

封面：

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

金属调节蛋白 NikR 结合金属离子选择性的理论研究

颜伟忠

工作完成日期 2014 年 9 月

报告提交日期 2014 年 11 月

厦门大学

2014 年 11 月

题名页

金属调节蛋白 NikR 结合金属离子选择性的理论研究

Theoretical Study on metal selectivity in Metal Regulatory Protein NikR

博 士 后 姓 名 颜伟忠

流动站（一级学科）名称 化学

专 业（二级学科）名称 物理化学

研究工作起始时间 2010 年 3 月

研究工作期满时间 2014 年 9 月

厦 门 大 学

2014 年 11 月

厦门大学博士后研究工作报告

著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘要

内 容 摘 要

镍调节蛋白 (NikR) 是一类响应转录因子, 在细胞内镍过量下可调节生物体内镍离子转运蛋白的表达。现在实验研究表明除了和镍结合外, NikR 还可以和铜、锌等其他过渡金属结合, 得到相应的金属结合蛋白。这些金属离子结合 NikR 蛋白的亲合力大小服从过渡金属复合物稳定性 *Irving-Williams* 序列: $Mn(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II)$ 。

为了深入理解 NikR 对过渡金属离子的选择性, 我们除了采用简单活性中心模型, 还使用量子力学/分子力学 (QM/MM) 组合方法和 Poisson-Boltzmann 方法, 系统分析了蛋白环境对过渡金属结合性和选择性的影响, 表明考虑蛋白环境的贡献对完全理解金属蛋白的金属结合性非常重要。计算得到的金属相对亲合力与转录诱导实验结果一致。金属离子对蛋白的溶剂化结合能有很大的贡献, 同时分析金属离子在蛋白中不同的结构以及其选择性。这些结果可以解释体外实验中 NikR 蛋白对 $Cu(II)$ 的亲合力大于 $Ni(II)$ 。

同时采用微扰分析方法研究了蛋白的其他带电氨基酸残基对金属蛋白结合中心的影响。结果显示附近 GLU97 对金属和蛋白的结合能有较大贡献。和周围残基的氢键作用也对结合能有一定影响。这些研究结果都将有助于设计具有实际应用价值的新型调节功能的金属蛋白。

关键词: 金属蛋白, QM/MM 方法, 微扰分析, 选择性

英文摘要

Abstract

NikR is a nickel-responsive transcription factor that regulates the expression of nickel ion transporter in the presence of excessive concentration of intracellular nickel. Modern experiment reveals that NikR can also bind a variety of transition metals. The relative affinities of metal binding to NikR follow the Irving-Williams series: $\text{Mn(II)} < \text{Co(II)} < \text{Ni(II)} < \text{Cu(II)} > \text{Zn(II)}$.

To obtain a deeper understanding of transition metal ion selectivity in NikR, in addition to a simplified active-site model, we have established a computational framework based on quantum mechanical/molecular mechanical(QM/MM) and Poisson-Boltzmann approaches that allows us to systematically analyze the protein contribution to transition metal binding affinity and selectivity. The results indicated the relative binding affinities that are consistent with observations from transcription induction experiments. The desolvation penalty of a metal ion make large contributions to the binding affinity. Moreover, our results explicitly demonstrate that NikR is well-tuned to favor the binding of copper metal ion over nickel ion in vitro.

Perturbation analysis of electrostatic contributions for important charged residues indicated the interactions from the GLU97 to active-site play a key role in the binding affinity, suggesting that mutations at these sites could be used engineering new NikR homologues proteins of significant technological applications.

Keywords: metalloprotein, QM/MM method, perturbation analysis, selectivity

目 录

目 次

1. 绪论	1
1.1 金属调节蛋白	1
1.2 NikR 蛋白	2
1.3 本论文的工作	4
2. 理论方法	5
2.1 QM/MM 组合方法	5
2.1.1 简介	5
2.1.2 能量相加方案	6
2.1.3 能量相减方案	6
2.1.4 QM/MM 的方法选择	6
2.2 CHARMM 力场	7
2.2.1 简介	7
2.2.2 三种 CHARMM 力场	8
2.2.3 计算公式	8
3. NikR 对不同过渡金属的选择性	10
3.1 研究背景和意义	10
3.1.1 NikR 晶体结构	10
3.1.2 NikR 蛋白的选择性	11
3.1.3 金属结合位的配位结构	12
3.2 计算方法	12
3.2.1 计算的选择	12
3.2.2 显含蛋白质环境的 QM/MM 计算	14
3.3 结果和讨论	18
3.3.1 简单活性中心模型	18
3.3.2 QM/MM 计算	19
3.4 结论	31
参考文献	33
致谢	44
博士生期间发表的学术论文、专著	45
博士后期间发表的学术论文、专著	46
个人简历	47

1. 绪论

目前发现大约有四分之一的蛋白质含有金属离子^[1, 2], 这些蛋白需要金属离子才能发挥作用, 因此微量的金属离子对于生物的各种生命过程是非常重要的^[3-5]。金属离子可以提高或者抑制蛋白的活性, 在蛋白的折叠以及与其他蛋白的结合、蛋白质结构稳定、酶催化反应、信号传导、光合成过程中都发挥着重要的作用。例如, 钙结合蛋白与钙离子结合是细胞信号传递的重要步骤^[6]。铜蛋白与体内的氧化还原反应密切相关^[7, 8]。含铁蛋白如肌红蛋白和血红蛋白具有携氧和储氧的能力^[9, 10]。锌指蛋白与多种生物功能相关, 如 DNA 识别、RNA 聚合、转录、激酶活性调控等^[11-14]。蛋白质也已经进化出了各种吸收和使用这些金属离子的方法。但是另一个方面, 金属特别是过渡金属离子如果在细胞内的浓度过高就会产生毒性, 因此控制细胞内金属离子的体内平衡就变得至关重要, 在这个调节过程中, 金属调节蛋白就发挥了重要的作用。

1.1 金属调节蛋白

金属调节蛋白是近十几年来发现的具有重要生物功能的一类金属蛋白。生物体内某些蛋白质能够在金属离子的调节下生成具有各种特定蛋白质结构的金属蛋白, 它们与其他蛋白质或核酸作用, 结合于特定的部位, 从而启动或调制一系列后续的生物化学反应, 或者控制和调节 DNA 和 RNA 的转录、翻译和表达。

蛋白可以结合不同金属离子是由下列因素决定的, 包括结合残基的自身性质、数目和排列的结构, 也和金属结合部位空穴的大小和电荷有关。一般来说金属离子的结合能力通常会遵循二价过渡金属离子络合物的天然稳定性序列, 通常称为 Irving-Williams 序列^[15, 16], 即 $Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II)$ 。其中 $Cu(II)$ 具有具有高度亲和能力, 拥有很大的竞争性, 即可以和金属脱辅基蛋白形成最紧密的结合, 特别是那些拥有含硫和氮原子的残基配体的蛋白。而一价铜离子的亲和性则是在还原性细胞质环境下会有优势^[17-19]。生物体内需要许多不同金属离子, 各种不同蛋白需要结合不同的金属离子才能发挥功能。那么蛋白如何选择正确的金属离子, 如何结合需要的金属离子呢? 按照 Irving-Williams 序列, $Mn(II)$ 的亲合力远弱于

Cu(II), MncA 蛋白如果在溶液中要结合 Mn(II), 至少 Mn(II)的浓度要比 Cu(II)或者 Zn(II)高 10^4 倍, 然而一旦 Mn(II)结合到蛋白上, 就不能被 Cu(II)所置换。在细胞质 Mn(II)结合蛋白折叠, 而 Cu(II)和 Zn(II)^[20, 21]已经在周质中被紧密结合而不会干扰 Mn(II)折叠。这说明蛋白可以克服其结合能力大小而去控制金属的结合^[22]。已知影响金属和蛋白的结合效率可能有很多的因素, 而研究金属调节蛋白对于不同金属离子的结合亲和力和选择性的本质机理是理解细胞内金属蛋白的调节功能的重要一步^[19, 23, 24], 将有助于我们设计能识别和结合特定金属离子的新型蛋白^[25-27]。

1.2 NikR 蛋白

首先在大肠杆菌中(*E.coli*)^[28, 29]发现的镍结合蛋白(NikR)是一类重要的镍金属离子调节蛋白, 它的同源蛋白也在 *H.pylori*^[30]和 *Pyrococcus hoekoahi*^[31]中发现。它的主要功能是调节细胞内金属镍离子的吸收, 保持体内镍离子浓度的平衡。因为已知生命体内吸收过量的金属镍离子是有毒性的, 需要通过 NikR 调节镍离子的浓度。另外体外实验^[32]表明在缓冲溶液下 NikR 蛋白同时可以和其他多个过渡金属元素结合, 镍离子表现的亲和能力不如同样二价的铜离子, 而生物体内的 NikR 蛋白却可以结合镍离子, 这种针对不同金属离子的选择特异性值得我们进行深入的研究。通过研究 NikR 蛋白的结合性质可以使我们对于蛋白如何获得需要的正确金属离子有更深入的理解。

不同蛋白中的金属结合位的结构是复杂的, 金属离子与蛋白的亲合性也表现出极大的差异。在体外试验中许多金属蛋白在多种金属离子混合的环境下可能选择更强亲和性的金属离子。而在生命进化过程中, 细胞已经进化出能够获得足够的、正确的金属离子满足生理过程需要的机制。这些机制可以确保蛋白克服金属对蛋白的本质亲和性的限制, 从而获得正确的金属离子^[19]。

通过了解不同金属离子和 NikR 蛋白之间不同的互相作用与不同配位结构的影响, 以及周围蛋白各种带电残基对它们之间的亲和性的影响, 将加深我们对金属调节蛋白中调节机理的理解。在这个基础上, 我们就可以采用蛋白工程技术设计有着优异选择性的 NikR 蛋白^[26, 27], 这些新的变异蛋白可以更好结合金属镍离子或者其他过渡金属离子。

晶体结构分析^[28, 30, 31, 33-36]表明, 任何 NikR 蛋白都是同源四聚体, 分别由两部分组成: 中央的四聚体金属离子结合区和两端的二聚体区域。在细胞内镍离子过量的时

候，中央碳端区域结合镍离子，两侧氮端区域和 DNA 结合来调节镍调节子的转录，从而抑制镍离子的吸收，降低其在生物体内浓度。目前已经有分子动力学研究了 NikR 蛋白结合镍离子后的结构变化的性质。对于脱辅基蛋白与镍结合下的 *PhNikR* 的研究，暗示了一些对蛋白关键部位的残基的变异可以抑制蛋白和 DNA 结合的活性^[37]。*Musiani* 研究了结合镍离子如何影响 NikR 蛋白两侧氮端区域的顺反异构的稳定性，表明 *HpNikR* 和 DNA 的结合是通过一个复杂的多步过程进行^[38]。最近 *Phillips* 研究了钾离子结合到 *EcNikR* 蛋白的低配位上，镍离子结合到高亲和性结合位，这种金属结合方式提高了 *EcNikR* 与 DNA 的结合^[33]。这些理论研究都只和镍离子结合蛋白与 DNA 作用相关。

体外的光谱以及金属结合实验研究揭示除了和镍离子结合外，NikR 还可以和铜、锌等其他的二价过渡金属离子结合，得到不同金属的 NikR 蛋白^[32, 39]，其亲和性大小同样遵从过渡金属复合物的稳定性 *Irving-Williams* 序列^[40, 41]。这些结果都表明了 NikR 蛋白对于不同金属离子具有不同的选择性。等量过渡金属离子和 NikR 蛋白的结合与镍离子的结合是一样的，二价铜离子和蛋白的结合甚至比镍离子的结合更强，这些表明铜离子在体外的缓冲溶液环境下是具有高度亲和性，能和 NikR 蛋白形成更紧密的结合，特别是那些拥有包含硫的蛋白残基配体的蛋白。还有些文献暗示脱辅基 NikR 蛋白可能是在还原性的细胞溶质环境下与金属离子结合，在这种还原性的溶液中，实验结果暗示自由的铜离子可能被还原成一价亚铜离子^[23, 42]。亚铜离子和 NikR 蛋白的结合可能比铜离子的结合弱，从而镍离子能结合 NikR 蛋白。这可能是自然进化选择使得 NikR 可以识别体内过渡金属元素镍离子和铜离子的原因。

金属对于蛋白的选择性不仅取决于其亲和性，还有其空间构型^[19]，使得金属和蛋白质残基结合具有多样性，过渡金属和蛋白残基的结合可能具有不同的配位结构（三角形、四面体、平面四方、八面体）^[24]。晶体结构测定中发现金属和 NikR 蛋白的配位结构就具有多样性，镍离子主要和周围的四个氨基酸残基（His76, His87, His89, Cys95）配位，形成平面四方的结构^[28]，二价铜离子在周围蛋白环境的作用下与残基的配位结构与镍离子的近似，但是锌离子与 NikR 蛋白的配位结构与前二者不同，形成一个近似四面体的结构^[43]，其他的如钴离子是形成八面体的结构。这些不同的二价金属离子具有不同的配位结构，这些因素都可能影响金属离子和 NikR 蛋白结合稳定性，也使得 NikR 蛋白和金属离子的结合性质的研究变得很复杂。

1.3 本论文的工作

目前对于含有金属的蛋白质研究都只是关注金属离子和周围配位几个残基的简单模型研究，而忽略了周围蛋白环境可能对金属中心的结构变化和结合性质的影响。为了探究蛋白环境的影响，我们采用量子力学和分子力学结合的 QM/MM 组合方法，就可以在考虑蛋白环境的情况下研究金属离子和蛋白的结合能（QM 方法用于研究生物分子中重要的活性中心部分，MM 方法考虑周围蛋白环境的影响）。这个方法可以同时兼顾计算的效率和可靠性。

在这个基础上，我们研究了一系列不同的二价过渡金属离子对 NikR 蛋白的选择亲和性，在金属结合中心的不同配位结构，以及金属调节蛋白对不同金属的选择性的微观性质。

为了考虑重要的带电残基对金属结合中心结合性质的影响，我们同时采用重要的氨基酸残基的电荷屏蔽的这种微扰分析方法去研究周围的这些氨基酸残基对于金属和 NikR 蛋白的结合能的贡献。这种方法可以了解不同的氨基酸对结合能的贡献大小。这些结果将可以用于改变这些残基，在 NikR 蛋白基础上设计出具有优异选择性的新型 NikR 蛋白，吸收有毒重金属或者作为生物传感器。

2. 理论方法

2.1 QM/MM 组合方法

2.1.1 简介

量子力学/分子力学组合 (QM/MM) 方法已成为模拟生物分子系统反应的最有效方法。量子力学 (QM) 方法需要描述化学反应以及其他电子结构变化过程, 如电荷转移或电子激发。然而, QM方法的高计算量限制了该方法只能描述最大包含几百个原子的体系。然而生物聚合物的体积和构象的复杂性要求一个高效的方法, 它可以模拟几十万个原子在纳秒级时间尺度上的运动。这可以通过以高效力场方法为基础的分子力学 (MM) 方法实现。计算精度和计算量之间有着不可调和的矛盾。计算精度要求越高, 需要的计算量必然越大, 在计算能力总是有限的情况下我们能处理的体系大小就越小。而生物化学体系对能量变化的敏感和体系之庞大又要求我们必须使用能兼顾计算量和计算精度的方法。因此模拟生物大分子的最高效方法就是将高精度的量子力学QM方法和高效的分子力场MM方法二者结合起来的组合方法。这是因为通常大生物分子中发生的化学反应, 真正参与反应的通常都是一小部分被称之为反应活性位点的结构。对于这部分反应活性位点 (例如, 底物和辅因子中的酶反应) 使用高精度的QM计算方法。而分子力场MM方法用于处理周围的环境 (例如, 蛋白质和溶剂), 分子力场方法虽然不能用于描述结构的明显变化, 例如涉及化学键断裂或生成化学反应, 但却足以描述分子结构的较小变化, 比如活性位上发生的反应对其周围环境分子结构的影响。所得的方法通常被称为组合或混合QM/MM方法。QM/MM方法可以在适当的计算量和必要的计算精度下, 描述生物分子系统内的化学反应。

这项开创性的贡献是由Warshel和Levitt在1976年完成的^[44], 标志QM/MM计算模拟时代的开始, 最初是采用半经验方法和力场结合, 随着计算能力的提高, 一些高精度的计算方法也被加入这个组合方法中。一般来说QM/MM 可分为两种能量计算方案: 加方案和减方案。

2.1.2 能量相加方案

在加方案中体系的能量由QM区、MM区以及QM区与MM区之间的偶合作用这三部分加和而得。

$$E_{Total} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM-MM} \quad (1)$$

在公式(1)中，由于QM和MM部分之间的强相互作用，整个体系的总能量不能通过简单加和子体系的能量来得到，因而计算能量必须考虑耦合项，特别要考虑子体系之间的边界问题。QM-MM 耦合项包括MM区电荷对QM区的影响、对被QM/MM边界切开的共价键的处理等等。加方案的好处在于，MM区与QM区间相互作用是显式的经由QM/MM耦合项得到的，这就方便人们对其进行调整以适合计算方法或具体计算需要。同时QM区的QM计算能够感受到来自MM区的影响，例如MM区的电荷的嵌入，这也更加接近于真实情况。加方案的缺点在于QM/MM 耦合项的加入不可避免在计算中引入一些人为因素，从而降低了计算方法的普适性并可能产生不可控制的误差。

2.1.3 能量相减方案

相对而言，减方案的概念更加简单，体系的总能量对QM区的QM计算所得能量加上全体系的MM计算所得的能量再减去QM区的MM计算所得能量得到：

$$E_{Total} = E_{QM+Link,QM} + E_{QM+MM,MM} - E_{QM+Link,MM} \quad (2)$$

在减方案中MM区与QM区之间的相互作用完全包括在全体系的MM计算中。通常利用氢原子封闭QM区的方法来处理被QM/MM边界切断的共价键。其优点在于概念简单、操作方便。缺陷在于QM区的QM计算几乎完全不能感受到来自MM区的影响。

2.1.4 QM/MM 的方法选择

QM/MM 的公式形式能容纳几乎所有的 QM 和 MM 方法的组合。QM 方法的选择与纯粹的 QM 计算遵循同样的选择标准。本质上，在有外部点电荷场（代表电荷或极化嵌入的 MM 电荷模型）的情况下，QM 模式必须能够进行自洽场处理。实际上，由于密度泛函理论（DFT）很好地平衡了计算能力和计算效率，现在许多生物分子 QM/MM 都采用 DFT 作为 QM 方法。传统上，半经验 QM 方法更为流行，目前对

QM/MM 分子动力学模拟仍很重要。半经验、DFT 激发的自洽电荷密度泛函紧束缚 (SCC-DFTB)^[45]方法在生物分子 QM/MM 研究仍然获得广泛应用^[46-48]。线性标度局部关联方法 (如 LMP2, LCCSD)^[49-51]的最新发展明显扩展了可处理的体系的规模, 多达几十个原子。高水平从头算方法优越的计算精度现在可以应用于生物分子的 QM/MM 研究, 可用于固定构型 (即单点) 的能量计算。至于 MM 方法, 有许多生物分子力场可供选择。常用的包括 AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS-AA^[52-55]。典型的生物分子包括蛋白质, 大部分情况下的核酸, 有时包括碳水化合物或脂类。

本文中的 QM/MM 计算均使用 Chemshell 计算软件完成。Chemshell 计算软件是 QUASI 工程的主要成果^[56]。该计算软件实现了多种计算软件包中的 QM 计算方法与 MM 计算方法的对接, 并允许我们使用 QM/MM 方法进行体系的单点能量计算、结构优化、分子动力学计算和数值频率分析。本文中的 QM/MM 计算均使用 Gaussian03 计算软件包进行量子化学计算, 使用 Chemshell 内置的 Dlpoly 程序进行分子力学计算。

2.2 CHARMM 力场

2.2.1 简介

基于与 AMBER 非常相近的原理, Karplus 等人设计的 Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM) 力场, 最开始用于研究蛋白质^[57, 58]。实际上, 这两种力场使用一套有限数目分子高精度计算进行参数化, CHARMM 中能量项的数学形式也与 AMBER 力场中的极为相似。二者的主要不同在于使用的参数及其派生值。Karplus 提出了适合 CHARMM 程序中全原子经验能量函数的新的蛋白质参数。参数的评估基于使力场的成键项和非键相互作用项达到平衡的自洽方法, 该方法同样使溶剂-溶剂、溶剂-溶质、溶质-溶质相互作用项这三项之间达到平衡。采用从头算计算得到的气相结构、振动光谱、扭转能量面进行内部参数优化。肽的骨架键合参数对 N-甲基乙酰胺和丙二酸二肽优化得到。相互作用参数, 特别是原子电荷, 通过拟合代表骨架和各种侧链的水与模型化合物的从头算相互作用能和构型得到。另外, 在优化中使用偶极矩, 蒸发、溶解和升华的实验热和自由能, 分子体积, 晶体渗透压和结构。

2.2.2 三种 CHARMM 力场

现在主要有三种力场设计用于蛋白质，分别是联合原子 CHARMM19，全原子 CHARMM22^[59]，二面角势校正变体 CHARMM22/CAMP^[60]。最常用于蛋白质模拟的 CHARMM 力场是 CHARMM22。这种力场中，原子电荷来源于在 6-31G(d)水平对模型分子与水之间相互作用的量化计算。CHARMM27 设计用于 DNA, RNA 和脂类^[61]。计算也可以组合不同的 CHARMM 力场。例如，CHARMM22 和 CHARMM27 可以组合用于包含蛋白质和 DNA 相互作用体系的研究。也能下载到额外的用于 NAD⁺、糖类等物质的参数。这些力场的版本号指第一次包含它们的 CHARMM 版本号。当然，也可以用包含这些力场中每一种的最新 CHARMM 程序。另外，这些力场可以用于许多支持它们的其它分子动力学程序。

为避免计算时间不必要的增长，CHARMM22 力场在改进势函数精确度的同时，希望限制势函数的复杂性。全原子经验势里所采用的策略是优化 CHARMM 势能函数中的参数而不改变函数形式。由于溶剂和显含溶剂在当前的大部分模拟中都很重要，侧重于强调蛋白质-蛋白质、蛋白质-溶剂和溶剂-溶剂相互作用之间的平衡。为取得这种平衡，优化了 CHARMM19^[62]中非键相互作用极化氢势能函数。该优化参数组详尽分析了每种情况下的一个或多个小分子化合物，可用于蛋白质主链和单个侧链。骨架参数采用 N-甲基乙酰胺和丙氨酸二肽，组氨酸参数基于咪唑、4-甲基咪唑和咪唑鎓盐，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸基于包括乙烷、丁烷和异丁烷的脂肪族化合物，等等。这种策略保证每个氨基酸的参数对可用的数据完全优化。除了芳香环侧链用 Jorgensen 发表的数据稍作修改外^[63]，所有的参数用文中描述的自洽程序优化^[59]。需要着重强调的是，显性表示芳香环中的氢对产生重现小肽晶体中的芳环-芳环相互作用的四极矩非常必要^[64]。

2.2.3 计算公式

下边的公式(3)给出了 CHARMM 中考虑的能量函数。该函数中，伸缩和弯曲项通过谐波二次项函数计算，扭转项依然用傅里叶序列描述。范德华相互作用采用 Lennard-Jones 12-6 公式计算，静电相互作用则是通过库伦公式描述。CHARMM 能量函数依然包含描述 1,3 非键相互作用的 Urey-Bradley 项。该项对面内变形，区分对称、

不对称键伸展模式（比如在脂肪族分子中）非常重要。该 CHARMM 能量函数有如下形式：

$$\begin{aligned}
 U(\vec{R}) = & \sum_{bonds} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{UB} K_{UB} (S - S_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \\
 & \sum_{dihedrals} K_\chi (1 + \cos(n\chi - \delta)) + \sum_{impropers} K_{imp} (\phi - \phi_0)^2 + \\
 & \sum_{nonbond} \epsilon \left[\left(\frac{R_{minij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{minij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_1 r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{3}$$

其中， K_b 、 K_{UB} 、 K_θ 、 K_χ 和 K_{imp} 分别是键、Urey-Bradley、键角、二面角和非正常扭转角力的常数。 b 、 S 、 θ 、 χ 和 ϕ 分别为键长、1,3Urey-Bradley 非键距离、键角、二面角和非正常扭转角，包含下标 0 的代表各独立项的均衡值。 ϵ 是 Lennard-Jones 势井深度， R_{min} 是 Lennard-Jones 最小距离， q_i 是局部原子电荷， ϵ_1 是有效介电常数， r_{ij} 是原子 i 和 j 之间的距离。不同原子对之间的 Lennard-Jones 参数来自 Lorentz-Berthelodt 组合规则，其中， ϵ_{ij} 基于 ϵ_i 和 ϵ_j 的几何平均， R_{minij} 基于 R_{min_i} 和 R_{min_j} 的算术平均^[59]。

3. NikR 对不同过渡金属的选择性

3.1 研究背景和意义

过渡金属离子和蛋白分子间的相互作用在各种生命过程中发挥着非常重要的作用。目前为止,已经有许多实验和理论研究用于理解这些金属结合蛋白的生物物理化学机理。通过这些大量的研究,我们可以了解金属结合蛋白中的内在过渡态结构以及其中质子和电子转移过程^[65-68]、金属结合部位的结构^[69-72]以及生物催化的机理^[73, 74]。很多的研究都是针对金属离子和小分子配合物进行的^[75-77],忽略金属结合蛋白所处的蛋白环境对于这些金属过渡结合位置的影响。这就需要采用一种可以考虑蛋白环境的理论研究方法。

镍响应调节蛋白NikR是从大肠杆菌*Escherichia coli* (EcNikR)^[28, 29]中发现的一种转录因子,在镍离子过量的情况下通过结合脱氧核糖核酸DNA影响细胞中镍转录子的表达,从而在调节细胞内镍离子的含量。镍调节蛋白的同源蛋白在*H. pylori* (HpNikR)和*Pyrococcus horikoshi*(PhNikR)^[30, 31]也有发现。

3.1.1 NikR 晶体结构

镍调节蛋白NikR是一个同源四聚体的蛋白,主要由两部分构成:中央的四聚体金属结合区域和侧面两端的二聚体的带状-螺旋-螺旋(Ribbon-Helix-Helix, RHH)区域。金属结合区域是由蛋白碳端的残基48-133(*E. coli*)组成,每一条链上都包含一个独立的高亲和性镍离子结合位,和周围四个残基形成平面四方的配位结构,由其中一条链上的两个组氨酸残基HIS87、HIS89和半胱氨酸残基CYS95以及附近另一条链上的一个组氨酸残基HIS76组成。蛋白的DNA结合区域是由残基1-47组成,蛋白氮端这个二聚体区域可以和DNA结合,从而开始蛋白的转录过程。通过比较不同脱金属NikR蛋白和镍结合后的蛋白结构表明,金属结合区域通过一个柔顺结点和二聚体DNA结合RHH区域连接,这表明相对于金属结合区RHH区域可以自由移动。但是这个区域在金属结合区域没有结合金属时具有柔性,在结合金属后具有结构化,易与DNA结合。这说明RHH区域在金属结合部位结合到镍离子前是不能和DNA结合的^[28, 29]。同时在

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库