D: Correlation of experimental B-factors and the calculated values for KPC-2-BLIP system.

3.2 快运动与慢运动

生物大分子的运动模式由快运动与慢运动组成. 快运动模式具有与狭义几何不规则相关的局部谐波运动性质. 因此, 快运动中所表现出来的残

基可被视为在分子识别过程中重要的动力学热点残基^[24-26]. 慢运动模式则往往是分子整体的大幅全局运动, 表现为一种功能性非谐波运动^[26]. 值得一提的是, 第一慢运动对生物大分子发挥其生物

学功能具有重要意义.

图3(A)给出了通过GNM分析得到的KPC-2各残基的快运动分布.从图3(A)可以看出,其峰值主要出现在A、B链的Y47、P183、D246、A262以及B链T187,尽管体系为二聚体,但计算结果表明两条链上的残基运动特征并不完全一致,也展现了其不对称单元(Asymmetric unit, AU)的特点^[11].图3(C)给出了结合BLIP后体系各残基的快运动分布.对比图3(A)和图3(C)可以发现,BLIP的结合使得P183、T187的峰值明显降低,但Y47与A262附近的残基变化不大,这可能与其位于肽链末端,并非是推动结合的关键残基有关.单独考虑BLIP,其峰值出现在S108.因此,可以推测

KPC-2的P183、T187和BLIP的S108是驱动BLIP与KPC-2识别的重要残基.

图3(B)和3(D)分别给出了KPC-2和KPC-2-BLIP体系的第一慢运动分布.作为一种功能性运动,对比两图可以看出,再结合了BLIP后,G74~I95、Y112~A124、A134~S154、R161~R164、I173~R178的运动幅度有所下降.通过观察发现,这些片段均位于活性口袋的周围,为 α 螺旋和loop结构,向外突向BLIP的 β 片,可能正是由于BLIP的包裹而导致运动性下降显著.另外,就BLIP来看,其最小值位于A46~Y51和S138~R144两处loop区,正好吻合了实验结果^[11],再次证明了GNM方法的可靠性.

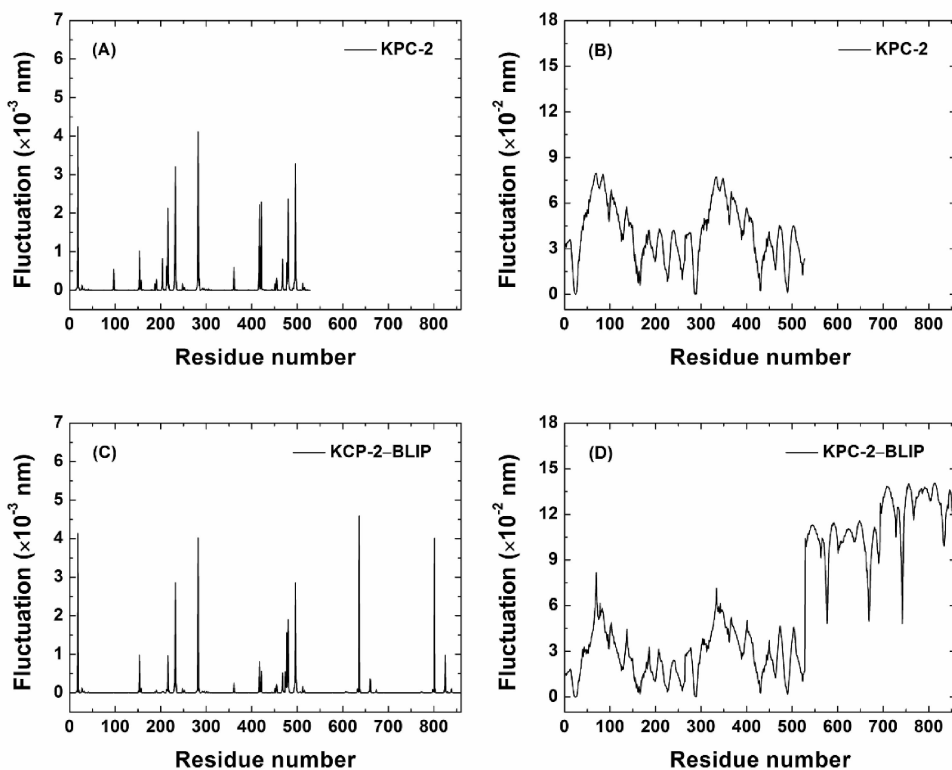


图3 KPC-2和KPC-2-BLIP体系的快运动模式和慢运动模式.

A: KPC-2的快运动模式; B: KPC-2的第一慢运动模式; C: KPC-2-BLIP的快运动模式; D: KPC-2-BLIP的第一慢运动模式.图中1~264,265~528分别表示KPC-2 A链和B链的A30~Q295;529~693,694~858分别表示BLIP的A1~V165.

Fig. 3 The fast and slow motion modes of KPC-2 and KPC-2-BLIP systems.

A: Fast motion mode of KPC-2; B: The first slow motion mode of KPC-2; C: Fast motion mode of KPC-2-BLIP; D: The first slow motion mode of KPC-2-BLIP. The residue number of 1~264, 265~528 represents the A30~Q295 of chain A and chain B of KPC-2 respectively and the residue number of 529~693, 694~858 represents the A1~V165 of BLIP respectively.

3.3 运动相关性分析

图4给出了KPC-2和KPC-2-BLIP体系每个区域的运动相关性.从图A可以看出,蛋白结构明显分区,KPC-2的A链和B链运动方向基本相反.

在链的内部,可以清楚地观察到四条突出的线段,说明此四处残基的运动方向与链本身的运动方向相反.线段交汇处的亮点说明,这四处的运动方向又基本一致.此四处分别对应了KPC-2的Y47、

P183、D246、A262 附近区域,与之前快运动分析结果相一致. 在结合了 BLIP 后,KPC-2 的运动性差

异有略微降低. 且在复合物中,BLIP 与 KPC-2 具有相反的运动方向.

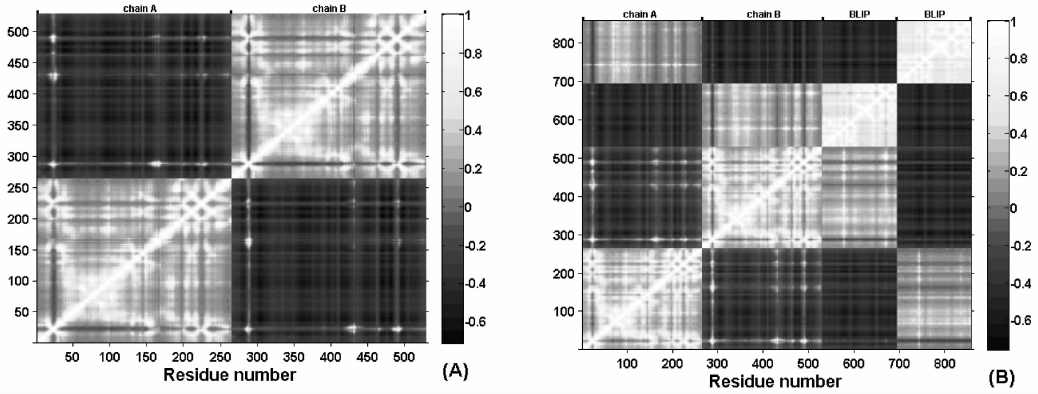


图 4 KPC-2 与 KPC-2-BLIP 的运动相关性图.

A 表示使用 ANM 计算所得的 KPC-2 运动相关性; B 表示使用 ANM 计算所得的 KPC-2-BLIP 运动相关性. 图中残基号的规定与图 3 一致.

Fig. 4 Cross-correlation map of KPC-2 and KPC-2-BLIP.

A: Cross-correlation map calculated using ANM for KPC-2; B: Cross-correlation map calculated using ANM for KPC-2-BLIP. The definition of residue number is the same with that of Fig. 3.

3.4 慢运动的方向

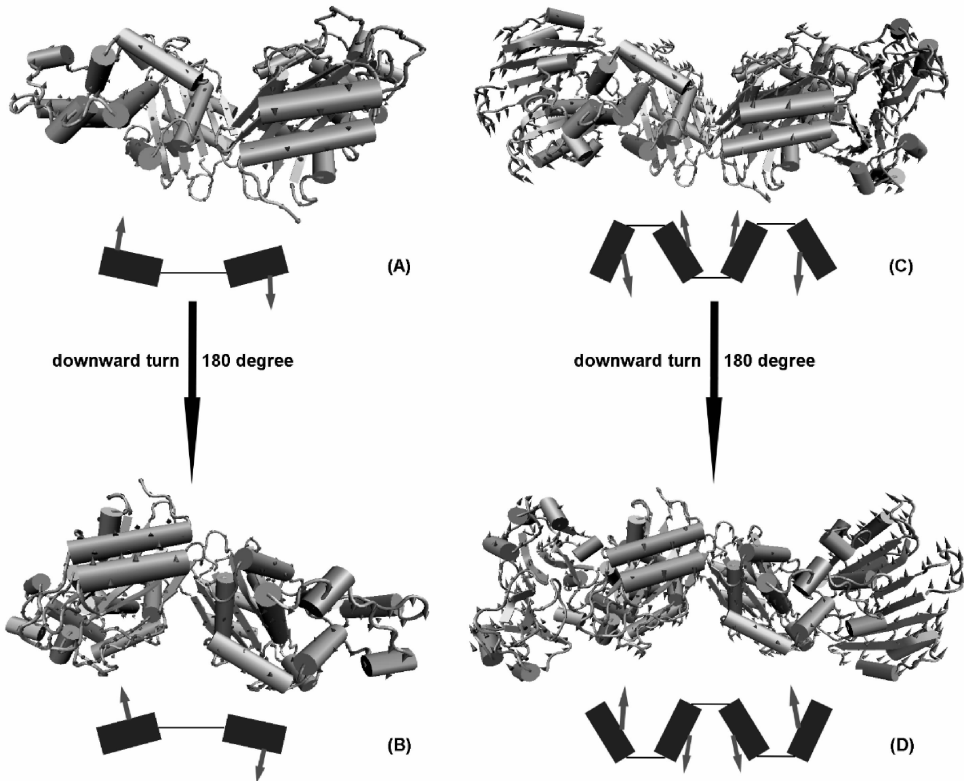


图 5 KPC-2 和 KPC-2-BLIP 的第一慢运动模式.

(A, B) 和 (C, D) 分别展示了 KPC-2 和 KPC-2-BLIP 的第一慢运动模式的前面观和背面观.

Fig. 5 The first slow motion modes of KPC-2 and KPC-2-BLIP.

The front and back face views for the first slow motion modes of KPC-2 and KPC-2-BLIP systems are illustrated in panel (A, C) and (B, D), respectively.

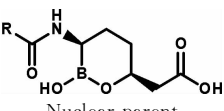



















3.5 分子对接

目前,开发有效的碳青霉烯类 β -内酰胺酶抑制剂是应对日益严重的多重耐药性革兰氏阴性菌感染的重要手段.有报道^[27-28],含硼酸药效团的化合物能抑制碳青霉烯类 β -内酰胺酶.而 Hecker 等^[12]在此基础上,设计合成了一类环硼酸 β -内酰胺酶抑制剂(RPX70099),能有效抑制以 KPC 为代

表的丝氨酸型碳青霉烯类 β -内酰胺酶,且不对哺乳动物丝氨酸蛋白酶产生抑制作用.为了进一步探究该类化合物对 KPC-2 的抑制机理,为开发 KPC-2 特异性抑制剂提供理论依据,我们对其报道的 18 个化合物进行了分子对接实验.表 1 给出了此 18 个化合物的结构式和效能(用 MPC₁ 表示).

表 1 用于分子对接的化合物结构和效能

Tab.1 Structures and potency of compounds used for the docking study

 Nuclear parent		 Cmpd #
		MPC ₁ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) *
	C1	0.30
	C2	0.15
	C3	0.15
	C4	0.30
	C5	0.30
	C6	0.02
	C7	0.30
	C8	0.15
	C9	0.15
	C10	0.15
	C11	0.15
	C12	0.04
	C13	0.16
	C14	1.25
	C15	0.61
	C16	0.30
	C17	1.25
	C18	0.61

* MPC₁ 是指将比阿培南 MIC 从 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (无抑制剂)到 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -内酰胺酶抑制剂所需的最低浓度.

对接结果显示,从 C1 到 C18 均结合在 KPC-2 的活性口袋中.结合其抑制活性和对接打分结果,选出了 4 个代表构象,如图 6 所示.从图 6 可以看出,此类化合物主要通过活性口袋中参与催化水解碳青霉烯类抗生素的各类关键残基形成氢键发挥抑制作用.

C6 表现出很强的抑制活性(MPC₁ = 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$),通过对比可以看出,C6 的结合模式与其他三者不同. C6 的羧基端与 N132 和 K73 共形成 3 个氢键,而 N132 与 K73 正是容纳碳青霉烯类 α -取代基的关键残基^[9,29,30];另外,C6 的酰胺端与 T235 形成了氢键,T235 是 β -内酰胺类羧基的结合位点之一.如此一来 C6 可以有效阻断 KPC-2 与底物

的识别;Y129 与 C6 游离羟基形成的氢键可以加固构象,增强抑制效果. C11 和 C12 的结构差异不大,但抑制活性相差显著.从图 6(B)和(D)可以看出,二者的结合模式基本一致;R220 是底物进入活性口袋的入口^[9],此处形成的氢键可以有效阻断底物的进入. T237 与 T235 一样为底物羧基结合位点,N170 与 N132 一样与底物 α -取代基结合有关,且是 KPC-2 催化底物去酰基化反应的关键残基.这些氢键为其发挥抑制活性奠定了基础;但由于吡啶环上的取代氨基影响了 C12 的构象,使硼环向外翻转,直接与催化中心 S70 形成氢键,大大提高了 C12 的抑制活性.氢键数目的增加也是 C12 活性大于 C11 的原因之一.另外,C13 也与 S70 形成

了氢键,这是其仍然具有较高活性的原因之一. 但与其他三者相比,由于其结合的部位偏向口袋的一侧,没有充分占据整个活性口袋,无法全面抑制

KPC-2 与底物的结合,所以表现出较 C6、C11 和 C12 稍低的活性.

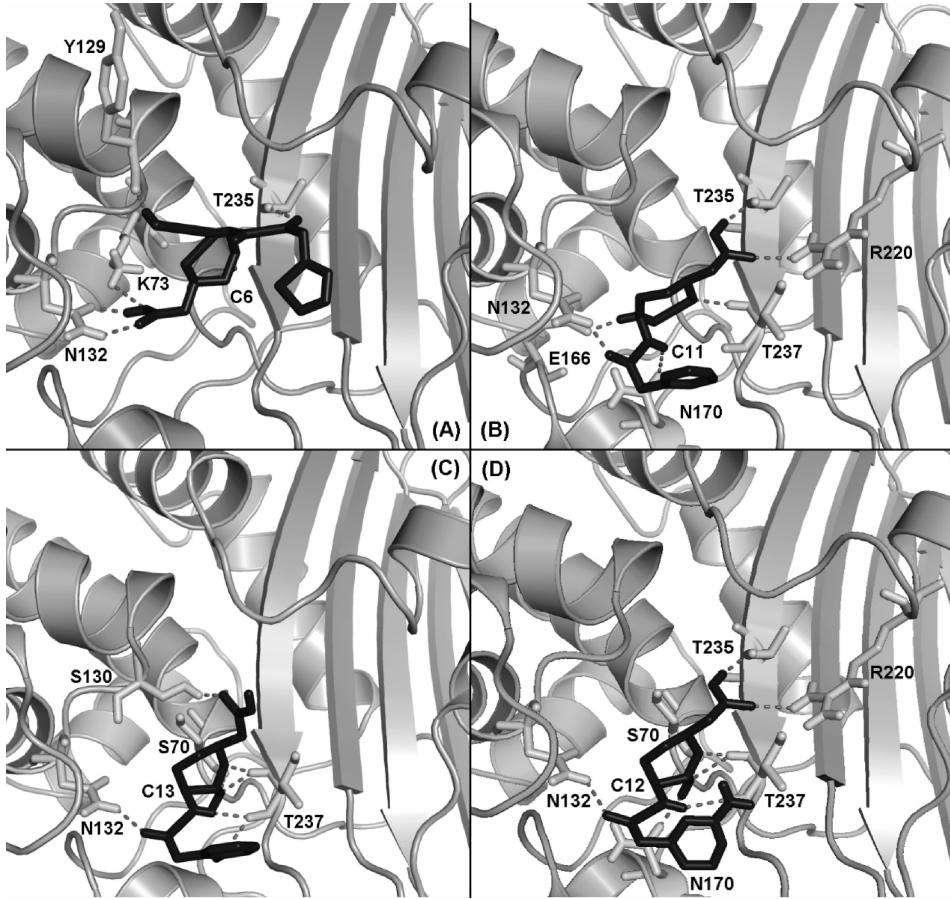


图 6 环硼酸类 β -内酰胺酶抑制剂与 KPC-2 代表结合模式图.

A: C6 的结合模式图; B: C11 的结合模式图; C: C13 的结合模式图; D: C12 的结合模式图.

Fig. 6 The representative binding modes of cyclic boronic acid β -lactamase inhibitor with KPC-2.

A: The binding mode of C6; B: The binding mode of C11; C: The binding mode of C13; D: The binding mode of C14.

3.6 分子动力学模拟

图 7 给出了 KPC-2 各个残基与环硼酸类 β -内酰胺酶抑制剂的代表化合物 C6、C11、C12 及 C13 结合时的自由能分布图. 对于该体系,关键残基的判据设为结合自由能小于 -2.09 kJ/mol. 能量分解结果显示, C238 (-6.32 kJ/mol)、T237 (-4.60 kJ/mol)、N170 (-4.43 kJ/mol) 和 G239 (-3.05 kJ/mol) 对 C6 与 KPC-2 的结合做出了较为突出的贡献; C11 与 KPC-2 结合的自由能主要分布在 N170 (-8.20 kJ/mol)、W105 (-7.53 kJ/mol)、C238 (-4.81 kJ/mol)、L167 (-4.73 kJ/mol)、P104 (-3.97 kJ/mol) 和 V240 (-2.55 kJ/mol) 该 6 处残基上; 而 C12 与 KPC-2 的识别主要由 T216 (-5.39 kJ/mol)、N218 (-4.10 kJ/mol)、Y129

(-3.01 kJ/mol)、S130 (-2.93 kJ/mol) 和 T215 (-2.89 kJ/mol) 完成; 在 C13 与 KPC-2 结合过程中具有突出贡献的残基主要是 W105 (-7.65 kJ/mol)、T235 (-6.52 kJ/mol) 和 T216 (-2.84 kJ/mol). 这一结果与 Ke 等^[9]通过 N, N-二羟乙基甘氨酸探测 KPC-2 活性口袋所得结果基本一致, 证明了分子模拟结果的可靠性.

总得来看, 这些关键残基对该类环硼酸类 β -内酰胺酶抑制剂与活性口袋结合时的能量贡献分别是: -18.40 kJ/mol (C6)、 -31.78 kJ/mol (C11)、 -18.32 kJ/mol (C12) 及 -17.02 kJ/mol (C13). 除 C11 外, 其余三个化合物抑制活性的差异均从能量的角度得到了较好的解释. 再结合前文相关氢键的分析, C11 较高的结合自由能却表现出较低的抑

制活性可能与其结合构象有关. 说明此类抑制剂在活性口袋中发挥抑制活性是结合自由能与氢键

综合作用的结果,且氢键作用大于自由能作用.

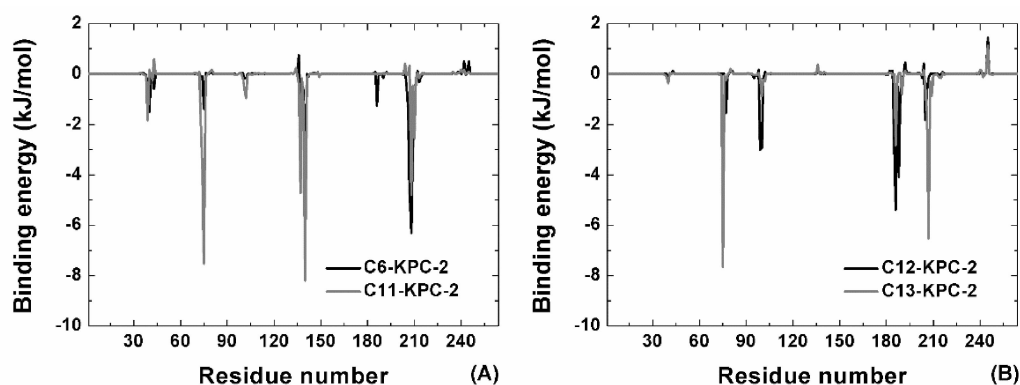


图7 环硼酸类 β -内酰胺酶抑制剂C6,C11,C12和C13的结合自由能分布图.图中定义的残基号与图3相同.

Fig. 7 The energy distribution map of cyclic boronic acid β -lactamase inhibitors C6, C11, C12 and C13 binding with KPC-2. The definition of residue number is the same with that of Fig. 3.

4 结论

用GNM和ANM方法探究了KPC-2和KPC-2-BLIP的运动模式.基于GNM计算得到的B因子值与实验数据较好的相关性,以及BLIP的预测结合靶点信息与实验信息的一致性都证明了粗粒化模型的可靠性.快、慢运动分析结果表明,驱动BLIP与KPC-2结合的动力学热点残基为KPC-2的P183、T187和BLIP的S108. BLIP与KPC-2的结合轻微降低了KPC-2的运动相关性,改变了运动方向.复合物的旋转运动有利于二者结合得更加紧密,使BLIP更好地发挥抑制作用.另外,18个环硼酸 β -内酰胺酶抑制剂与KPC-2的分子对接结果显示,此类抑制剂通过与该酶催化碳青霉烯类抗生素水解的关键残基形成氢键,阻止其与底物的识别,产生抑制活性.对结合构象的对比分析还发现,N132形成氢键的数目对该类抑制剂的活性有较大影响.能量分解结果还显示,W105、N170、T216、T237和C238对维持抑制剂结合构象贡献重大.这将为后续基于KPC-2结构的 β -内酰胺酶抑制剂设计提供一定的理论支持.

参考文献:

[1] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60 (3): 470.
 [2] Ambler R P, Coulson A F, Frere J M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases [J]. Biochem J, 1991, 276 (Part 1): 269.

[3] Yigit H, Queenan A M, Anderson G J, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 45(4): 1151.
 [4] Babic M, Hujer A M, Bonomo R A. What's new in antibiotic resistance Focus on beta-lactamases [J]. Drug Resis, 2006, 9(3): 142.
 [5] Grosso F, Quinteria S, Peixe L. Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(8): 1275.
 [6] Paterson D L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae [J]. Am J Med, 2006, 119 (6): S20.
 [7] Naas T, Nordmann P, Vedel G, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a klebsiella pneumoniae isolate from France [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, (10): 4423.
 [8] Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, et al. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(9): 3098.
 [9] Ke W, Bethel C R, Thomson J M, et al. Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A beta-lactamases [J]. Biochemistry, 2007, 46(19): 5732.
 [10] Strynadka N C J, Jensen S E, Johns K, et al. Structural and kinetic characterization of a beta-lactamase-inhibitor protein [J]. Nature, 1994, 368

- (6472): 657.
- [11] Hanes M S, Jude K M, Berger J M, *et al.* Structural and biochemical characterization of the interaction between KPC-2 beta-lactamase and beta-lactamase inhibitor protein [J]. *Biochemistry*, 2009, 48 (39): 9185.
- [12] Hecker S J, Reddy K R, Totrov M, *et al.* Discovery of a cyclic boronic acid β -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(9): 3682.
- [13] Hu J P, Liu M, Tang D Y, *et al.* Substrate recognition and motion mode analyses of PFV integrase in complex with viral DNA via coarse-grained models [J]. *PloS one*, 2013, 8(1): 464.
- [14] Haliloglu T, Bahar I, Erman B. Gaussian dynamics of folded proteins [J]. *Phys Rev Lett*, 1997, 79 (16): 3090.
- [15] Erman B. The Gaussian network model: precise predictions of residue fluctuations and application to binding problems [J]. *Biophys J*, 2006, 91(10): 3589.
- [16] Jernigan R L, Demirel M C, Bahar I. Relating structure to function through the dominant slow modes of motion of DNA topoisomerase II [J]. *Int J Quantum Chem*, 1999, 75(3): 301.
- [17] Atilgan A R, Durell S R, Jernigan R L, *et al.* Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model [J]. *Biophys J*, 2001, 80(1): 505.
- [18] Bahar I, Lezon T R, Yang L W, *et al.* Global dynamics of proteins: bridging between structure and function [J]. *Annu Rev Biophys*, 2010, 39(1): 23.
- [19] Pronk S, Páll S, Schulz R, *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(7): 845.
- [20] Wang J, Cieplak P, Kollman P A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules [J]. *J Comput Chem*, 2000, 21(12): 1049.
- [21] Wang J, Wolf R M, Caldwell J W, *et al.* Development and testing of a general amber force field [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25(9): 1157.
- [22] Jorgensen W L, Chandrasekhar J, Madura J D, *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water [J]. *J Chem Phys*, 1983, 79 (2): 926.
- [23] Ryckaert J P, Ciccotti G, Berendsen H J C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes [J]. *J Comput Phys*, 1977, 23 (3): 327.
- [24] Haliloglu T, Keskin O, Ma B, *et al.* How similar are protein folding and protein binding nuclei? Examination of vibrational motions of energy hot spots and conserved residues [J]. *Biophys J*, 2005, 88 (3): 1552.
- [25] Demirel M C, Atilgan A R, Bahar I, *et al.* Identification of kinetically hot residues in proteins [J]. *Protein Sci*, 1998, 7(12): 2522.
- [26] Bahar I, Atilgan A R, Demirel M C, *et al.* Vibrational dynamics of folded proteins: significance of slow and fast motions in relation to function and stability [J]. *Phys Rev Lett*, 1998, 80(12): 2733.
- [27] Smoum R, Rubinstein A, Dembitsky V M, *et al.* Boron containing compounds as protease inhibitors [J]. *Chem Rev*, 2012, 112(7): 4156.
- [28] Kiener P A, Waley S G. Reversible inhibitors of penicillinases [J]. *Biochem J*, 1978, 169(1): 197.
- [29] Swarén P, Maveyraud L, Raquet X, *et al.* X-ray analysis of the NMC-A β -lactamase at 1.64-resolution, a class A carbapenemase with broad substrate specificity [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(41): 26714.
- [30] Mourey L, Miyashita K, Swarén P, *et al.* Inhibition of the NMC-A β -lactamase by a penicillanic acid derivative and the structural bases for the increase in substrate profile of this antibiotic resistance enzyme [J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(36): 9382.