

# N端 6-甲基辛酰基化修饰对小肽 KTKKKFLKKT 结构的影响\*

陈芳进<sup>1\*\*</sup> 刘涛<sup>1\*\*</sup> 潘和平<sup>1\*\*</sup> 李浩宏<sup>2</sup> 王晓磊<sup>3</sup> 赵东升<sup>3</sup> 冯健男 刘少君<sup>1\*\*\*</sup>

1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; 2. 福州大学化学化工学院, 福州 350108;

3. 军事医学科学院卫生勤务与医学情报研究所, 北京 100850

**摘要** 得到生物活性肽的三维结构, 有助于预测和理解其功能机理. 研究发现对小肽 KTKKKFLKKT 的 N 端进行 6-甲基辛酰基化修饰后, 其细胞毒性增强. 用 nnPredict 服务器预测, 发现该小肽具有  $\alpha$  螺旋二级结构序列特征. 为研究此修饰造成该小肽细胞毒性增强的分子机理, 用 AMBER 软件对该小肽进行全原子折叠模拟, 发现其最低能量结构确实形成右手  $\alpha$  螺旋. 再对该结构的 N 端进行 6-甲基辛酰基化修饰后, 以分子动力学模拟计算, 发现 6-甲基辛酸可通过与氨基酸侧链间的疏水作用破坏小肽最低能量结构的  $\alpha$  螺旋, 增强了该小肽疏水相互作用, 这可能是此修饰造成该小肽细胞毒性增强的原因所在, 这为指导实验研究其细胞毒性分子机理和进一步修饰设计奠定了基础.

**关键词** 生物活性肽 酰基化修饰 广义波恩模型 全原子结构预测折叠

小肽具有多种多样的生物学活性, 被广泛用于药物设计筛选等领域. 研究发现, 我们设计的小肽 KTKKKFLKKT 具有一定细胞毒性, 而当对其 N 端赖氨酸进行 6-甲基辛酰基化修饰后, 其细胞毒性明显增强(因涉及专利而未发表). 为了解其中的分子机理, 本文首先利用全原子结构预测和折叠模拟的分子动力学(molecular dynamics, MD)方法获得该小肽的三维结构, 然后对此结构 N 端赖氨酸进行 6-甲基辛酰基化修饰, 再通过分子动力学模拟方法研究这一修饰对小肽结构的影响, 以期从理论上了解其分子水平的变化并指导进一步的活性肽修饰设计.

## 1 方法

### 1.1 二级结构预测

我们使用 nnPredict<sup>[1]</sup> 服务器(<http://www.cmpharm.ucsf.edu/>)进行肽序列的二级结构预测.

### 1.2 6-甲基辛酸(6-methyl Octanoic Acid, OA)结构的获得

由于没有 6-甲基辛酸的现成结构可用, 我们使用高斯软件包, 采用密度泛函理论<sup>[2]</sup>中的 B3LYP/3-21G 基组对 6-甲基辛酸进行结构优化, 最终得到 6-甲基辛酸的结构.

### 1.3 小肽的全原子预测和折叠模拟

我们使用 AMBER/parm99 力场<sup>[3]</sup>, 以 GB<sup>0BC</sup>(A. Onufriev, D. Bashford 和 D. A. Case 等开发的改良 generalized born)模型构建小肽 KTKKKFLKKT 的结构. 初始线性结构经 2000 步最小化后, 分 7 步加热至 315 K, 具体加热参数见表 1. 然后进行超过 100 ns 的无约束恒温 MD 模拟, 步长为 2 fs, 使用 Berendsen 方法进行温度控制. 全程采用 SHAKE 方法约束涉及氢原子的共价键键长, 非键相互作用的截断半径设为 999 Å.

2009-06-02 收稿, 2009-07-07 收修改稿

\* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 001CB510206, 2009CB918301)和国家自然科学基金(批准号: 30430310 和 30670791)资助项目

\*\* 同等贡献作者

\*\*\* 通信作者, E-mail: liusj@nic.bmi.ac.cn

表 1 小肽 KTKKKFLKKT 的加热参数

步骤	步长/fs	计算时间/ps	初始温度/K	目标温度/K	温度耦合常数/ps
1	0.5	5	0	50	1.0
2	0.5	5	50	100	1.0
3	0.5	5	100	150	1.0
4	0.5	5	150	200	1.0
5	0.5	5	200	250	1.0
6	0.5	5	250	275	1.0
7	0.5	20	275	315	1.0

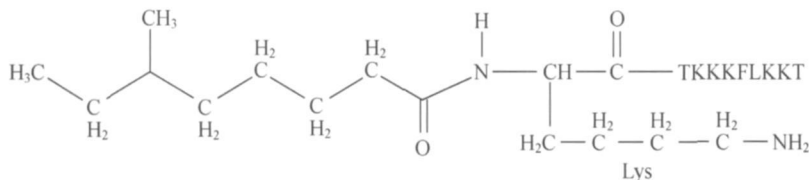


图 1 N 端 6-甲基辛酰基化小肽

### 1.5 模拟轨迹的 RMSD (root mean square deviation) 聚类分析

使用 MMTSB 工具包<sup>[4]</sup> 和 AMBER 软件包<sup>[3]</sup>, 对分子动力学模拟得到的结构轨迹进行基于氨基酸主链原子 RMSD 的聚类分析, 半径取默认值 6 Å.

### 1.4 6-甲基辛酰基化小肽三维结构的模拟

使用 AMBER 软件包的 antechamber 工具处理 6-甲基辛酸结构, 生成其参数文件. 使用 AMBER 软件包的 xleap 程序, 在获得的小肽结构的 N 端 Lys 的 N 原子上连接 6-甲基辛酸(图 1), 角度和二面角等参数参考肽酰基. 以计算小肽 KTKKKFLKKT 同样的方法, 对修饰后的小肽进行 100 ns 的无约束恒温 MD 模拟.

## 2 结果

### 2.1 小肽形成稳定的 Lys4-Lys5-Phe6-Leu7 右手 α 螺旋结构

用 nnPredict<sup>[1]</sup> 服务器对小肽 KTKKKFLKKT 序列进行分析, 结果显示其 Lys5, Phe6 和 Leu7 符合形成 α 螺旋的序列特征(图 2(a)). 采用 AMBER

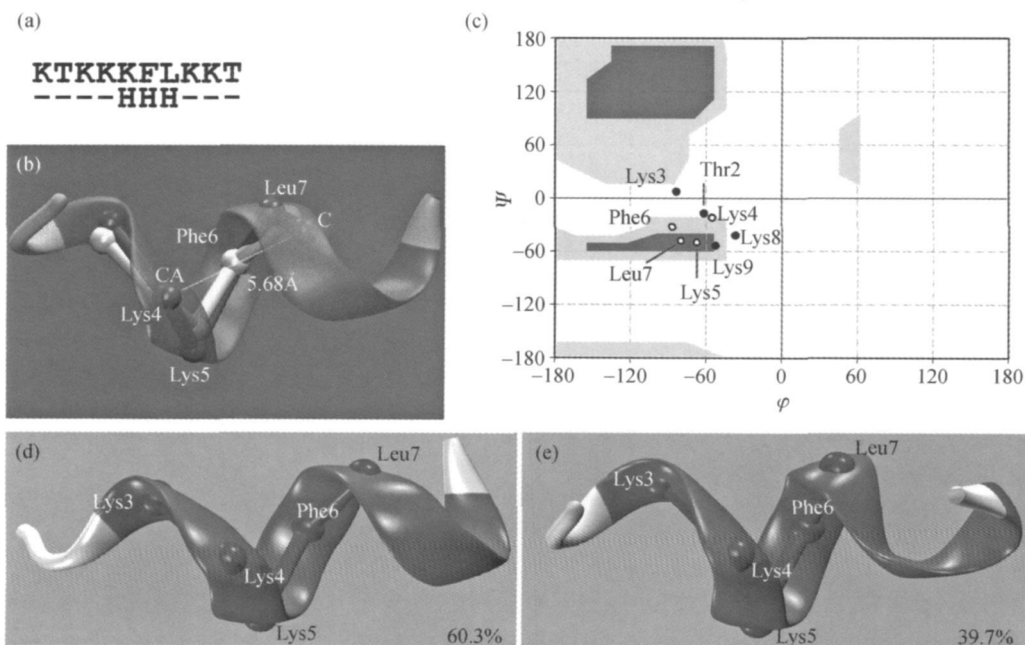


图 2 小肽 KTKKKFLKKT 的结构

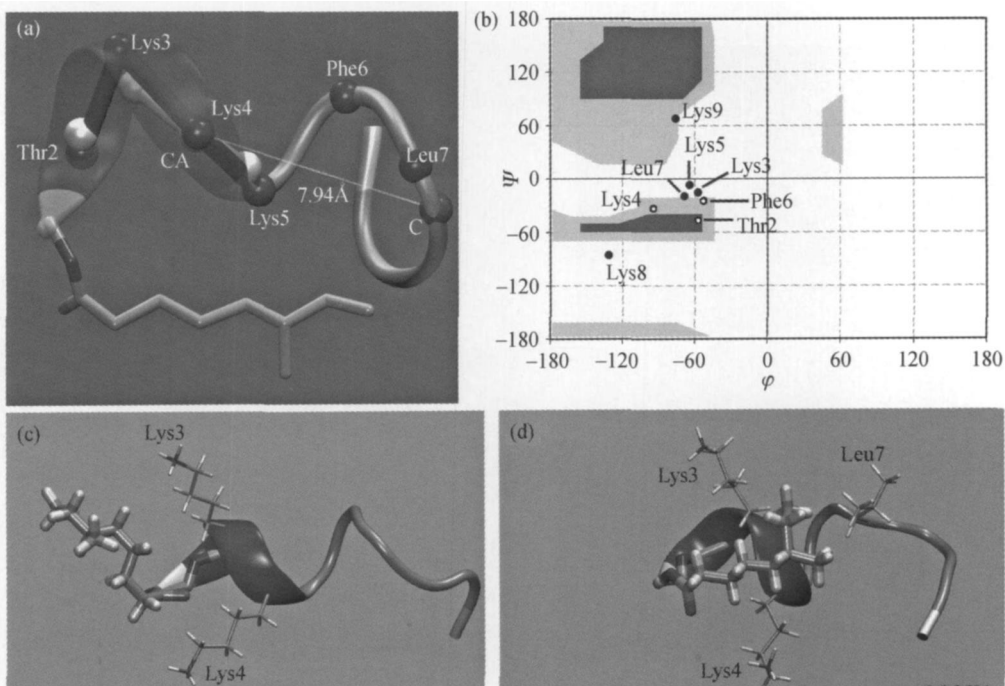
(a) 二级结构预测结果, “H” 代表 α 螺旋, “—” 代表不规则卷曲结构; (b) 模拟的最小能量结构(卡通及黑色球棍)和平均结构(白色球棍); (c) 最小能量结构的 Ramachandran 图, 在右手 α 螺旋二面角允许范围内的氨基酸以中空黑色圆圈表示; (d), (e) 为模拟轨迹两个聚类的代表性结构, 百分数代表该类结构在模拟轨迹中的百分比.

软件包对该小肽进行全原子结构预测和折叠模拟(100 ns), 发现其能量最小结构形成以 Lys4-Lys5-Phe6-Leu7 右手  $\alpha$  螺旋为核心的螺旋结构(图 2(b)), 核心  $\alpha$  螺旋的螺距(Lys4 的 CA 到 Leu7 的 C)为 5.68 Å ( $\alpha$  螺旋的典型螺距为 5.4 Å), Lys4, Lys5, Phe6 和 Leu7 的二面角也均在右手  $\alpha$  螺旋二面角允许范围内(图 2(c)). 取折叠模拟 5—100 ns 的平均结构与能量最小结构叠合, 结果显示两者 Lys3, Lys4, Lys5, Phe6 和 Leu7 的 CA 原子基本重叠(图 2(b)), 其 RMSD 为 0.76 Å; 又对折叠模拟 5—100 ns 的结构轨迹进行基于氨基酸主链原子 RMSD 的聚类分析, 结果得到两个聚类, 取每个聚类中最接近其中心结构的结构进行分析, 发现其中一个聚类的代表性结构与最低能量结构在 2—8 位残基位置非常接近, 模拟过程中 60.3% 的结构归于此类(图 2(d)), 其余 39.7% 的结构归于另一个聚类(图 2(e)), 其代表性结构与最低能量结构在 1—7 位残基位置非常接近, 两个聚类的代表性结构均形成 Lys4-Lys5-Phe6-Leu7 的右手  $\alpha$  螺旋结构, 表明在整个模拟过程中, Lys4, Lys5, Phe6 和 Leu7 这 4 个氨基酸长时间处于右手  $\alpha$  螺旋状态.

## 2.2 N 端 6-甲基辛酰基化破坏了部分螺旋结构

我们将 6-甲基辛酸连接到小肽 KTKKKFLKKT

第一位 Lys 的 N 原子上, 以 AMBER 软件包进行分子动力学模拟至 100 ns, 发现其能量最小结构中, 仅 Thr2-Lys3-Lys4 形成右手  $\alpha$  螺旋结构(图 3(a)), 其他氨基酸则呈无规则卷曲结构, 小肽 Lys4-Lys5-Phe6-Leu7 所形成的右手  $\alpha$  螺旋结构被破坏, Lys4 的 CA 原子到 Leu7 的 C 原子的距离增至 7.94 Å, 只有 Thr2, Lys4 和 Phe6 的二面角处于右手  $\alpha$  螺旋二面角允许范围内(图 3(b)). 取折叠模拟过程 5—100 ns 的平均结构与能量最小结构叠合, 结果显示两者 Thr2, Lys3, Lys4 和 Lys5 的 CA 原子基本重叠(图 3(a)), 其 RMSD 为 0.91 Å; 又对折叠模拟 5—100 ns 的结构轨迹进行基于氨基酸主链原子 RMSD 的聚类分析, 结果得到 4 个聚类, 取每个聚类中最接近其中心结构的结构进行分析, 发现四个聚类代表性结构的 2—5 位残基 CA 原子的位置比较稳定(图 3(c)–(f)), 而自 5 位残基起到 C 末端则均呈互不相同的无规则卷曲结构, 其中 3 个聚类(67.16% 的结构)的代表性结构(图 3(c), (d), (f))仅在 2—4 位残基位置形成右手  $\alpha$  螺旋结构, 一个聚类(32.84% 的结构)的代表性结构(图 3(e))仅在 3—4 位残基位置形成右手  $\alpha$  螺旋结构.



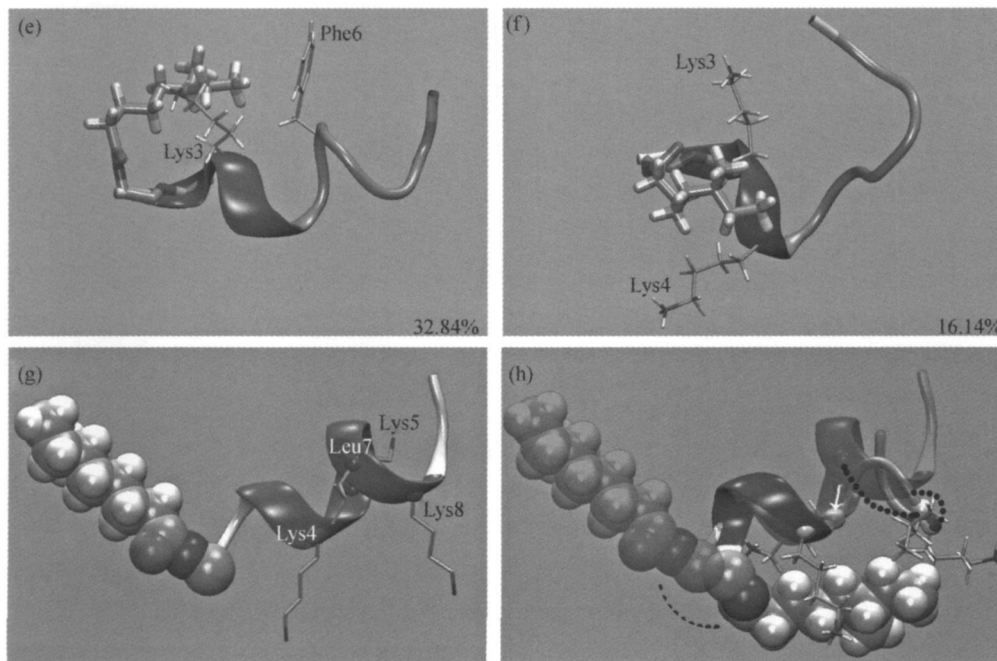


图 3 N 端 6-甲基辛酰基化小肽 KTKKKFLKKT 的结构

(a) 模拟的最小能量结构(卡通及黑色球棍)和平均结构(白色球棍); (b) 最小能量结构的Ramachandran图, 在右手 $\alpha$ 螺旋二面角允许范围内的氨基酸以中空黑色圆圈表示; (c)–(f) 模拟轨迹四个聚类的代表性结构, 百分数代表该类结构在模拟轨迹中的百分比; (g) 6-甲基辛氨酸(范德华球体)与小肽(卡通)相连的初始结构; (h) 最小能量结构与初始结构(半透明)的叠合比较, Lys5、Leu7 和 Lys8 的 CA 原子及 6-甲基辛酰基的位置变动以箭头或虚线指示

我们观察了相对于第一个肽酰基平面的碳原子的二面角  $\lambda$  的变化, 小肽 KTKKKFLKKT 最小能量结构的  $\lambda$  值(Lys1 :CB-Lys1 :CA-Lys1 :C-Thr2 :N) 为  $117.27^\circ$  (图 4(a)), 而 6-甲基辛酰基化后, 最小能量结构的  $\lambda$  值(OA : C14-OA : C17-OA : C22-Lys1 : N) 为  $-77.36^\circ$  (图 4(b)). 进一步使用 AMBER 软件包的轨迹分析工具对平衡过程的二面角  $\lambda$  进行分析, 发现小肽二面角  $\lambda$  值主要在  $120^\circ$  左右 (图 4(c)), 而 6-甲基辛酰基化修饰后, 二面角  $\lambda$  值主要在一  $80^\circ$  附近 (图 4(d)), 正如图 4(b) 所示, 这表明 6-甲基辛酰基结构主要向  $\alpha$  螺旋结构伸展. 为考察 6-甲基辛酰基结构对  $\alpha$  螺旋结构的影响, 我们对平衡过程中  $\alpha$  螺旋各氨基酸的二面角进行分析, 发现 6-甲基辛酰基化修饰后, Leu7 的  $\psi$  二面角变化明显, 其在  $\alpha$  螺旋  $\psi$  二面角标准值  $-47^\circ$  附近出现的频度 (图 4(f)) 明显小于未修饰的小肽结构 (图 4(e)), 说明 6-甲基辛酰基向  $\alpha$  螺旋结构伸展靠拢

后, 部分破坏了小肽的  $\alpha$  螺旋结构, 尤其是 Leu7 附近的结构.

### 2.3 6-甲基辛氨酸通过与肽链氨基酸侧链间的疏水作用破坏小肽的螺旋结构

对酰基化小肽的最小能量结构进行分析, 发现 6-甲基辛氨酸脂肪链向小肽的  $\alpha$  螺旋伸展靠拢, 与 Lys4, Lys5, Leu7 和 Lys8 的侧链形成疏水作用区, Lys5, Leu7 和 Lys8 的 CA 原子被拉向 6-甲基辛氨酸脂肪链的方向 (图 4(e), (f)), 从而破坏了自 Lys5 起到 C 末端的  $\alpha$  螺旋 (图 3(g)–(h)). 再对酰基化小肽动力学模拟轨迹的 4 个聚类代表性结构 (图 3(c)–(f)) 及相对于第一个肽酰基平面的碳原子的二面角  $\lambda$  (图 4(b), (d)) 进行分析, 均发现 6-甲基辛氨酸脂肪链主要向小肽的  $\alpha$  螺旋结构伸展靠拢, 并可与 Lys3, Lys4, Phe6 和 Leu7 的侧链形成疏水作用, 从而部分破坏了小肽 C 末端的  $\alpha$  螺旋.

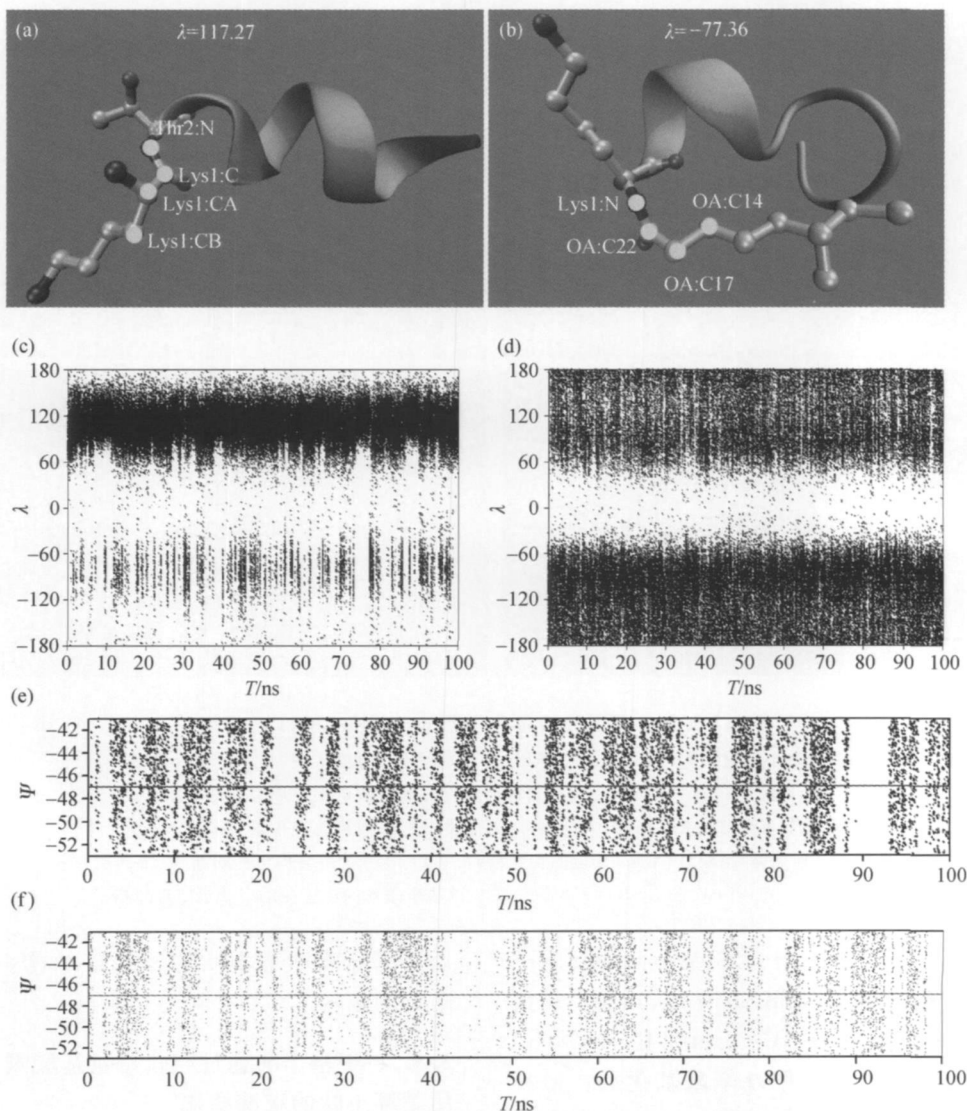


图4 分子动力学模拟过程中的二面角变化

(a) 小肽能量最小结构中相对于第一个肽酰基平面的碳原子的  $\lambda$  二面角；(b) 酰基化小肽能量最小结构的  $\lambda$  二面角；(c) 小肽  $\lambda$  二面角的散点图；(d) 酰基化小肽  $\lambda$  二面角的散点图；(e) 小肽 Leu7 的  $\psi$  二面角散点图；(f) 酰基化小肽 Leu7 的  $\psi$  二面角散点图

### 3 讨论

生物活性小分子肽具有多种多样的功能，如激素功能<sup>[5]</sup>，神经调质功能<sup>[6]</sup>，抗血栓、抗高血压、降胆固醇和抑制细菌功能<sup>[7]</sup>，免疫调节功能<sup>[8]</sup>，抗病毒功能<sup>[9]</sup>，清除癌细胞功能<sup>[10]</sup>以及抗氧化作用<sup>[11]</sup>等，因此已被广泛应用于药物筛选、疫苗制备和食品添加剂等领域。在生物活性肽的应用中，为保护其活性或者增加其特殊的生物学功能，往往会

尝试引入各种修饰，如磷酸化修饰、糖基化修饰、酰基化修饰或者引入其他功能基团修饰；另外为了标记和定位目标肽段也往往需要尝试引入某种特殊修饰，这就需要了解这些修饰会在多大程度上影响原有小肽的结构以至功能，以及这种影响的机理。以往传统方法大多采用核磁共振等结构测定方法<sup>[12]</sup>，周期长、成本高，而使用分子动力学的方法能够快速准确地得到和核磁共振结构相近的结构<sup>[13]</sup>，本文即采用分子动力学方法，对我们设计的

小肽 KTKKKFLKKT 及其 N 端赖氨酸 6-甲基辛酰基化修饰体的结构进行了模拟分析和比较, 有助于及时了解该酰基化修饰对小肽细胞毒性的影响机理并指导进一步的活性肽修饰设计。

目前生物分子折叠大多使用力场方法模拟<sup>[14]</sup>。我们选择生物分子模拟领域中应用最为广泛的 AMBER 力场及其软件包<sup>[3]</sup>, 以 GB<sup>ONC</sup> 模型对小肽 KTKKKFLKKT 的结构进行全原子从头预测和折叠模拟<sup>[15]</sup>, 成功得到了其最小能量结构。由于 6-甲基辛酰基团不是常规结构, 我们首先使用高斯量化软件计算 6-甲基辛酸的结构, 再使用 AMBER 软件包将 6-甲基辛酸连接到小肽的最低能量结构, 然后进行分子动力学模拟折叠, 成功得到 6-甲基辛酰基化修饰的小肽结构。对修饰前后的结构进行比较分析, 发现小肽可形成以 Lys4-Lys5-Phe6-Leu7 右手  $\alpha$  螺旋为核心的螺旋结构(图 2(b)), 而当该小肽在 N 端进行 6-甲基辛酰基化修饰后, 由于 6-甲基辛酸脂肪链与小肽氨基酸侧链间的疏水作用, 6-甲基辛酸脂肪链向  $\alpha$  螺旋伸展靠拢, 并可将 Lys4, Lys5, Phe6, Leu7 和 Lys8 拉向 6-甲基辛酸脂肪链, 从而破坏了小肽的  $\alpha$  螺旋结构(图 3), 形成很强的疏水作用区, 而该疏水区很可能增强细胞通透性<sup>[16, 17]</sup> 从而增强细胞毒性。将 N 端 6 甲基辛酸改为更短的脂肪酸后, 由于短的脂肪酸长度不够长, 所以不能向  $\alpha$  螺旋伸展并和 Lys4, Lys5, Phe6, Leu7 和 Lys8 特别是 Leu7 形成较强的疏水相互作用, 这样就可以大大降低其细胞毒性。所以在合成该小肽的时候引入长链脂肪酸酰基化修饰就必须考虑长链脂肪酸的合适长度, 既要保持其功能又能降低其细胞毒性。不难看到, 本研究所涉及的方法也可用于对其他小肽的多种修饰进行快速准确的分析评价, 并指导其实验研究和进一步修饰设计。

### 参 考 文 献

- 1 Kneller DG, Cohen FE, Langridge R. Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neural network. *J Mol Biol*, 1990, 214(1): 171-182
- 2 Burke K, Werschick J, Gross EK. Time-dependent density functional theory: Past, present, and future. *J Chem Phys*, 2005, 123(6): 62206
- 3 Case DA, Cheatham TE 3rd, Darden T, et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem*, 2005, 26(16):

- 1668-1688
- 4 Feig M, Karanicolas J, Brooks CL 3rd. MMTSB Tool Set: Enhanced sampling and multiscale modeling methods for applications in structural biology. *J Mol Graph Model*, 2004, 22(5): 377-395
- 5 Lunin SM, Khrenov MO, Novoselova TV, et al. Thymulin, a thymic peptide, prevents the overproduction of pro-inflammatory cytokines and heat shock protein hsp70 in inflammation-bearing mice. *Immunol Invest*, 2008, 37(8): 858-870
- 6 Leng G, Ludwig M. Neurotransmitters and peptides: Whispered secrets and public announcements. *J Physiol*, 2008, 586(8): 5625-5632
- 7 Sang Y, Blecha F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: Alternatives to traditional antibiotics. *Anim Health Res Rev*, 2008, 9(2): 227-235
- 8 Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. *J Alzheimers Dis*, 2008, 15(2): 157-168
- 9 Shuqun C, Mengchao W, Han C, et al. Antiviral therapy using lamivudine and thymosin alpha 1 for hepatocellular carcinoma co-existing with chronic hepatitis B infection. *Hepatogastroenterology*, 2006, 53(68): 249-252
- 10 Iero M, Filipazzi P, Castelli C, et al. Modified peptides in anti-cancer vaccines: Are we eventually improving anti-tumor immunity? *Cancer Immunol Immunother*, 2009; 58(7): 1159-1167
- 11 Mizuguchi Y, Chen J, Seshan SV, et al. A novel cell-permeable antioxidant peptide decreases renal tubular apoptosis and damage in unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(5): 1545-1553
- 12 Walewska A, Skalicky JJ, Davis DR, et al. NMR-based mapping of disulfide bridges in cysteine-rich peptides: Application to the mu-conotoxin Sx IIIA. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(43): 14280-14286
- 13 Kim E, Jang S, Pak Y. Direct folding studies of various alpha and beta strands using replica exchange molecular dynamics simulation. *J Chem Phys*, 2008, 128(17): 175104
- 14 Ponder JW, Case DA. Force fields for protein simulations. *Adv Protein Chem*, 2003, 66: 27-85
- 15 Simmerling C, Strockbine B, Roitberg AE. All-atom structure prediction and folding simulations of a stable protein. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(38): 11258-11259
- 16 Berneche S, Nina M, Roux B. Molecular dynamics simulation of melittin in a dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. *Biophys J*, 1998, 75(4): 1603-1618
- 17 Thomas JL, Barton SW, Tirrell DA. Membrane solubilization by a hydrophobic polyelectrolyte: Surface activity and membrane binding. *Biophys J*, 1994, 67(3): 1101-1106