

Conformation Transformation of A β 42 Protein under Different Temperature by Molecular Dynamics Simulations*

Jing Fu^{1,2}, Liling Zhao^{1,3}, Jihua Wang^{1,3#}

¹Shandong Provincial Key Laboratory of Functional Macromolecular Biophysics, Dezhou University, Dezhou

²College of Physics and Electronics, Shandong Normal University, Jinan

³Department of Physics, Dezhou University, Dezhou

Email: fujing0203@126.com, zhaoll@sina.com, #jihuwang169@gmail.com

Received: Nov. 21st, 2012; revised: Dec. 18th, 2012; accepted: Dec. 27th, 2012

Abstract: The temperature-induced conformation changes of A β 42 protein were studied by molecular dynamics simulation. The three independent molecular dynamics simulations of A β 42 protein at different temperatures 300 K, 340 K and 380 K, were performed using the GROMACS software package and GROMOS 43A1 force field, respectively. Each simulation was run for 60 ns. Based on the simulations, we analyzed the conformation changes of A β 42 protein and the formation of its secondary structure and tertiary structure. The results indicated that A β 42 protein has no stable structure and it has the characters of intrinsically disorder proteins at the different temperatures. It also shows that the structure of A β 42 protein change obviously with different temperature. In addition, there is a change tendency from α -helix to β -sheet at 380 K.

Keywords: A β 42 Protein; Molecular Dynamics Simulation; Alzheimer's Disease; Conformation Transformation

基于分子动力学模拟研究温度致 A β 42 蛋白构象变化*

付 静^{1,2}, 赵立岭^{1,3}, 王吉华^{1,3#}

¹德州学院山东省功能大分子生物物理重点实验室, 德州

²山东师范大学物理与电子科学学院, 济南

³德州学院物理系, 德州

Email: fujing0203@126.com, zhaoll@sina.com, #jihuwang169@gmail.com

收稿日期: 2012 年 11 月 21 日; 修回日期: 2012 年 12 月 18 日; 录用日期: 2012 年 12 月 27 日

摘 要: 基于分子动力学模拟方法研究了不同温度对 A β 42 蛋白结构的影响。模拟选用 GROMACS 软件包和 GROMOS 43A1 分子力场, 在 300 K、340 K 和 380 K 下分别进行 60 ns 的分子动力学模拟。通过计算原子均方根涨落、回旋半径、二级结构形成几率等参数, 分析了 A β 42 蛋白结构的稳定性、二级结构及三级结构形成。研究发现: 该蛋白在三种不同温度下, 都没有稳定结构, 表现出固有无序特征, 温度会导致结构特征发生显著变化; 在高温(380 K)时, 会产生 α 螺旋向 β 折叠转换的趋势。

关键词: A β 42 蛋白; 分子动力学模拟; 阿尔兹海默症; 构象转变

1. 引言

阿尔兹海默症(Alzheimer's Disease, AD)是一种渐进性大脑退行性疾病, 是当今威胁老年人身心健

康的三大疾病(癌症、心血管病和 AD)之一。其发病率是随年龄增长而显著升高的, 65~80 岁人群约为 1%~5%, 80 岁以上者可达 20%~40%^[1]。因此, 对于 AD 发病机理和防治的研究近年来成为国内外关注的热点。

*基金项目: 国家自然科学基金项目(30970561 和 31000324)和山东省自然科学基金项目(2009ZRA14028)。

#通讯作者。

主流观点认为, AD 病与淀粉样不溶性纤维的形成密切相关^[2], 其微观结构是 β -淀粉样蛋白形成的反平行 β 片组成。 β -淀粉样蛋白(A β)是一种含有 39~43 个氨基酸的多肽, 是淀粉样蛋白前体蛋白跨膜分泌 APP 的产物^[3]。其中, 具有 40 和 42 个氨基酸的肽段被广泛研究, 这是因为 A β 40 是脑质膜和脑脊液中的正常可溶性产物, 而 A β 42 由于其疏水性而认为在淀粉样斑块的成核过程中发挥重要作用^[4]。A β 具有很强的自聚性, 一旦发生, 很快形成极难溶解的沉淀, A β 42 比 A β 40 聚集更快, 为老年斑的主要成分。因此, 通过对 A β 42 的研究对认识 AD 病的微观致病机制有很重要的实际意义。

已有研究表明^[2]A β 在聚集状态下以 β -折叠为主, 而非聚集时则根据不同的环境采用不同构象, 如在生物膜和有机溶剂中以 α -螺旋为主, 在水溶液中则以卷曲为主。由于 A β 非常容易聚集, 且构象转变所需时间非常短, 因此到目前为止仍无法通过实验手段检测 A β 从 α -螺旋到 β -折叠或者从卷曲到 β 折叠的构象转变过程, 而计算机模拟是研究其构象变化的重要工具^[5,6], Xu 等^[7]用分子动力学模拟方法研究了 A β 40 从 α -螺旋结构到 β -折叠结构构象转换的机制, Wei 等^[8]利用副本交换分子动力学模拟分析了 A β (25-35)肽段二聚物的结构特征。

β -折叠结构可促进 A β 聚集成不溶性纤维, 不易被蛋白酶降解, 进一步形成极难溶解的不溶性纤维, 并由此生成老年斑。A β 由可溶状态到不溶状态的转变是 AD 发病机理中的关键因素^[9], 该过程中涉及许多因素, 主要与分子的疏水性、电荷数等特点有关, 也受 pH 值、温度、金属离子等因素影响。A β 的 C 端最后几个氨基酸有很强的疏水性, 且 C 端越长越易聚集成纤维状。研究发现^[10], 在 A β 潜伏期的早期有纤维状部分存在。A β 42 被认为是引起 AD 病产生的重要原因, 主要是因为它的错误折叠和聚集, 小的低聚物能导致很强的毒性。因此, 阻止 A β 42 的错误折叠/聚集, 或者两者之一从而减少 A β 42 低聚物的形成, 对 AD 病的治疗有重要意义^[11]。

尽管实验生物学对 A β 42 作了大量研究和统计, 对 A β 42 蛋白聚集引起的结构变化等进行了研究。但是在原子层次, 不同温度对 A β 42 构象变化有何影响, 温度是否影响 A β 聚集等问题尚不清楚。分子动力学模拟为研究此类问题提供了强有力的工具, 它已经成

为生物大分子结构功能关系研究方面不可缺少的重要工具, 在蛋白质折叠、去折叠及其与疾病关系方面开展了大量研究工作^[5-7,12]。本文利用分子动力学模拟方法, 研究 A β 42 蛋白质在不同温度下构象变换情况。研究表明, 该蛋白在三种不同温度均没有稳定的三级结构, 温度对二级结构和 β -sheet 的形成有明显影响, 这对 A β 42 微观聚集的温度效应认识有重要意义。

2. 材料和方法

A β 42 蛋白的初始构象取自蛋白质结构数据库 (PDB 号为 1IYT), 如图 1 所示^[13]。该结构中含有两段螺旋, 分别为 helix-1(残基 7~26)和 helix-2(残基 27~40), 是在膜环境下的结构。利用 GROMACS 软件包^[14]和 GROMOS43A1 力场^[15], 分别对体系在恒温恒压 (NTP)系综下进行分子动力学模拟。溶剂选用显含水的单点电荷 (SPC)模型, 蛋白放在周期性、大小合适的十二面体中, 溶质同盒子边缘最小间距设定为 0.8 nm。带电基团选用残基在 pH 值为 7.0 下的质子化状态。采用反应场修正的双阈值法来处理原子之间的非键相互作用, 即对距离小于 0.8 nm 的短程相互作用, 每步进行计算, 距离介于 0.8 nm 和 1.4 nm 之间的中程相互作用, 每 10 步更新一次, 对距离超过 1.4 nm 的静电相互作用, 利用连续介质反应场近似来处理, 其中水的相对介电常数为 54。用 SHAKE 算法^[16]固定所有的共价键, 相对偏差设为 10^{-4} 。利用最陡下降法进行 1000 步能量优化, 以消除不合理的能量势垒。为使模拟体系保持电中性, A β 42 蛋白体系加入 3 个带正电的钠离子, 然后进行第二次能量优化。从初始构象出发, 约束溶质原子, 进行 300 ps 的约束动力学模拟, 通过逐步升温的方法分别将体系温度由 50 K 上升到 300 K、340 K 和 380 K。然后在各自温度下分别进行 60 ns 的自由分子动力学模拟。



Figure 1. The structure of A β 42 (PDB entry 1IYT)
图 1. A β 42 的结构 (PDB 代号为 1IYT)

采用弱耦合作用^[17]保持体系温度与压强的稳定, 温度弛豫时间为 0.1 ps, 采用各项同性压强耦合, 弛豫时间为 1 ps, 耦合压强为 1×10^5 Pa, 模拟步长为 2 fs。每 2 ps 记录一次数据(坐标和能量)。

3. 结果与讨论

基于三个独立的计算机模拟, 分别计算了三种温度下残基 C α 原子相对于起始结构的均方根偏差(Root Mean Square Deviation, RMSD), 如图 2 所示。从图 2 中可以看出在 20~60 ns, RMSD 基本稳定, 因此选取各体系最后 40 ns 的轨迹进行分析, 计算残基 C α 原子

的均方根涨落、回旋半径、残基形成二级结构的几率、主链二面角分布, 并轨迹结构进行聚类分析。

3.1. A β 42 蛋白质在三个不同温度下无稳定结构

为考察 A β 42 蛋白在不同温度下的稳定性, 我们计算蛋白在模拟过程中 C α 原子相对于起始结构的均方根偏差(Root Mean Square Deviation, RMSD)以及残基回旋半径(Rg), 如图 2 所示。

RMSD 反映两个结构间的偏离程度, 该值越大, 表明两结构间差异越大。Rg 表征了蛋白质残基的致密程度, 在一定程度上体现了蛋白质在空间分布的延展性。

由图 2(a)可见, 在三种不同温度下, C α 原子的 RMSD 在模拟起始阶段(0~5 ns)均显著增大, 表明结构发生较大变化。在 340 K 时, 该值会逐渐减小, 并最终维持的 0.6 nm 左右; 而在 300 K 时, 该值在 1.2 nm 附近保持不变; 在 380 K 时, RMSD 经过一段大幅振荡后, 也保持在一较大值附近。在图 2(b)中, 不同温度下的 Rg 曲线在模拟起始阶段均有较大幅度的减小, 表明蛋白体积塌陷明显, 结合后面的分析发现, 在该阶段蛋白 L 状的拓扑结构消失, 空间结构发生较大变化。在 300 K 和 380 K 时, 蛋白的 Rg 曲线收敛于一较小值(0.9 nm)。而 340 K 时的 Rg 曲线呈振荡状变化, 并最终趋向稳定于 1.4 nm。

结果表明, 在三种不同温度下, A β 42 构象相对初始结构均有较大变化, 前 20 ns 变化剧烈, 后 40 ns 相对平缓。在不同温度下, A β 42 构象变化的剧烈程度不同。由图 2 的 RMSD 和 Rg 曲线变化可以看出, 在室温 300 K 下, A β 42 蛋白质相对平衡时, 构象塌陷明显(Rg 小), 温度升高到 340 K 时, 其构象塌陷后又开始伸展, 再升高温度到 380 K, 我们发现 A β 42 蛋白的构象变化又类似 300K 室温的情况。这说明, 并非温度越高, A β 42 构象变化越大, 存在“反转”现象。在常温下, A β 42 不能保持稳定的初始结构, RMSD 接近 1.2 nm, Rg 变化也很大。这与 A β 42 的固有无序蛋白特性相一致^[18], 即在生理条件下, A β 42 没有稳定结构。本文初始构象选取的是 A β 42 在膜中的结构。

3.2. 二级结构形成情况

C α 原子的 RMSD 和残基 Rg 体现蛋白整体行为,

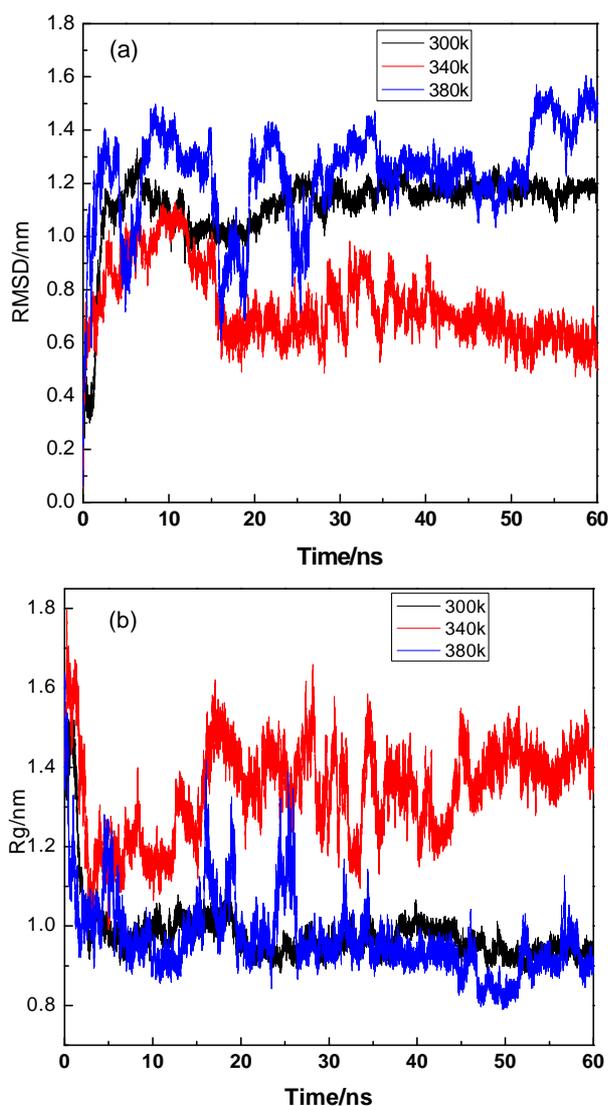


Figure 2. RMSD and Rg of A β 42 protein as a function of simulation time: (a) For RMSD; (b) For Rg
图 2. A β 42 蛋白的 RMSD 和 Rg 随模拟时间的变化: (a) RMSD 随时间的变化; (b) Rg 随时间的变化

要得到温度对蛋白局部结构影响, 还需要对二级结构情况进行分析。为此, 我们利用 stride 程序^[19]计算了 A β 42 各残基形成二级结构的几率, 如图 3 所示。考虑到模拟起始阶段结构变化较大, 我们选取 20~60 ns 的模拟轨迹进行分析。对于起始结构, 也就是 A β 42 在 PDB 中的结构, 含有两段较长的 α 螺旋(残基 7~26 和 28~40)。由图 3 可见, helix 的形成发生较明显变化。300 K 时, N 端 helix 形成的长度变短, C 端 helix 形成的几率变低, 大部分在 60% 以下, 稳定性较差, 且长度变短; 340 K 时, 在残基 9~35 之间, 形成 helix 几率均在 60% 以上, 起始态的两段 helix 又连接在一起, 形成一长 helix; 380 K 时, 仅在残基 10~18 间存在几率大于 60% 的 helix, 其余残基形成 helix 几率较低甚至不能形成 helix。在低温时, 残基没有形成 strand, 主要以 helix 或 turn 的形式存在。在高温 380 K 时, 除 helix 或 turn 的形式, 部分残基以低于 25% 的几率形成 strand。也就是说, 在低温下, 温度变化对

形成 strand 影响不大, 而高温时形成 strand 的概率增加。A β 42 二级结构的变化情况表明了该蛋白的固有无序特性, 而且不同温度其不同区域形成二级结构概率不一样, 这启迪我们, 温度和固有无序蛋白的无序程度有联系, 值得进一步深入研究。

为进一步分析不同温度下残基形成二级结构情况, 我们利用 STRIDE 软件计算残基主链二面角, 进而得到残基主链二面角分布。二面角平均力势定义为 $\Delta F = -K_B T \ln P_i$, 其中 K_B 和 T 分别为波尔兹曼常数和热力学温度, P_i 为残基主链二面角落入区域 i 的几率。不同温度下残基主链二面角平均力势分布如图 4 所示。不同区域定义如下^[20], β 折叠区域: $-180^\circ < \varphi < 0^\circ$ 且 $90^\circ < \psi < 180^\circ$ 或 $-180^\circ < \psi < -120^\circ$; α 螺旋区域: $-180^\circ < \varphi < 0^\circ$ 且 $-120^\circ < \psi < 30^\circ$ 。图中区域颜色越深, 对应该区域的平均力势越小, 相应区域构象在模拟中被采样的几率越大。由图 4 可知, 三种温度下蛋白质各有一个平均力势极小区域, 分别位于 $(-62.5^\circ,$

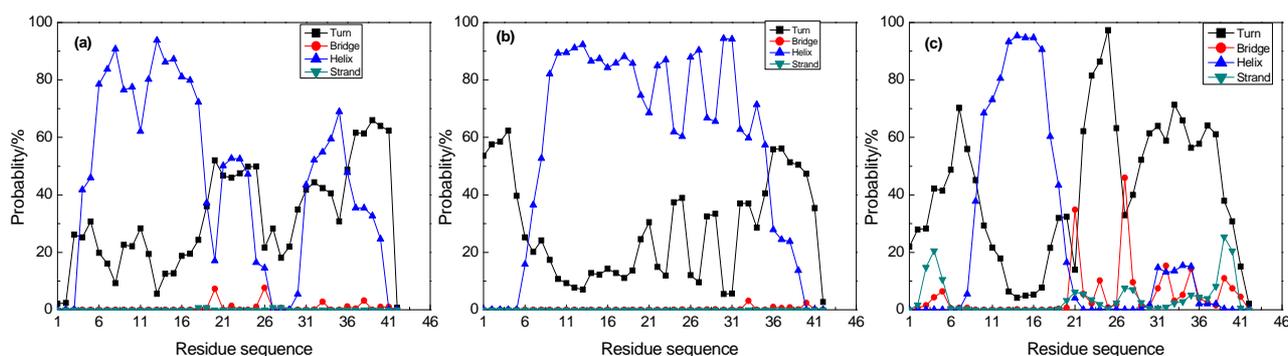


Figure 3. The formation of secondary structure for residues during the simulation of 20~60 ns: (a) 300 K; (b) 340 K; (c) 380 K
图 3. 20~60 ns 模拟区间残基形成二级结构的情况: (a) 300 K; (b) 340 K; (c) 380 K

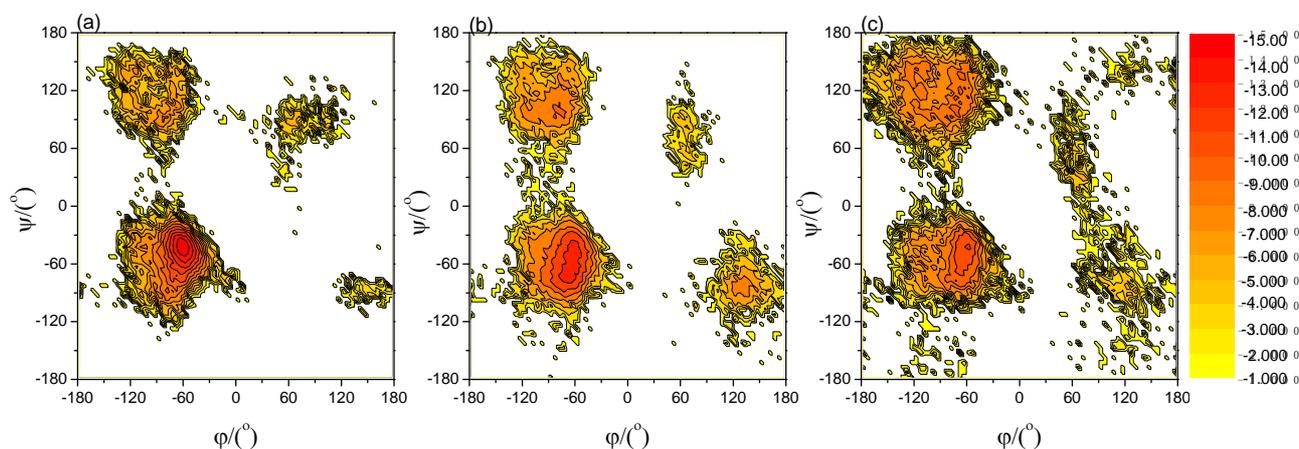


Figure 4. Potential of mean forces obtained from Ramachandran (φ, ψ) angles distributions for the residues: (a) 300 K; (b) 340 K; (c) 380 K
图 4. 残基 Ramachandran (φ, ψ) 角的平均力势: (a) 300K; (b) 340 K; (c) 380 K

-42.5°)、(-67.5°, -67.5°)和(-57.5°, -42.5°)附近, 均位于 α 螺旋区域。不同温度下力势极小值分别为 -14.74KJ·mol⁻¹、-12.58 KJ·mol⁻¹ 和-11.22 KJ·mol⁻¹。与 300 K、340 K 时二面角分布相比, 在 380 K 时, 残基二面角位于 β 折叠区域的概率增大, 表明当温度升高到 380 K 时, A β 42 有从 α 螺旋向 β 折叠转换的趋势。

3.3. 温度对三级结构的影响

温度变化导致二级结构的形成发生变化, 同时也会影响三级结构的稳定。为观察模拟过程中 A β 42 构象换转情况, 我们以模拟时间为反映坐标, 选取不同时刻蛋白瞬时快照如图 5 所示。在三种温度下, 两螺旋中的螺旋 2 首先发生变换。在模拟最后时刻, 蛋白的 L 状天然拓扑结构完全消失。

在 300 K 时, 伴随着螺旋 2 的变性, 螺旋 1 和螺旋 2 间的夹角逐渐减小, 最终螺旋 2 由与螺旋 1 由垂直变为平行。同上述分析一致, A β 42 在室温下并不稳定(固有无序蛋白的特征)。在 340 K 时, 螺旋 1 和螺旋 2 间的夹角逐渐增大, 由二者近似垂直, 变为近似在一条直线上, 形成较长的一段螺旋, 螺旋含量仍维持在较高水平。380 K 时, 随着模拟时间的进行, 螺旋 2 残基去螺旋化明显, 同时与螺旋 1 间夹角减小, 同 300 K 一样两螺旋近似平行。与 300 K 不同的是, 380 K 下螺旋含量较少, 且 C 段部分残基有形成 β 折叠的趋势。

综上所述, 无论是在室温还是高温下, A β 42 蛋白的三维结构均发生较大变化, 原有 L 状拓扑结构消失, 两螺旋夹角变小, 呈平形状(300 K 和 380 K), 或者形成一条直线(340 K)。

为了进一步确定体系采样构象的倾向类型, 我们对不同温度下模拟得到的构象系综进行聚类分析。构象聚类基于构象之间骨架原子位置的均方根偏差

(RMSD)。在模拟最后 40 ns 输出的轨迹中, 分别等间隔均匀选取 10,000 个构象作为分析对象, 基于构象之间的 RMSD 进行聚类。不同温度下, 含有构象数目最大的三类如表 1 所示。在 300 K 时, 轨迹中没有形成具有绝对优势的构象。而在另外两种温度下, 第 I 类含有 80% 左右的结构。

不同温度下, 每类的中心结构如图 6 所示。300 K 时, 类 I 和 II 的中心结构中, 两段螺旋呈平行排列, 残基螺旋含量减少。340 K 时, 蛋白成线状, 螺旋含量较高, 与上述二级结构分析结果一致。在 380 K 时, 类 I 中心结构中螺旋含量较低, 二级结构和三级结构均发生较大变化, 部分残基形成 β 折叠结构。也就是说, 高温可能导致 β 折叠结构的形成, 进而容易聚集形成淀粉样纤维。实验研究发现: 在 AD 病患者中, 只有温度超过 373 K 时, 淀粉样纤维才能被分离出来^[5]。

4. 结论

β -淀粉样多肽(β)聚集是阿尔茨海默病发病重要因素。本文选取 A β 42 蛋白为对象, 利用分子动力学模拟的方法研究其在 300 K、340 K 和 380 K 三种温度下的构象变化。模拟采用 GROMACS 软件包、GROMOS 43A1 力场和充分含水模型, 在三种温度下分别对 A β 42 进行了 60 ns 的独立分子动力学模拟。通过对模拟轨迹分析发现: 1) A β 42 在三种温度下, 均没有稳定结构, 模拟一定时间后, 其初始拓扑结构都消失, 说明该蛋白的固有无序特征; 2) 温度对二级结构和三级结构影响不同, 在 380 K 时, L 状天然拓扑结构变为直线状, 但二级结构含量仍较高; 3) 低温时蛋白质主要以 α -helix 形式存在, 而在高温(380 K)时, 有 α -helix 向 β -sheet 转换的趋势。也就是说, 高温可能导致 A β 42 的二级结构发生较大变化, 加速蛋白质

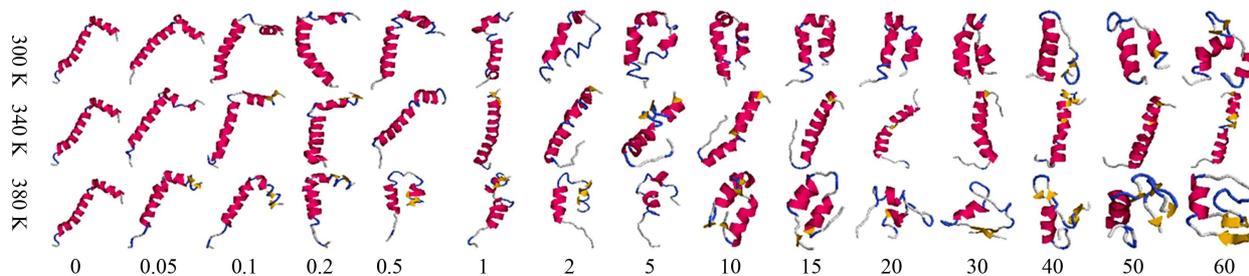


Figure 5. The snapshot of protein during the simulations
图 5. 模拟过程中蛋白瞬时快照

Table 1. The results of cluster
表 1. 聚类结果

	300 K	340 K	380 K
I	47.73%	79.20%	84.66%
II	26.42%	12.97%	12.80%
III	13.15%	4.70%	0.86%

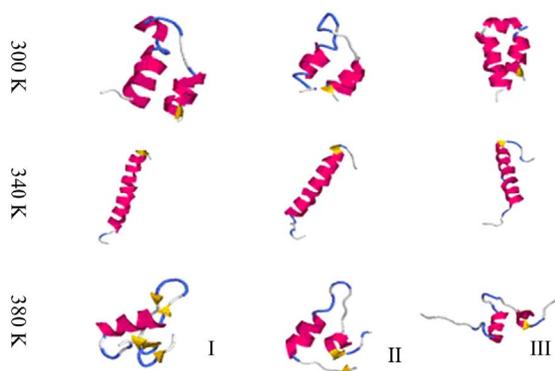


Figure 6. The central structure of each cluster
图 6. 每类结构的中心构象

β -sheet 的形成, 是形成聚集的基础, 进而形成不溶性纤维, 这可为新的药物设计提供启迪; 4) 不同温度对 A β 42 的影响给我们很大启示, 是否固有无序蛋白的无序程度和温度存在某种联系, 值得深入研究。

5. 致谢

感谢荷兰 Groningen 大学 Berendsen 教授提供的 GROMACS 软件。

参考文献 (References)

[1] 张伟, 刘志敏. 阿尔茨海默氏症的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 13-16.
 [2] R. Nelson, M. R. Sawaya, et al. Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 2005, 435(7043): 773-778.
 [3] 武一, 吉尚戎, 蒋伍玲等. β 淀粉样蛋白 A β 1-40 和 A β 1-42 的聚集性质比较[J]. 电子显微学报, 2003, 22(1): 21-25.
 [4] 于双妮, 刘立颖, 梁平作. β -淀粉样蛋白在阿尔茨海默病发病和免疫治疗中的作用[J]. 中国病理学杂志, 2005, 34(2): 113-114.

[5] T. Takeda, D. K. Klimov. Temperature-induced dissociation of A β monomers from amyloid fibril. *Biophysical Journal*, 2008, 95(4): 1758-1772.
 [6] Z. X. Cao, L. Liu, L. L. Zhao, et al. Effects of different force fields and temperatures on the structural character of abeta (12 - 28) peptide in aqueous solution. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(11): 8259-8274.
 [7] Y. Xu, J. Shen, X. Luo, et al. Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(15): 5403-5407.
 [8] G. Wei, A. I. Jewett and J. E. Shea. Structural diversity of dimers of the Alzheimer amyloid-beta (25 - 35) peptide and polymorphism of the resulting fibrils. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, 12(14): 3622-3629.
 [9] D. J. Selkoe. Alzheimer's disease: Genes, proteins and therapy. *Physiological Reviews*, 2001, 81(2): 741-766.
 [10] K. A. Coalier, G. S. Paranjape, S. Karki, et al. Stability of early-stage amyloid- β (1-42) aggregation species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Proteins and Proteomics*, 2012, 1834(1): 65-70.
 [11] T. Zhao, Y. Zeng and A. R. Kermode. A plant cell-based system that predicts A β 42 misfolding: Potential as a drug discovery tool for Alzheimer's disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2012, 107(3): 571-579.
 [12] 董晓燕, 都文婕, 刘夫锋. 多肽抑制剂抑制淀粉样多肽 42 构象转换的分子动力学模拟和结合自由能计算[J]. 物理化学学报, 2012, 28(11): 2735-2744.
 [13] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, et al. Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(22): 5642-5648.
 [14] D. van der Spoel, R. van Drunen and H. J. C. Berendsen. Groningen machine for chemical simulations. Groningen: Department of Biophysical Chemistry, BIOSON Research Institute, 1994.
 [15] X. Daura, A. E. Mark and W. F. van Gunsteren. Parametrization of aliphatic CHn united atoms of GROMOS96 force field. *Journal of Computational Chemistry*, 1998, 19: 535-547.
 [16] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti and H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 1977, 23(3): 327-341.
 [17] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Journal of Computational Physics*, 1984, 81(8): 3684-3690.
 [18] S. H. Chong, S. Ham. Impact of chemical heterogeneity on protein self-assembly in water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(20): 7636-7641.
 [19] M. Heinig, D. Frishman. STRIDE: A web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(Web Server Issue): W500-W502.
 [20] 许朝莹, 赵立岭, 曹赞霞等. 残基突变对 P53-DNA 结合域肽段构象影响的分子动力学模拟[J]. 物理化学学报, 2012, 28(7): 1665-1675.