

Nutlin-3a 对 p53-MDM2 复合物稳定性影响*

周晗¹⁾ 耿轶钊²⁾ 晏世伟^{1)†}

1) (北京师范大学物理学系, 北京 100875)

2) (河北工业大学理学院, 天津 300131)

(2022 年 12 月 26 日收到; 2023 年 1 月 13 日收到修改稿)

p53 蛋白是一种与细胞周期停滞和细胞凋亡有关的蛋白质. 在受到细胞压力或环境扰动后, p53 促进下游多个靶基因的转录, 介导肿瘤抑制. MDM2 是主要的 E3 泛素连接酶, 也是 p53 的负调控因子. MDM2 可促进 p53 的泛素化和核输出, 抑制 p53 的抑癌活性. 因此 MDM2 对 p53 的负调控始终是肿瘤治疗中迫切需要解决的问题. Nutlin-3a 是被证明可以有效抑制 p53-MDM2 相互作用的小分子抑制剂. 本文使用全原子分子动力学模拟, 研究 Nutlin-3a 对 p53-MDM2 复合物的稳定性的影响. 结果表明, 通过引起 p53 和 MDM2 间 Phe19-Gln72 的氢键和 Glu17-Lys94 的盐桥发生的断裂, Nutlin-3a 可以削弱 p53 和 MDM2 间的相互作用. 我们的工作对 Nutlin-3a 小分子抑制剂的作用机制进行了说明, 揭示了抗癌药物 Nutlin-3a 介导的 p53-MDM2 复合物亲和力降低的分子机制, 并为针对 p53 蛋白的有效抗癌治疗提供了理论基础.

关键词: 抗癌药物设计, p53-MDM2 复合物, Nutlin-3a 抑制剂分子, 分子动力学模拟

PACS: 87.19.xj, 87.10.Tf, 87.15.km

DOI: 10.7498/aps.72.20222441

1 引言

p53 蛋白是细胞防御 DNA 损伤的主要“堡垒”, 被称为“基因监护者”^[1-4]. 当正常的基因受到损伤时, p53 的浓度就会增加并与 DNA 结合, 通过 p53 基因调控网络引起细胞周期停滞、细胞修复或细胞凋亡^[3,5]. 然而, p53 的抑癌功能在大多数人类肿瘤中被削弱. 因此, 恢复 p53 的抑癌功能的抗癌药物设计是一种有重要前景的肿瘤治疗策略^[6-8].

在约 50% 的人类肿瘤中, 出现了编码 p53 的基因 Trp53 突变或缺失, 从而使 p53 失活^[2,9]. 在其余肿瘤中, 尽管 p53 保持其野生型, 但它的浓度受 MDM2 负反馈的调控, 过表达的 MDM2 蛋白阻止细胞中 p53 浓度升高而使细胞周期停滞^[10-12], 严重地抑制了细胞中 p53 的活性, 导致了较差的临床预后^[13,14]. MDM2 通过三种方式^[15]抑制 p53 的转

录活性以及在细胞中的浓度: MDM2 通过与 p53 的反转录激活域结合, 破坏 p53 的转录活性; MDM2 作为一种泛素连接酶, 促进 p53 蛋白的降解, 降低 p53 蛋白在细胞内的浓度; MDM2 参与 p53 由细胞核内向细胞核外的输运^[7].

针对 p53-MDM2 的这种负反馈机制, 目前的治疗策略主要分为以下几种, 首先是设计与 p53 结合以抑制 p53-MDM2 相互作用的化合物, RITA^[16]是目前发现可以实现这一功能的小分子, 但在体外实验中效果并不显著^[17]. 其次是促进 MDM2 蛋白的降解, 但是由于 p53 水平的提高, 会诱导 MDM2 水平的提高, 因此需要一种持续的给药才能使 MDM2 持续地降解. 最后也是最有效的方法是设计与 MDM2 结合以抑制 p53-MDM2 相互作用的化合物^[18], 这是在保留野生型 p53 的癌细胞中激活 p53 抑癌功能的一种非常有吸引力的策略. 近年来, 这一领域的研究取得了显著进展, 并确定了一些

* 国家自然科学基金 (批准号: 11735005, 11790325) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: yansw@bnu.edu.cn

临床候选抑制剂分子^[19]. 然而这种小分子抑制剂只对野生型 p53 起作用, 对突变型 p53 没有作用, 而且存在着各种各样的特异性和生物毒性^[20,21].

第一个已知的 p53-MDM2 相互作用的抑制剂是 Vassilev 等^[7]报道的小分子——Nutlins, 是与 MDM2 的 p53 结合位点结合的顺式咪唑啉支架的类似物. 这些小蛋白本质上模仿 p53 肽的螺旋主干, 阻塞 MDM2 的结合口袋, 这个口袋通常被 p53 蛋白的 Phe19, Trp23 和 Leu26 残基占据^[22]. 在 Nutlin 系列中最值得注意的是 Nutlin-3a, 它与 MDM2 结合, 半抑制浓度为 90 nmol/L, 并激活癌细胞中的野生型 p53^[7]. Nutlin-3a 的其他临床前研究已经证实其在白血病和其他带有野生型 p53 的癌症类型中的活性^[23,24].

在前期的工作中我们已经分析了 Nutlin-3a 与 p53 的竞争机制^[25,26], 在 Nutlin-3a 小分子与 p53 蛋白处于距离 MDM2 蛋白同等位置的时候, Nutlin-3a 会更快地结合到 MDM2 的结合口袋上. 然而, 我们前期的工作^[25]只探讨了 Nutlin-3a 小分子对于游离的 MDM2 和 p53 的作用, 对于已经稳定结合的 p53-MDM2 复合物的作用尚不明确. 此时, 药物小分子如何竞争性地分离 p53 和 MDM2 之间的结合, 依然是一个未解的问题. 这对药物的有效性和多效性研究是非常重要的. 本文以此作为切入点, 探究 Nutlin-3a 小分子对 p53-MDM2 复合物稳定性的影响, 这将为 Nutlin-3a 小分子治疗癌症的分子机制提供更深层次的理解, 也对新药的研究设计提供参考.

2 模拟与计算方法

分子动力学模拟采用 NAMD 2.14 软件来完成^[27], p53-MDM2 复合物和 Nutlin-3a 小分子的结构来自蛋白质数据库 (PDB ID:1YCR, 4HG7). 使用可视化软件 VMD 进行体系的建模和结果分析. 分子动力学模拟采用全原子 CHARMM27 力场进行计算, 使用 SwissParam 建立 Nutlin-3a 的力场用来描述药物小分子.

计算中手动将 Nutlin-3a 小分子分别平移至 p53-MDM2 复合物附近, 靠近 MDM2 结合口袋的位置. 体系溶剂化遵循边界原子向外延伸 15 Å 的原则, 形成一个立方体水盒子. 向溶剂中添加 0.15 mol/L 的 Na⁺和 Cl⁻, 使体系达到电中性. 为了防止蛋白质溢出水盒子和节省计算时间, 固定

MDM2 的三个主链碳原子, 分别为 Thr101, Ile103, Arg105 残基的 C α 原子, 这三个残基的位置远离 MDM2 的结合口袋, 所以不会对 p53 的结合造成影响.

为了分析在体内生理环境下, Nutlin-3a 的引入对 p53-MDM2 复合物稳定性的影响, 模拟温度设置为 310 K, 并使用 Langevin 控温法维持系统的恒温. 压强设置为 1 个标准大气压, 模拟的时间步长为 2 fs, 每 2 ps 输出一次坐标. 范德瓦耳斯相互作用和静电相互作用分别设定了截断值, 截断值的大小为 14 Å, 这之前的 2 Å 给予转换函数 (switching function) 用于平滑过渡. 动力学模拟前先用共轭梯度法进行能量最小化 50000 步, 寻找能量最低的构象, 并作为分子动力学模拟的初始状态, 分子动力学模拟时长为 50 ns.

本工作进行了两组模拟. 第一组: p53-MDM2 复合物的无药物体系, 独立模拟共 5 次; 第二组: 在 MDM2 的结合口袋附近随机放置 4 个 Nutlin-3a 小分子, 如图 1 所示. 为了消除 Nutlin-3a 小分子放置位置的影响, 在有药物的模拟中, 对 Nutlin-3a 小分子位置不同的两个体系各做 5 次的模拟. 4 个 Nutlin-3a 小分子与 MDM2 的平均质心距离为 18 Å. 这个距离的选择是为了保证 Nutlin-3a 接近 MDM2 结合口袋, 既能缩短模拟时间, 又不会与 MDM2-p53 复合物分子发生重合和碰撞.

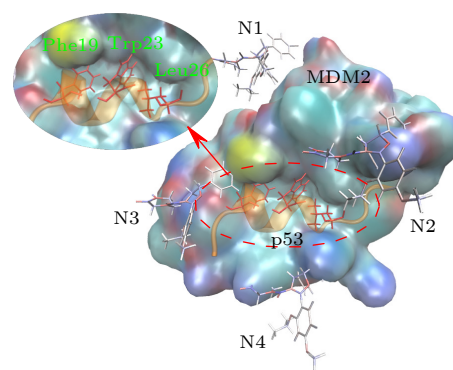


图 1 p53-MDM2 复合物与 4 个 Nutlin-3a 的初始构象. MDM2 用彩色表面表示; p53 用橙色螺旋表示; 4 个 Nutlin-3a 小分子由棒状结构给出 (N1—N4), p53 的 3 个残基 Phe19, Trp23 和 Leu26 插入到 MDM2 的疏水腔内, 用红色棒状结构表示

Fig. 1. Initial structure of p53-MDM2 complex with four Nutlin-3a. Colored surface shows MDM2; p53 helix is colored in orange. The small molecule shown by the stick is Nutlin-3a. Three amino acids (Phe19, Trp23 and Leu26) of p53 colored in red insert into the hydrophobic cavity of MDM2.

3 结果与讨论

3.1 Nutlin-3a 影响了 p53 和 MDM2 的结合构象

首先, 通过计算每个体系 (有药物和无药物) 在动力学模拟中相对于其初始构象的均方根偏差 (RMSD), 探索了 Nutlin-3a 对 p53-MDM2 复合物结构稳定性的影响. RMSD 是衡量动力学模拟中的任意时刻构象与参考构象的平均偏差, 这个值是各原子 RMSD 的平均值. 计算公式如下:

$$\text{RMSD}_\alpha(t_j) = \sqrt{\frac{\sum_{\alpha=1}^{N_\alpha} [\mathbf{r}_\alpha(t_j) - \mathbf{r}_\alpha(0)]^2}{N_\alpha}}, \quad (1)$$

这里, N_α 是参与比较的原子数目, $\mathbf{r}_\alpha(t_j)$ 是原子 α 在 t_j 时刻的位置, $\mathbf{r}_\alpha(0)$ 是原子 α 的初始位置. 利用蛋白质主链原子的均方根偏差值来评估有无药物时蛋白结构的稳定性. 若曲线可以稳定在一个值附近, 表示在这段时间内系统可以达到稳定.

由于 MDM2 的三个主链碳原子已经被固定, 所以本文选择计算 p53 蛋白主链碳原子的 RMSD, 分析动力学系统的稳定性. 如图 2(a)—(c) 所示, RMSD 曲线都趋于稳定. 无药物的 5 次模拟中, p53 蛋白主链碳原子的 RMSD 的平均值为 2.9565 Å, 而有药物的模拟中, p53 蛋白主链碳原子的 RMSD 的平均值为 3.3368 Å.

比较这两组构象的 15 次模拟轨迹中 p53 和 MDM2 的质心距离变化情况. 如图 2(d)—(f) 所示, 在多组有药物的体系中, p53 和 MDM2 的质心距离明显增加. 无药物体系中, p53 和 MDM2 的质心距离稳定在 11.83—12.11 Å 之间, 而有药物的体系中 p53 和 MDM2 的质心距离稳定在 11.96—13.08 Å 和 11.77—13.13 Å 之间. 这表明 Nutlin-3a 会导致 p53 和 MDM2 的质心距离的增加.

回转半径 (R_g) 的计算通常是为了评估特定生物分子中原子从其共同的重心或轴上的总分散度, 15 个体系的 p53-MDM2 复合物的 R_g 分布的最可几值如图 3 所示, 无药物体系的回转半径最可几值范围为 13.101—13.190 Å, 而有药物的 10 次模拟中回转半径的最可几值有 6 次大于 13.190 Å, 这说明有超过一半的概率 p53-MDM2 复合物的回转半径会增大, p53-MDM2 复合物会有轻微的膨胀. 从有无药物体系的 p53-MDM2 复合物结构在四个

不同时间点的代表性快照 (图 2(g)) 可以看出, p53 的结合构象发生了明显的变化. 与无药物的体系中的 p53 结合构象相比, 有药物体系中的 p53 在结合平面上顺时针旋转了一定角度. 这些数据表明, 有药物存在时, p53 蛋白的结构稳定性明显降低.

3.2 Nutlin-3a 能够降低 p53-MDM2 的结合自由能

复合物的结合能大小能反映蛋白和配体的结合稳定性, 对于两种结合的蛋白, 结合能越大说明其结合越牢固, 蛋白间的亲和力越强.

p53-MDM2 的结合能的计算使用 MolAICal 软件^[28]. MolAICal 是一种结合了人工智能和经典编程的药物设计软件, 可以用来计算蛋白和配体间的结合自由能. 这里采用分子力学/广义玻恩表面积 (molecular mechanics/generalized Born surface area, MM/GBSA) 算法计算 p53 和 MDM2 之间的结合自由能. 结合能的计算思路是计算两个溶剂化分子在结合 (G_{complex}) 和游离 ($G_{\text{receptor}}, G_{\text{ligand}}$) 状态的结合自由能之差, 即

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{receptor}} + G_{\text{ligand}}). \quad (2)$$

通过基于 MD 模拟的 MM/GBSA 计算, 可以揭示受体与配体之间的动态相互作用机制. 根据 MM/GBSA 算法, ΔG_{bind} 可以分解为

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S, \quad (3)$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{internal}} + \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdw}}, \quad (4)$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{SA}} + \Delta G_{\text{GB}}, \quad (5)$$

其中, ΔH 为焓变; ΔE_{MM} 为真空中的结合自由能; $\Delta E_{\text{internal}}$ 包含了键、键角和二面角能量; ΔE_{vdw} 为非键范德瓦耳斯能量; ΔE_{ele} 为非键静电能量. ΔG_{sol} 是溶剂化自由能, 它是非静电溶剂化分量 ΔG_{SA} 和静电溶剂化能 ΔG_{GB} 的和; $T\Delta S$ 为熵贡献, 可以采用简正模分析得到, 但实际计算中, 通常忽略熵的贡献, 因为采用 MM/GBSA 方案计算的体系通常为受体-配体结合前后构象变化不大的, 熵的贡献可以在计算差值时抵消掉.

从 RMSD 曲线 (图 2(a)—(c)) 可以发现, 10—50 ns 模拟比较稳定. 我们从分子动力学模拟结果的最后 40 ns 轨迹中提取 400 帧用于计算束缚自由能, 分别提取出 p53, MDM2 和 p53-MDM2 复合物的轨迹, 并利用 MolAICal 软件计算 p53 和

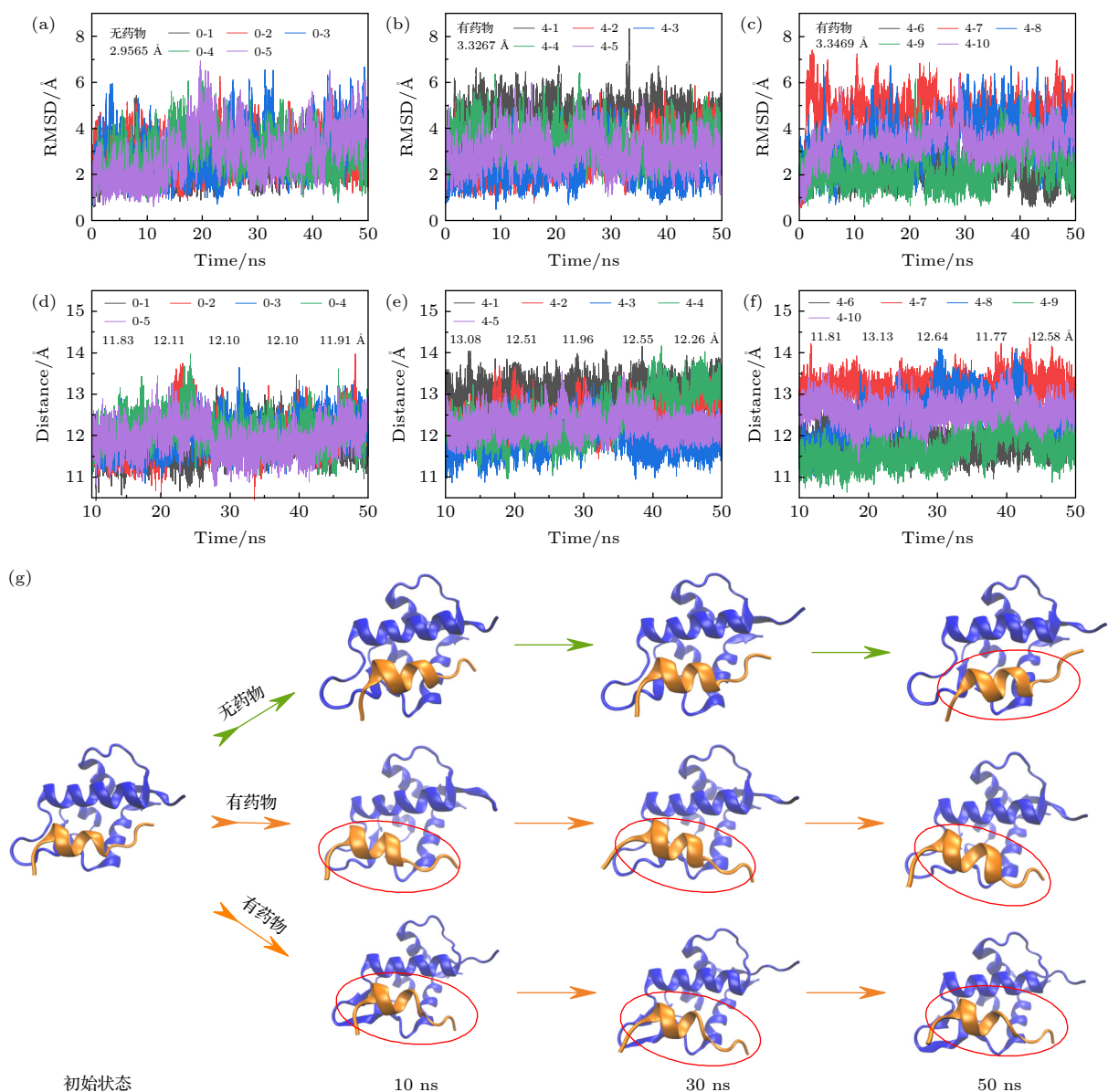


图 2 Nutlin-3a 导致的 p53-MDM2 复合物构象变化. p53 主链碳原子在 (a) 无药物体系和 (b), (c) 有药物体系中相对于初始构象的 RMSD 演化. 0-1 表示无药物体系的第一次模拟, 4-1 表示有 4 个药物体系的第一次模拟, 以此类推. p53 和 MDM2 的质心距离在 (d) 无药物体系和 (e), (f) 有药物体系中随着时间的演化, 每次模拟的距离平均值在图中给出. (g) 无药物体系 (上) 和有药物体系 (中, 下) 在 4 个不同模拟时间点的快照, p53 用橙色螺旋表示, MDM2 用蓝色表示. 这些数据表明, Nutlin-3a 影响了 p53 和 MDM2 的结合构象

Fig. 2. Characterization of Nutlin-3a-induced structural changes of the MDM2-p53 complex. Time evolution of RMSD of p53 main-chain carbon atoms in (a) drug-free and (b), (c) drug-enabled system, the average RMSD of the five simulations is given in the figure. 0-1 represents the first simulation of a drug-free system, 4-1 represents the first simulation of a four-drug system, and so on. Time evolution of centroid distance between p53 and MDM2 in (d) drug-free system and (e), (f) drug-enabled system. The average distance of each simulation is given in the figure. (g) Representative snapshots of drug-free systems (top) and drug-enabled systems (middle, bottom) at four different simulation time points. p53 is represented by orange helix and MDM2 is represented by blue. These data reveal that Nutlin-3a affects the binding conformation of p53 and MDM2.

MDM2 之间的结合自由能. 表 1 列出了 15 次模拟的结合能计算结果. 可以明显地发现: 无药物的 5 次模拟, 结合自由能较为稳定, 5 次模拟的结合能平均值为 -45.94022 kcal/mol; 而在有药物的体系中, 结合能出现了不同程度的降低. 在 10 次有

药物的模拟中, 有 5 次的结合能低于无药物结合能的最小值. 其中, 两次模拟的结合能最小值分别降低到 -37.5379 和 -34.5264 kcal/mol, 这相当于减小了 1—2 个氢键的能量. 这表明当有多个 Nutlin-3a 在 MDM2 结合口袋附近时, Nutlin-3a 会削弱 p53-

MDM2 之间的相互作用, 使 p53-MDM2 的结合能减小, 降低复合物的稳定性.

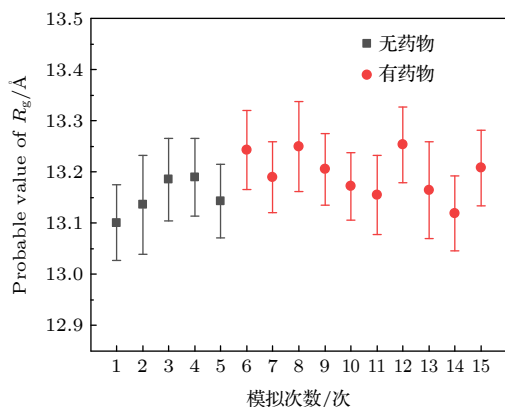


图 3 有无药物时 MDM2-p53 复合物的回转半径分析

Fig. 3. Radius of gyration (R_g) analysis of the MDM2-p53 complex with and without drugs.

表 1 p53-MDM2 的结合自由能 (kcal/mol)

Table 1. Binding free energy of the p53-MDM2 complex.

结合自由能/(kcal · mol ⁻¹)		
无药物(5次模拟)	有药物(10次模拟)	
-47.0654	-44.92	-42.7475
-44.3723	-37.5379	-45.1035
-45.3874	-44.4957	-43.392
-45.0711	-48.7658	-45.6778
-47.8049	-41.1574	-34.5264

3.3 Nutlin-3a 导致 p53 和 MDM2 间的一条氢键和盐桥断裂

最近的一项研究发现, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (SARS-CoV-2) 的三种突变体 [29]——N439K, S477N 和 T478K 在与血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 结合时, 复合物的稳定性提高, 亲和力增强, 分析结果显示这种增强的原因是突变体复合物会产生额外的 2—3 个氢键. 且有研究显示建立额外的键, 包括盐桥和氢键, 有助于产生更高的结合力和更强的传染性 [30,31]. 这表明氢键和盐桥的断裂和形成对复合物蛋白间的亲和力以及蛋白的功能都有很大的影响.

我们知道 MDM2 蛋白和 p53 蛋白间的相互作用关系是靠疏水相互作用和两者之间的三个氢键、一个盐桥来维持的 [32]. p53 的三个残基能够深深地插入 MDM2 的疏水口袋, 在这个口袋中, MDM2 的 Gln72, Leu54 和 Val93 分别与 p53 的 Phe19, Trp23, Leu26 形成三个氢键, MDM2 的 Lys94 与

p53 的 Glu17 形成盐桥. 这三个氢键和一个盐桥有助于 p53-MDM2 复合物的稳定, 其中 p53 的 Trp23 与 MDM2 的 Leu54 之间形成的氢键是非常稳定的, p53 的 Leu26 与 MDM2 的 Val93 之间形成的氢键是最不稳定的.

通过 VMD 软件中的 Hydrogen Bonds 插件, 分别计算了这三对残基间形成氢键的情况. 当供体原子 D 与受体原子 A 之间的距离小于 3.5 Å, 并且 D-H-A 的角度小于 41° 时, 认为结合氢的原子 (D) 和另一个原子 (A) 之间形成氢键. 从分析结果来看, 与无药物体系相比, 有 Nutlin-3a 的体系中 p53 的 Trp23 与 MDM2 的 Leu54 之间形成的氢键依旧保持稳定, p53 的 Leu26 与 MDM2 的 Val93 之间形成的氢键依旧不稳定, 而 p53 的 Phe19 与 MDM2 的 Gln72 间的氢键形成的概率大幅度减小. 如表 2 所列, 与无药物体系相比, 有药物体系中有 4 次模拟的氢键形成概率明显下降, 分别下降到 5.77%, 6.11%, 21.72%, 10.77%, 这条氢键被有效地破坏. 如图 4 所示, 这个氢键的供体和受体分别来自 MDM2 的 Gln72-OE1 和 p53 的 Phe19-N. 我们发现, 氢键形成概率下降明显的这 4 次模拟正对应着 p53 构象顺时针旋转变化的 4 次模拟, 说明正是由于 p53 的这种构象变化, 导致此氢键的断裂.

表 2 Phe19-Gln72 间的氢键形成概率

Table 2. Probability of hydrogen bond formation between Phe19-Gln72.

氢键形成概率/%		
无药物(5次模拟)	有药物(10次模拟)	
50.08	5.77	60.86
50.08	6.11	21.72
35.10	48.02	67.94
50.91	66.64	43.51
41.60	35.25	10.77

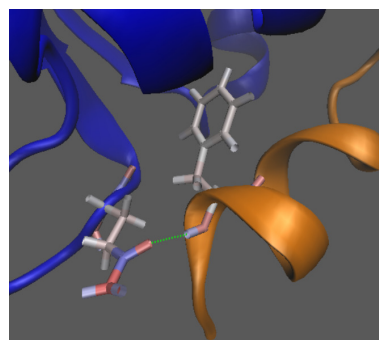


图 4 MDM2-Gln72-OE1 和 p53-Phe19-N 的原子间氢键

Fig. 4. Hydrogen bond between the atoms of MDM2-Gln72-OE1 and p53-Phe19-N.

本文还计算了 MDM2-Gln72-OE1 以及 p53-Phe19-N 原子的间距在模拟中的变化情况. 结果如图 5 所示, 无药物体系中原子间距非常稳定, 最可几值都在 2.96 Å 附近, 而在有药物体系, 这两个原子间距则有不同程度的增加. 其中, 氢键形成概率减少的这 4 组模拟中的原子间距增大最为明显, 有药物的 4 次模拟中两个原子距离的最可几值分别增加到 3.42, 3.42, 3.04 和 3.22 Å, 氢键供体和受体距离的增大, 会直接影响氢键的稳定性. 因此, 从分子机制的讨论表明, Nutlin-3a 削弱 p53-MDM2 之间的相互作用的主要原因在于, p53 的 Phe19 与 MDM2 的 Gln72 间的氢键断裂, 而断裂的原因是 p53 的结合构象发生了变化, MDM2 的 Gln72-OE1 和 p53 的 Phe19-N 作为氢键的受体和供体距离增加, 导致了氢键的断裂.

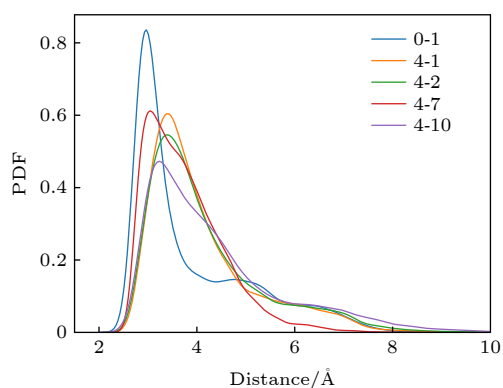


图 5 MDM2-Gln72-OE1 和 p53-Phe19-N 的原子间距概率密度分布

Fig. 5. Probability density function of distance between MDM2-Gln72-OE1 and p53-Phe19-N.

通过 VMD 软件中的 Salt Bridge 插件, 计算了 MDM2 的 Lys94 与 p53 的 Glu17 间盐桥的稳定情况, 当来自残基 Arg/Lys 的带正电荷的 NH_2^+ 或 NH_3^+ 侧链与来自残基 Glu/Asp 的带负电荷的 COO^- 侧链原子之间的最小距离小于 4 Å 时, 认为形成盐桥, 一般认为持续度大于 20% 的盐桥是稳定盐桥.

如表 3 所列, 在无药物体系中, 4 次的盐桥持续度都大于 20%, 说明在无药物体系中, 此盐桥是稳定的. 而在有药物的体系中, 有 4 次模拟的盐桥持续度降低到 0%, 2.81%, 5.03% 和 0%, Lys94 与 Glu17 间盐桥的稳定性大幅度降低, 甚至消失. 与此同时, 我们发现这 4 次模拟正对应于氢键断裂的 4 次模拟, 这表明 p53 的构象变化不但导致

Gln72 与 Phe19 间氢键的断裂, 也直接降低了 Lys94 与 Glu17 间盐桥的稳定性.

表 3 Lys94-Glu17 间盐桥的形成概率

Table 3. The probability of salt bridge formation between Lys94-Glu17.

盐桥形成概率/%		
无药物(5次模拟)	有药物(10次模拟)	
37.77	0	42.21
33.62	2.81	5.03
26.90	21.22	20.43
50.32	77.16	10.8
19.07	35.25	0

最后, 需要指出, 由于计算资源的限制, 在上述动力学计算中, 仅对每个体系做了 50 ns 的模拟. 为了分析长时间模拟结果的一致性, 我们对有无药物的情况下, 各选择了一个体系进行了 200 ns 的模拟. 结果表明, 200 ns 的模拟结果与上述 50 ns 结果所得结论一致.

4 结 论

本文利用分子动力学模拟计算的方法, 在原子水平上分析了 Nutlin-3a 对 p53-MDM2 复合物稳定性的影响. 通过对 Nutlin-3a 与蛋白复合物结合的动力学过程分析、构象变化分析、成键分析和结合自由能计算发现, 在体内生理环境下, Nutlin-3a 的引入, 能够弱化 p53 和 MDM2 之间的相互作用, 降低 p53-MDM2 复合物的稳定性. 从分子生物学角度来看, MDM2 对 p53 蛋白的调控强烈而敏感地依赖于负反馈回路中 p53-MDM2 之间非线性相互作用的强度 [11,12,33]. 由于 Nutlin-3a 减弱了这种相互作用, 从而使得 p53 能够达到较高的浓度, 发挥其抑癌功能. 本文揭示了抗癌药物 Nutlin-3a 介导的 p53-MDM2 复合物失稳的分子机制, 为设计 p53-MDM2 相互作用抑制剂提供了重要参考.

感谢北京师范大学高性能计算中心对本工作数值计算的支持.

参考文献

- [1] Levine A J 1997 *Cell* **88** 323
- [2] Vogelstein B, Lane D, Levine A J 2000 *Nature* **408** 307
- [3] Vousden K H, Lu X 2002 *Nat. Rev. Cancer* **2** 594

- [4] Fridman J S, Lowe S W 2003 *Oncogene* **22** 9030
- [5] Chen J 2016 *CSH Perspect. Med.* **6** a026104
- [6] Chène P 2003 *Nat. Rev. Cancer* **3** 102
- [7] Vassilev L T, Vu B T, Graves B, et al. 2004 *Science* **303** 844
- [8] Wiman K 2006 *Cell Death Differ.* **13** 921
- [9] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C C 1991 *Science* **253** 49
- [10] Batchelor E, Loewer A, Lahav G 2009 *Nat. Rev. Cancer* **9** 371
- [11] Yan S, Zhuo Y 2006 *Physica D* **220** 157
- [12] Zhang L J, Yan S W, Zhuo Y Z 2007 *Acta Phys. Sin.* **56** 2442 (in Chinese) [张丽娟, 晏世伟, 卓益忠 2007 物理学报 **56** 2442]
- [13] Bond G L, Hu W, Bond E E, et al. 2004 *Cell* **119** 591
- [14] Rayburn E, Zhang R, He J, Wang H 2005 *Curr. Drug Targets* **5** 27
- [15] Michael D, Oren M 2003 *Semin. Cancer Biol.* **13** 49
- [16] Gudkov A V 2004 *Nat. Med.* **10** 1298
- [17] Grinkevich V, Issaeva N, Hossain S, Pramanik A, Selivanova G 2005 *Nat. Med.* **11** 1136
- [18] Anifowose A, Agbowuro A A, Yang X, Wang B 2020 *Med. Chem. Res.* **29** 1105
- [19] Zhu H, Gao H, Ji Y, Zhou Q, Du Z, Tian L, Jiang Y, Yao K, Zhou Z 2022 *J. Hematol. Oncol.* **15** 1
- [20] Wang S, Zhao Y, Aguilar A, Bernard D, Yang C Y 2017 *CSH Perspect. Med.* **7** a026245
- [21] Nayak S K, Khatik G L, Narang R, Monga V, Chopra H K 2018 *Curr. Drug Targets* **18** 749
- [22] Kussie P H, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine A J, Pavletich N P 1996 *Science* **274** 948
- [23] Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al. 2006 *PNAS* **103** 1888
- [24] Kojima K, Konopleva M, Samudio I J, et al. 2005 *Blood* **106** 3150
- [25] Liu S X, Yan S W 2017 *Chin. Phys. Lett.* **34** 118701
- [26] Liu S X, Geng Y Z, Yan S W 2017 *Front. Phys.* **12** 1
- [27] Phillips J C, Hardy D J, Maia J D, Stone J E, Ribeiro J V, Bernardi R C, Buch R, Fiorin G, Hénin J, Jiang W, et al. 2020 *J. Chem. Phys.* **153** 044130
- [28] Bai Q, Tan S, Xu T, Liu H, Huang J, Yao X 2021 *Brief. Bioinform.* **2** 2
- [29] Suleman M, Yousafi Q, Ali J, et al. 2021 *Comput. Biol. Med.* **138** 104936
- [30] Khan A, Zia T, Suleman M, Khan T, Ali S S, Abbasi A A, Mohammad A, Wei D Q 2021 *J. Cell. Physiol.* **236** 7045
- [31] Khan A, Wei D Q, Kousar K, et al. 2021 *Chembiochem* **22** 2641
- [32] Das P, Mattaparthi V S K 2020 *ACS Omega* **5** 8449
- [33] Lev Bar-Or R, Maya R, Segel L A, Alon U, Levine A J, Oren M 2000 *PNAS* **97** 11250

Effect of Nutlin-3a on stability of p53-MDM2 complex*

Zhou Han¹⁾ Geng Yi-Zhao²⁾ Yan Shi-Wei^{1)†}¹⁾ (*Department of Physics, Beijing Normal University, Beijing 100875, China*)²⁾ (*School of Science, Hebei University of Technology, Tianjin 300131, China*)

(Received 26 December 2022; revised manuscript received 13 January 2023)

Abstract

P53 is well recognized to be a tumor suppressor protein. In response to the external stress or environmental perturbation, p53 can promote the transcription of various target genes downstream, thus regulating the cell cycle, apoptosis, DNA repair, and angiogenesis. However, the activation of p53 is further activated by another protein, MDM2, which negatively regulates the level of p53 inverse and thus reduces the activation of p53. This phenomenon is a novel potential and promising strategy for cancer therapy, i.e. restoring the activity of p53 pathway through the competitive inhibitors that can occupy the p53-binding site of MDM2 and thus inhibit the interaction between p53 and MDM2.

Recently, various kinds of the inhibitors have been designed for this purpose. The Nutlin family is a group of well investigated inhibitors, which shows high efficiency for tumor suppression. Nutlin-3a mimics the MDM2-binding site of p53 essentially, and blocks the binding of MDM2 to p53. Once getting free from MDM2, p53 rapidly accumulates in the nuclei of cancer cells, the p53 target genes and the p53 pathway are activated, thereby resulting in cell-cycle arrest and apoptosis. In our previous papers, we investigated the competition mechanism between Nutlin3 and p53 *in vitro* by using molecular dynamics simulations. We found that Nutlin3 can bind faster than p53 to prevent p53 from binding to MDM2 when Nutlin-3a and p53 have equal distance from MDM2. Nutlin-3a can also bind to the p53-MDM2 complex to disturb and weaken the interactions between p53 and MDM2. However, the underlying mechanisms of p53-MDM2 complex instability *in vivo* are still unclear. And these inhibitors also have a variety of specificities and biological toxicities *in vivo* environment.

In this study, we go a further step to investigate the effect of Nutlin-3a on the stability of p53-MDM2 complex in physiological environment with the aid of the molecular mechanics/generalized borne surface area (MM/GBSA) method. In our simulations, a group of Nutlin-3a molecules are randomly put around the p53 binding pocket of MDM2 in the initial stages to examine the dynamics among p53, MDM2 and the group of Nutlin-3a molecules and to analyze the underlying competition mechanism between Nutlin3 and p53 binding to pocket of MDM2.

We find that Nutlin-3a can induce the centroid distance between p53 and MDM2 to increase. Importantly, we show that Nutlin-3a weakens the binding affinity of p53-MDM2 complex. Consistently, Nutlin-3a breaks a hydrogen bond between Phe19-Gln72 and a salt bridge between Glu17-Lys94, which weakens the interactions between p53 and MDM2. From the systematic biology point of view, the regulation of p53 by MDM2 is extremely sensitive to the strength of the p53-MDM2 interaction. The avianization of the interactions between p53 and MDM2 by Nutlin-3a can promote p53 to restore its suppression functions on tumor development.

This study may be helpful in understanding the molecular mechanisms of p53-MDM2 complex instability mediated by Nutlin-3a and also in searching for the effective inhibitors of p53-MDM2 interaction.

Keywords: cancer drug design, p53-MDM2 complex, Nutlin-3a inhibitor molecule, molecular dynamics simulation

PACS: 87.19.xj, 87.10.Tf, 87.15.km**DOI:** 10.7498/aps.72.20222441

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11735005, 11790325).

† Corresponding author. E-mail: yansw@bnu.edu.cn



Nutlin-3a对p53-MDM2复合物稳定性影响

周晗 耿轶钊 晏世伟

Effect of Nutlin-3a on stability of p53-MDM2 complex

Zhou Han Geng Yi-Zhao Yan Shi-Wei

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 72, 068702 (2023) DOI: 10.7498/aps.72.20222441

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.72.20222441>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

Mdm2介导的正反馈环对p53基因网络振荡行为的影响

Influence of Mdm2-mediated positive feedback loop on the oscillation behavior of p53 gene network

物理学报. 2021, 70(13): 138701 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210015>

基于分子动力学模拟的石墨烯镁基复合材料力学行为

Mechanical behavior of graphene magnesium matrix composites based on molecular dynamics simulation

物理学报. 2022, 71(8): 086201 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211753>

$U_{1-x}Th_xO_2$ 混合燃料力学性能的分子动力学模拟

Effects of Th doping on mechanical properties of $U_{1-x}Th_xO_2$: An atomistic simulation

物理学报. 2021, 70(12): 122801 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20202239>

氮掺杂对石墨烯摩擦学特性影响的分子动力学模拟

Effect of N-doping on tribological properties of graphene by molecular dynamics simulation

物理学报. 2022, 71(14): 146801 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20212309>

高温下钙蒙脱石膨胀特性的分子动力学模拟

Molecular dynamics simulation of swelling properties of Ca-montmorillonite at high temperatures

物理学报. 2022, 71(4): 043102 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211565>

退火温度调控多层折叠石墨烯力学性能的分子动力学模拟

Manipulations on mechanical properties of multilayer folded graphene by annealing temperature: a molecular dynamics simulation study

物理学报. 2020, 69(19): 196102 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200836>