

# CDK5 与喹啉酮类抑制剂相互作用的分子模拟研究

王 伟,曹小宁,顾勇亮,朱小蕾

(南京工业大学化学化工学院,材料化学工程国家重点实验室,江苏 南京 210009)

[摘要] 本文采用分子对接、分子动力学模拟(MD)和结合自由能计算等方法研究了 3 种喹啉酮类抑制剂与 CDK5 的相互作用,并且分析和讨论了药物与其周围残基之间的氢键和疏水作用.模拟结果还表明 M1 和 M2 与 CDK5 的结合模式很相似,但残基分解分析表明残基 Ile10 对于区分 M1 和 M2 之间不同的生物活性起到关键的作用.然而,M3 的结合模式与 M1 或 M2 相比却有一些不同,其中它与残基 Asn144 之间的静电作用在结合过程中起到了关键的作用.本文的工作对于以后设计新型的有较高选择性的 CDK5 抑制剂具有一定的指导意义.

[关键词] 喹啉酮类抑制剂,细胞色素依赖蛋白激酶-5,分子动力学模拟,结合自由能

[中图分类号]O643.1 [文献标志码]A [文章编号]1001-4616(2013)02-0056-05

## Study on Binding of Quinolinone Inhibitors to CDK5 Based on Molecular Dynamics Simulation

Wang Wei, Cao Xiaoning, Gu Yongliang, Zhu Xiaolei

(State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Molecular docking, molecular dynamics (MD) simulations, and binding free energy analysis are performed to investigate the interactions between three quinolinone inhibitors and CDK5. The hydrogen bonding and hydrophobic interactions between inhibitors and adjacent residues are analyzed and discussed. The results illustrate that the binding modes of M1 and M2 with CDK5 are quite similar. And the energy decomposition analysis reveals that the residue I10 is one key residue for the different bioactivity between M1 and M2. However, M3 in M3/CDK5 exhibits a different binding mode compared to M1 or M2, the electrostatic energy between M3 and residue Asn144 plays a key role in the binding. The results of our work may be helpful for the design of novel and selective CDK5 inhibitors.

**Key words:** quinolinone inhibitors, CDK5, molecular dynamics simulation, binding free energy

细胞周期素蛋白依赖性激酶 5 (CDK5) 属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族,它是这个家族中的一个特殊成员<sup>[1,2]</sup>. CDK5 主要由一个 N 端、一个 C 端和位于它们之间的一个深的 ATP 结合区域组成. 其中它的 N 端是由 85 个残基组成的  $\beta$  折叠结构, C 端由含有 170 个氨基酸的  $\alpha$  螺旋组成<sup>[3]</sup>. 大多数 CDKs 都只涉及细胞进程,比如细胞周期、转录调控等. 它们的活化需要通过与细胞周期蛋白相结合来实现<sup>[4]</sup>. 然而, CDK5 并不涉及细胞周期调控过程却在神经中枢系统中起着不可缺少的作用<sup>[5]</sup>. 许多研究表明 CDK5 可以通过磷酸化调节许多底物的活性并且参与发育过程中神经突起的成长、神经元的迁移、大脑表皮的分层等<sup>[6]</sup>. 与其他 CDKs 相似, CDK5 单体没有活性,需要调节亚基来激活<sup>[7]</sup>. CDK5 的活性需要通过与活化因子 (p35 或者 p39) 相结合来激活. CDK5 的过度表达容易导致神经退行性变,并且 CDK5 活性的增加会产生一系列疾病如阿尔茨海默病、肌萎缩性侧束硬化症、帕金森氏病、亨廷顿氏病等. 因此, CDK5 已经被作为潜在的治疗神经类疾病的重要靶点<sup>[8]</sup>.

目前,许多不同种类的 CDK5 抑制剂已经通过实验方法研究出来,比如苯醌类、靛玉红类、嘌呤类<sup>[9-11]</sup> 抑制剂. 日前, Rzas 等人<sup>[12]</sup> 设计并合成了一系列 2-喹啉酮类衍生物,并且讨论了它们作为 CDK5 抑制剂

收稿日期:2013-01-08.  
基金项目:国家自然科学基金项目(21276122,21136001,20876073).  
通讯联系人:朱小蕾,教授,博士生导师,研究方向:分子模拟. E-mail:xlzhu@njut.edu.cn

时所表现的生物活性.然而,这些抑制剂与 CDK5 之间的作用机理未见报道,该研究有利于加速实验进程.在本文中,我们利用分子对接、分子动力学模拟和结合自由能计算研究了 3 种喹啉酮类抑制剂与 CDK5 的结合模式.残基能量分解结果揭示了范德华作用力对于稳定 3 种 CDK5 复合物的活性位点起着关键的作用.

## 1 计算方法

### 1.1 初始结构构建

CDK5 的晶体结构是从蛋白质数据库(PDB 代码:1UNL,分辨率为 2.20 Å)中提取的,同时删除 PDB 文件中所有的结晶水和配体分子. CDK5 的晶体结构是由两条相似的链组成的,我们选取其中的 1 条链用做下面的对接和模拟过程.在本文中,这 3 种抑制剂的结构通过 3D 图形软件构建,然后利用 B3LYP/6-31G\* 方法<sup>[13]</sup>进行结构优化.这 3 种用于对接的抑制剂的结构如图 1 所示.

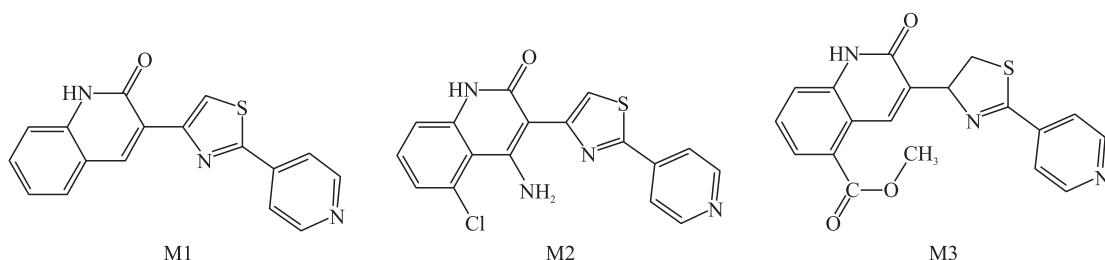


图 1 3 种喹啉酮类药物的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of three quinolinone inhibitors

### 1.2 分子对接

为了得到合理的抑制剂与 CDK5 复合物的初始结构,我们利用 Autodock 4.0 程序采用拉马克遗传算法进行了分子对接.对接过程中,药物分子的键设置为可自由旋转,而 CDK5 为刚性.在对接之前,极性氢原子被加到 CDK5 并且科尔曼全原子电荷被添加到 CDK5 的部分原子上.格点盒子集中于 CDK5 的 ATP-结合位点处.盒子大小设为 100 Å×100 Å×100 Å,间距设置为 0.375 Å.我们进行 200 次独立的对接计算,能量评价值设置为 25,000,000,布局大小为 300.在本文中,对接的结果根据均方根偏离标准 2.0 Å 进行归类成簇.

### 1.3 分子动力学模拟

我们采用 AMBER10.0 软件<sup>[14]</sup>进行分子动力学模拟.蛋白质和配体分别采用 AMBERFF03 力场和 GAFF 力场.配体的氢原子和 RESP 电荷通过 Antechamber 模块添加.整个体系溶入到一个切去顶端的八面体溶剂盒子里,水分子的类型为 TIP3P.然后加入反离子( $N_a^+$ )使体系呈电中性.在模拟之前,每个复合物都进行最速下降法优化和共轭梯度法优化.最后在 NPT 系综下对每个体系进行 20 ns 非限制的分子动力学模拟.

### 1.4 结合自由能计算

本文中,我们利用 MM-PBSA 方法计算了药物与 CDK5 之间的结合自由能.我们从产物模拟最后 10 ns 的轨迹中提取了 200 个构象进行分析.MM-PBSA 的方法描述如下:

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

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S, \quad (2)$$

$$\Delta E_{\text{gas}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdW}}, \quad (3)$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{nonpolar}}, \quad (4)$$

$$\Delta G_{\text{nonpolar}} = \gamma(\text{SASA}) + \beta. \quad (5)$$

上述方程式(1)中  $\Delta G(\text{complex})$ ,  $\Delta G(\text{protein})$  and  $\Delta G(\text{ligand})$  分别代表复合物,蛋白质以及配体的自由能.其中 SASA、溶剂可及性表面积可以通过 Molsurf 方法进行估算,溶剂探针半径为 1.4 Å.对应的溶剂参数  $\gamma$  和  $\beta$  分别为 0.005 42 kcal/(mol·Å) 和 0.92 kcal/mol.溶质和溶剂的介电常数分别设为 1 和 80.

2 结果讨论

在本文中,3 种喹啉酮类抑制剂被对接到 CDK5 上. 3 种复合物的具体结合模式如图 2 所示. 整体而言,所有的药物都位于由残基 Ile10、Ala31、Lys33、Val64、Phe80、Glu81、Phe82、Cys83、Asp84、Gln85、Asp86、Lys89、Leu133 和 Asn144 组成的疏水口袋中. 3 种复合物可分为两种结合模式:(I) M1 和 M2 与 CDK5 的结合模式是很相似的,它们与残基 Cys83 和 Glu81 都形成了一些氢键;(II) M3 中的喹啉环与残基 Asn144 之间可以形成两个氢键,并且与处于 5 位上的酯基与残基 Cys83 和 Glu81 也能形成一些氢键.

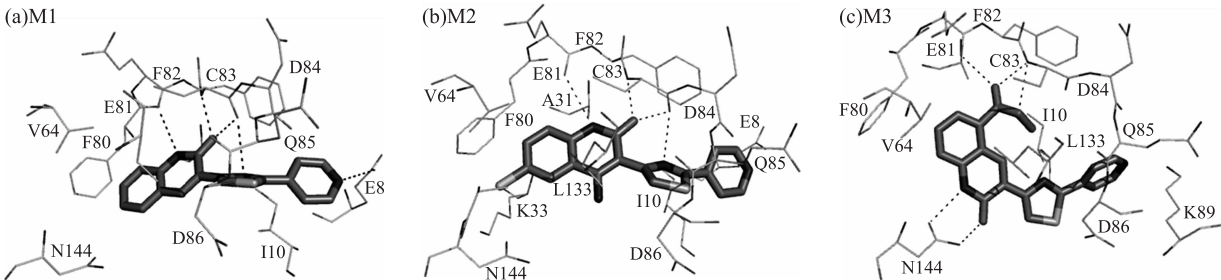


图 2 CDK5 与喹啉酮类药物的对接结合模式

Fig.2 The detail binding modes of CDK5 docking with quinolinone analogues of M1(a);M2(b);M3(c)

2.1 体系的稳定性

为了考察模拟体系的稳定性,我们分析了结合态以及游离态 CDK5 上骨架 Cα 原子的均方根偏离(RMSD). 所有体系 RMSDs 值都在 ~1.5 Å 附近上下波动,这个结果表明这 3 种复合物动力学平衡的稳定性是合理的.

2.2 药物与 CDK5 的结合模式及其抑制活性

为了考察药物与周围残基的相互作用,我们利用 LIGPLOT 程序分析了氢键及疏水相互作用. 如图 3(a)所示,M1 与其周围的残基之间形成了两条氢键. 一条氢键形成于 M1 喹啉环上 N7 原子与残基 Glu81 的羰基氧之间,另一条形成于 M1 中的酮氧(O11)与残基 Cys83 的氮原子之间. 另外,我们也注意到 M1 中的吡啶基团以及喹啉基团与周围的残基 Ile10、Val18、Val64、Phe80、Asp84、Leu133 之间都存在一些疏水作用,说明这些疏水作用对于 M1 与 CDK5 之间结合的稳定性也是有利的. 如图 3(b)所示,M2 的结合模式与 M1 是相似的. 图 3(c)显示了 M3 和 CDK5 之间的结合模式. 从图中可以看出,在 M3 和 CDK5 之间存在着 3 条稳定的氢键. 一条氢键位于 M3 喹啉环中 5 位上的羧基氧原子(O24)与残基 Cys83 的主链氮原子之间,另外两条则与残基 Asn144 形成. 这个结果也与我们之前的对接结果相一致. 上述结果表明氢键以及疏水作用的不同可能是导致 3 种药物活性不同的主要原因.

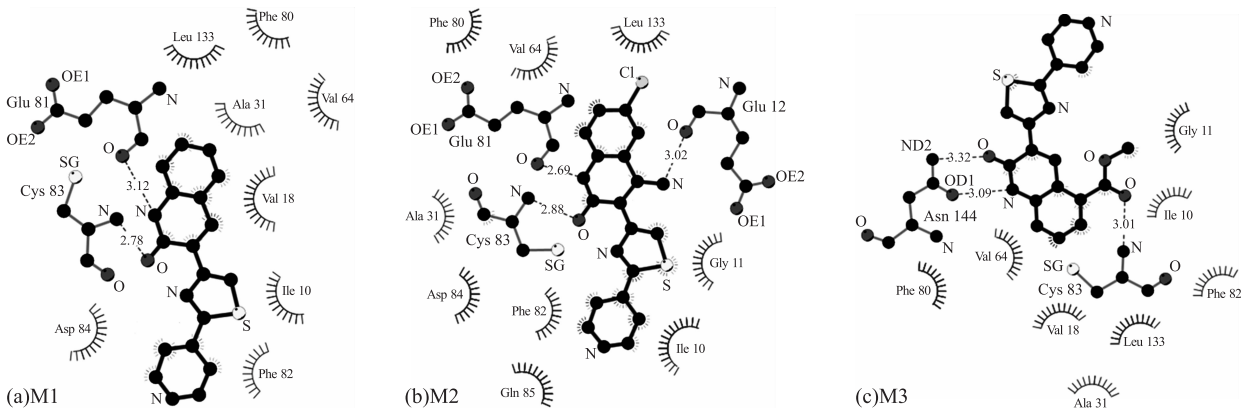


图 3 结合位点的氢键和疏水作用的二维图. 虚线代表氢键,穗状残基代表疏水作用

Fig.3 2D representation of hydrogen bond and hydrophobic interactions. Dashed lines represent hydrogen bonds, and spiked residues form hydrophobic interactions

为了深入了解 CDK5 与 3 种药物之间的相互作用,本文采用了 MM-PBSA 方法计算了复合物的结合自

由能( $\Delta G_{\text{bind}}$ ),结果如表 1 所示.从表中可以看出,3 种复合物 CDK5/M1、CDK5/M2 和 CDK5/M3 的结合自由能分别为-27.82、-35.17 和-29.56 kcal/mol,并且计算得到的结果与实验中所得到的抑制常数相一致.另一方面,范德华作用对结合自由能的贡献最大,此外非极性溶剂自由能( $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ )也有较小的贡献.而极性溶剂化能却是相当不利的.尽管气相静电能( $\Delta E_{\text{ele}}$ )对于结合是有利的,但也不能完全抵消极性溶剂化能( $\Delta G_{\text{PB}}$ )所带来的不利影响,因此净的静电贡献对于受体与配体的结合也是不利的.

表 1 通过 MM-PBSA 方法计算得到的结合自由能(kcal·mol<sup>-1</sup>)

能量项	CDK5/M1		CDK5/M2		CDK5/M3	
	平均值	偏差	平均值	偏差	平均值	偏差
$\Delta E_{\text{ele}}$	-14.25	2.92	-22.64	3.32	-15.81	4.18
$\Delta E_{\text{vdW}}$	-38.26	2.85	-47.43	2.43	-40.89	2.13
$\Delta E_{\text{gas}}$	-52.51	3.73	-70.07	3.97	-56.70	4.35
$\Delta G_{\text{pol}}$	29.74	2.81	40.27	2.98	32.41	3.87
$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	-5.05	0.13	-5.37	0.08	-5.27	0.22
$\Delta G_{\text{sol}}$	24.69	2.74	34.90	2.97	27.15	3.72
$\Delta G_{\text{bind}}$	-27.82		-35.17	3.33	-29.56	
IC <sub>50</sub>	0.054		0.004		0.033	

为了进一步了解每个残基对结合自由能的贡献,本文进行了基于残基的结合自由能分解. M1 和 M2 主要与残基 I10、V18、E81、F82、C83 和 L133 结合.然而对于 CDK5/M3,其能量谱图却不同于 M1 和 M2.它作用的残基主要集中于 I10、V18、F80、E81、F82、C83、L133 和 N144.此外,如图 4 所示,基于每个残基的结合自由能被分解为范德华相互作用能,静电与极性自由能之和以及非极性溶剂自由能.从图中可以看出,药物和 CDK5 结合的主要驱动力是范德华作用和非极性溶剂能.对于 CDK5/M1 复合物,总体上其主要驱动力是范德华作用,但是对于残基 Glu81、Phe82 和 Cys83,静电作用力对于药物与 CDK5 之间的结合也是有利的.这个结果与上述 M1 与 CDK5 之间形成的氢键是一致的. M1 中的吡啶环与残基 Ile10 侧链的堆积作用,使得 M1 与 Ile10 之间的范德华作用力达到了-2.33 kcal·mol<sup>-1</sup>. M1 的喹啉环被包围在一个由残基 Val18、Phe82 和 Leu133 的侧链组成的疏水口袋中,使其与这 3 个残基具有较强的范德华作用.与 CDK5/M1 相似,在 M2 与 CDK5 结合过程中,对于残基 Glu81、Phe82 和 Cys83 而言,静电作用也起着很重要的作用.并且其喹啉环同样被包围在由残基 Ile10、Val18、Phe82 和 Leu133 组成的疏水口袋中,产生了较强的范德华作用.此外,我们发现与残基 Ile10 之间的范德华作用对于区分 M1 和 M2 之间不同的生物活性起到关键的作用.对于 CDK5/M3 复合物,其作用能谱与 M1 或 M2 相比有一些不同,这跟其与 CDK5 的结合模式不同相一致.如图 4(c)所示,其主要驱动力仍为范德华作用力,然而对于残基 Asn144 而言,其静电作用在结合过程中起关键的作用.这个结果与 M3 和 Asn144 之间形成的两条稳定的氢键相一致.如上述所示,M3 和 CDK5 之间不同的结合模式对于比较这 3 种药物之间不同的抑制活性也是很重要的.

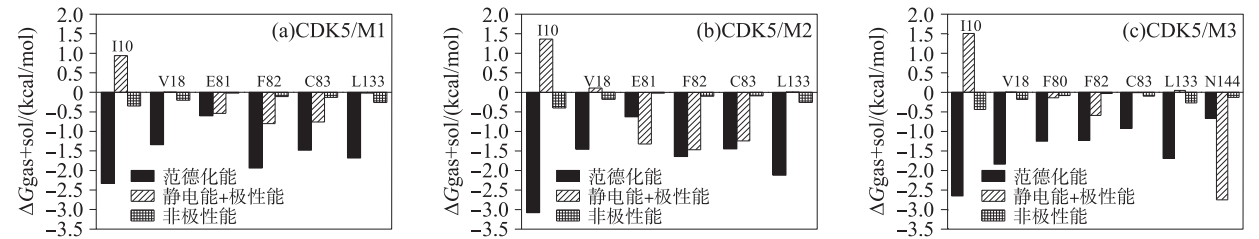


图 4 基于关键残基的 3 种复合物  $\Delta G_{\text{drug-residue}}$  的自由能分解

Fig. 4 Decomposition of  $\Delta G_{\text{drug-residue}}$  for the key residues of the three complexes

3 结论

在本文中,我们利用分子对接、分子动力学模拟和结合自由能计算研究了 3 种喹啉酮抑制剂与 CDK5 之间的相互作用.模拟结果表明 M1 和 M2 与 CDK5 的结合模式很相似,但残基 Ile10 对于区分 M1 和 M2 之间不同的生物活性起到关键的作用. M3 的结合模式不同于 M1 或 M2,其中它与残基 Asn144 之间形成

的氢键作用在结合过程中起到了关键的作用. 本文的工作对于以后设计新型的 CDK5 抑制剂具有一定的指导意义.

### [参考文献]

- [1] Mapelli M, Musacchio A. The structural perspective on CDK5[J]. *Neurosignals*, 2003, 12: 164–172.
- [2] Dhavan R, Tsai L H. A Decade of CDK5[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 749–759.
- [3] Zhang B, Su Z C, Tay T E, et al. Mechanism of CDK5 activation revealed by steered molecular dynamics simulations and energy calculations[J]. *J Mol Model*, 2010, 16: 159–168.
- [4] Cicean J, Valius M. The CDK inhibitors in cancer research and therapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137: 1409–1418.
- [5] Tarricone C, Dhavan R, Peng J. Structure and regulation of the CDK5–p25nck5a complex[J]. *Mol Cell*, 2001, 8(3): 657–669.
- [6] Dhariwala F A, Rajadhyaksha M S. An unusual member of the Cdk family: Cdk5[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(3): 351–369.
- [7] Pitchuanom S, Boonyarat C, Forli S, et al. Cyclin-dependent kinases 5 template; useful for virtual screening[J]. *Comput Biol Med*, 2012, 42(1): 106–111.
- [8] Glicksman M A, Cuny G D, Liu M, et al. New approaches to the discovery of cdk5 inhibitors[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4(5): 547–549.
- [9] Leost M, Schultz C, Link A, et al. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and cyclin-dependent kinase 5/p25[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(19): 5983–5994.
- [10] Beauchard A, Ferandin Y, Frère S, et al. Synthesis of novel 5-substituted indirubins as protein kinases inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(18): 6434–6443.
- [11] Chang Y T, Gray N S, Rosania G R, et al. Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors[J]. *Chem Biol*, 1999, 6(6): 361–375.
- [12] Rzasa R M, Kaller M R, Liu G, et al. Structure-activity relationships of 3,4-dihydro-1H-quinazolin-2-one derivatives as potential CDK5 inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(20): 6574–6594.
- [13] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. Gaussian 09, Revision A.02[M]. Wallingford: Gaussian Inc, 2009.
- [14] Case D A, Cheatham T A, Simmerling C L, et al. AMBER 10[M]. San Francisco: University of California, 2008.

[责任编辑:顾晓天]