

# 锌酶的计算模拟: 挑战与最新进展\*

巫瑞波<sup>1</sup> 曹泽星<sup>2\*\*</sup> 张颖凯<sup>3\*\*</sup>

(1. 中山大学药学院 广州 510006; 2. 厦门大学化学化工学院 福建省理论与计算化学  
重点实验室 厦门 361005; 3. 纽约大学化学系 纽约 10003)

**摘 要** 锌酶在人体中分布非常广泛,种类繁多,是当前最受关注的金属酶之一。由于在锌配位结构上的多样性以及  $Zn^{2+}$  饱和的 d 轨道带来的“光谱寂静”性,导致许多实验研究手段受限。计算模拟在锌酶的研究中发挥着越来越重要的作用,已经成为不可或缺的研究工具。现代量子化学计算模拟方法,特别是被视为研究生物大分子体系非常有效的 QM/MM 组合方法,目前已经被广泛应用于探讨复杂多变的锌配位结构以及锌酶催化反应机理。通过在 QM/MM 水平下开展的分子动力学模拟,可以揭示锌酶体系中结构与功能间的相互关系。此外,分子力场方法在锌酶研究中同样发挥了不可替代的作用,由于传统力场普遍无法正确描述锌配位结构,因此,锌酶分子力场的开发具有迫切的现实意义。本文总结了近年来锌酶计算模拟领域的最新进展,提出了锌酶计算研究中还有待解决的一些问题。

**关键词** 锌酶 量子力学/分子力学组合方法 分子动力学模拟 力场 反应机理 配位结构  
中图分类号: 0641.12; 0641.4 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2012)06-1175-10

## Computational Simulations of Zinc Enzyme: Challenges and Recent Advances

Wu Ruibo<sup>1</sup> Cao Zexing<sup>2\*\*</sup> Zhang Yingkai<sup>3\*\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;  
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Fujian Provincial Key Laboratory of Theoretical and  
Computational Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China;  
3. Department of Chemistry, New York University, New York 10003, US)

**Abstract** Zinc enzymes play a variety of essential biological roles, and their functions and/or structural organizations are critically dependent on the zinc binding site. However, the zinc coordination shell is so complicated that an accurate and powerful theoretical simulation protocol is highly required in calculation. Herein, we review the recent studies of the selected zinc enzymes by the state-of-the-art combined quantum mechanism/molecular mechanism molecular dynamics (QM/MM MD) simulations in probing the reaction mechanism and revealing the relationship of structure and function. Meanwhile, the accuracy of all the current available pairwise force fields to describe zinc coordination structure is very poor, so the recent development of force fields for zinc enzyme is also presented. By the end of this review, some prospects and suggestions are given for further exploration of zinc enzyme.

**Key words** zinc enzyme; QM/MM; molecular dynamics simulation; force field; reaction mechanism; coordination geometry

收稿: 2011 年 11 月, 收修改稿: 2012 年 3 月

\* 国家重点基础研究发展计划(973)项目(No. 2011CB808504, 2012CB214902)和国家自然科学基金项目(No. 2133007, 20873105)资助

\*\* Corresponding author e-mail: zxcao@xmu.edu.cn; yz22@nyu.edu

## Contents

- 1 Significance and challenges of zinc enzyme
  - 1.1 Zinc enzyme
  - 1.2 Challenges of experimental research in zinc enzyme
  - 1.3 Challenges of computational research in zinc enzyme
- 2 Recent advance of computational research in zinc enzyme
  - 2.1 QM/MM study of zinc enzyme
  - 2.2 Force field development for zinc enzyme
- 3 Outlook

## 1 锌酶的研究意义及挑战

### 1.1 锌酶

#### 1.1.1 锌酶的分类及其重要性

过渡金属锌(Zn)是生物体内必需的元素之一,它是生物体中第二丰富的过渡元素。生物信息学研究<sup>[1]</sup>发现有大约2 800个人类蛋白分子中含有锌,在人类蛋白组中占到了~10%。因此,锌具有十分重要的生物学作用和生理功能<sup>[2]</sup>,例如:转录因子、信号蛋白、运输/储存蛋白质以及多种酶的组成成分。目前已知含锌的酶有300多种,遍及在所有6大酶系中(如表1所示)。它们的功能和/或结构组织都要依赖锌结合位点(往往以锌的配位结构存在),而锌酶也是唯一一种用金属来命名的酶<sup>[3-5]</sup>。

表1 六大类酶中的代表性锌酶

Table 1 Representative zinc enzymes in the six classes of enzymes

酶的类别	代表性锌酶
氧化还原酶	乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)
转移酶	法尼基转移酶(farnesyl transferase, FT)
水解酶	组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)
裂合酶	碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)
异构酶	磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerase, PGI)
连接酶	DNA连接酶(DNA ligase)

锌酶作为当前最受关注的金属酶之一,在人体中分布非常广泛、种类繁多,并参与众多生物化学过程。例如:组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥着重要作用<sup>[6,7]</sup>,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)通过调节细胞外基质的降解程度继而影响肿瘤的侵袭与转移<sup>[8,9]</sup>。特别地,

一方面在实验上越来越多的晶体结构被解析出来,另一方面针对锌酶的计算模拟研究也在逐年增加,为在分子/原子水平上认识锌酶的活性提供了基础。此外,许多锌酶与人体疾病特别是一些癌症相关,因此其抑制剂分子设计<sup>[3,4,10]</sup>、人工锌酶的合成<sup>[11,12]</sup>等方面的研究对药物研发也具有重要意义。

#### 1.1.2 锌配位结构的特征

在正常的生理物理条件下,锌一般是以二价离子的形式存在,根据 $Zn^{2+}$ 在功能上的差异,一般将其配位结构分成催化、结构、抑制和蛋白界面结合位点。典型的锌配体包括半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、水分子以及其他小分子(如底物分子/抑制剂分子)<sup>[2]</sup>。特别地,由于Glu、Asp中羧基既可能作为双齿配体也可能采取单配位的方式与中心锌离子相互作用,而且不同类型的配位原子(N、O、S)与 $Zn^{2+}$ 的相互作用能力存在差异。这些就使得锌配位结构有可能表现出配位模式的多样性(单、双配位)、整个配位结构表现出充满柔性、动态可变(配位数可变)的特征。

研究发现,在水溶液中锌的最稳定形式是六配位<sup>[13,14]</sup>。而从目前已经测定的晶体结构来看,4、5、6三种配位数在锌酶中都存在,其中四配位是锌酶中最常见的配位模式<sup>[4,15]</sup>。此外,实验观测<sup>[16-18]</sup>还发现,在同样的配体环境下锌配位结构却有可能拥有不同的配位数,而且分子动力学模拟<sup>[19,20]</sup>更是直接观察到了某些锌配位结构的动态变化,诸如Asp/Glu配体的单双配位交替,水分子进入以及离开锌离子的第一配位层。锌酶中锌配位结构表现出多样性与柔性的特征,给实验上正确测定、理论计算上合理描述锌配位结构带来了挑战。

### 1.2 锌酶实验研究的挑战

#### 1.2.1 锌的“光谱寂静”性

由于 $Zn^{2+}$ 的 $d^{10}$ 饱和电子结构特征,它的化合物一般为无色而且呈现为抗磁性<sup>[11]</sup>, $^{67}Zn$ 形成的化合物的NMR谱也分布较宽因而不敏感,往往只能用于Zn的小分子化合物的研究<sup>[21]</sup>。因此,锌被称为生物体内“光谱寂静(spectroscopically quiet)金属”<sup>[22]</sup>,这就大大限制了各类实验技术在含锌生物体系中的应用。目前,锌酶的结构多来自X射线衍射(XRD)测定<sup>[23]</sup>,然而,在XRD实验得到的锌酶晶体结构中,经常会出现锌离子缺失的情况。此外,由于电子密度相近,对于有些结构待确定的酶,其中心金属离子是 $Zn^{2+}$ 还是其他金属中心(例如Fe、Mn)也不好判断。再则,XRD实验测得的晶体结构

只能代表酶的某一静态结构特征,不能获得有关锌酶中锌配位结构的动态信息,因而就很难全面理解酶的动态结构性质与催化功能的关系<sup>[24]</sup>。

### 1.2.2 锌酶反应机制的研究及其抑制剂的设计

对酶反应机制的探讨是深入研究某一类酶体系最重要的基本问题之一。一方面,同位素示踪、pH环境比对、残基突变、酶反应动力学常数的测定等实验手段都可能用以直接或者间接地探讨锌酶的反应机理。另一方面,尽管随着高分辨XRD技术的发展,被测定的锌酶数量在迅速增长,无论是从光谱上表征中间体,还是通过结晶实验获得酶与底物或者抑制剂分子的复合物,都可以用来研究金属蛋白酶的催化反应。然而要想完整的描绘金属蛋白酶活性位点的具体结构及其催化功能,还是存在很大的困难<sup>[25]</sup>。毕竟对这些大分子体系特别是含有金属的复杂体系,实验往往只能得到一些与反应间接相关的信息,比如沿着酶反应途径的过渡态结构信息就很难从实验的手段上获得。因此借助理论计算特别是量子化学理论的方法来研究锌酶反应机理就显得意义重大。

反应机理的研究是基于机制(mechanism-based)或基于结构(structure-based)的现代抑制剂分子设计的基础。按传统药物设计的思路,如果单纯借助实验手段来进行酶的抑制剂设计,往往需要合成大量潜在的抑制剂分子,进行高成本的动力学、热力学数据测定和生物活性表征。而借助计算模拟工具<sup>[26,27]</sup>,通过结合自由能、反应自由能的计算,可以探讨大分子受体与小分子配体间的相互作用机理,深入研究反应过渡态,这些都可以为药物设计提供有意义的指导。总之,理论计算和实验研究的结合,可以在降低实验研究成本的同时,也缩短抑制剂分子设计所需要的周期。

### 1.3 锌酶计算模拟的挑战

#### 1.3.1 用于研究锌酶反应机理的计算方法

理论上,计算模拟可以在原子甚至电子水平上研究酶催化反应,它能够直接获得大量的与酶催化反应相关的信息,从而对于理解过渡态的性质以及抑制剂分子的设计都有重要指导意义。对于生物酶体系的理论模拟,计算上存在的一个主要挑战在于:要对反应进行合理的描述,需要在分子水平上考虑电子、原子核及蛋白质骨架的运动和不同结构层次的相互作用。然而,酶分子是一个庞大的分子体系,完全用纯量化计算其成本往往是无法承受的。虽然簇模型方法在对一些锌酶体系化学反应过程的研究

中取得了成功实例<sup>[28,29]</sup>,然而这种完全忽略或者近似考虑蛋白环境的简化计算模型,毕竟无法直接和真实地考虑到蛋白环境的极化效应和熵效应,在很多时候这种近似可能会带来问题。

目前,用于处理生物大分子体系比较可靠和可行的理论方法之一即是采用量子力学/分子力学(QM/MM)组合方法。在QM/MM组合方法中,反应活性部分(一般为酶的活性中心),用量子力学(QM)方法来处理,而余下的部分则采用分子力学(MM)来处理。整个体系的能量形式由式1所示的三部分组成。

$$E_{\text{total}} = E_{\text{QM}} + E_{\text{QM/MM}} + E_{\text{MM}} \quad (1)$$

其中 $E_{\text{QM}}$ 和 $E_{\text{MM}}$ 分别为QM区域和MM区域的能量。 $E_{\text{QM/MM}}$ 则是代表QM和MM这两个区域间的相互作用能。 $E_{\text{QM/MM}}$ 是QM/MM方法中最核心的作用项,一般包括成键相互作用、静电相互作用以及范德华相互作用三项。由于QM/MM方法吸取了量子力学方法能够描述电子结构和分子力学方法计算代价相对低廉的优势,在最近十几年的时间内,QM/MM方法取得了快速的发展,并越来越广泛地应用于生物大分子体系的研究,成为研究生物大分子体系,特别是大分子-小分子相互作用最为强大而有效的计算模拟工具之一<sup>[30-33]</sup>。

为了合理描述一个大分子体系的动力学性质,往往要考虑不同结构组态的贡献。因此,借助分子动力学模拟(MD),结合热力学、动力学理论,从而获得反应、键合相关的自由能信息,对于探索酶反应机理以及其他相关特征是十分重要的。由于金属酶体系结构复杂,特别是含过渡金属离子的酶体系,具有复杂的电子结构,可靠的理论计算面临许多挑战。因此,就当前的计算能力而言,同时考虑到计算的准确性和计算花费,在密度泛函(DFT)水平对锌酶体系开展QM(DFT)/MM MD模拟研究是可行的,也是比较可靠的<sup>[19,34-36]</sup>。实际应用中,为了能够承受更长时间尺度的模拟,以及为了在QM区域能考虑更多重要残基(即较大的QM计算区域),基于改进的、优化的半经验方法的QM/MM分子动力学模拟亦被广泛使用<sup>[37-41]</sup>。

#### 1.3.2 用于描述锌酶体系的分子力场方法

尽管QM(DFT)/MM MD模拟已经成功应用于一些锌酶体系的研究,在皮秒尺度揭示了锌配位结构的柔性可变特征,探讨了不同外界蛋白环境下具有同样的第一配位层配体环境的锌酶在锌配位结构上的差异<sup>[19,34]</sup>。然而要研究诸如锌蛋白的折叠、蛋

白片段局域构象的变化、锌酶的底物结合与产物释放等发生在更长时间尺度下的生物物理与生物化学行为,就当前的计算能力而言,QM/MM MD 模拟特别是在 DFT 水平下的 QM/MM 计算所需要的成本是无法承受的。

相对来说,计算代价更为低廉的分子力学方法就更能发挥所长。然而,不幸的是当前比较通用的大分子力场诸如 AMBER、CHARMM、GROMACS 等都不能正确地描述锌配位结构。对于原本是低配位数(4,5)的锌配位结构往往得到高配位数(6),而且往往高估带负电荷较高的配体与锌的配位相互作用,而低估中性配体诸如组氨酸残基(His)与锌的配位作用,特别地,对于带负电荷的 Asp、Glu 残基的单、双配位模式更是描述不好,与锌配位的水分子数目也经常不对。所以,发展或者改进锌酶力场,在锌酶的计算模拟中具有迫切的实际需求和重要的应用价值(在 2.2 节将进一步具体阐述)。

## 2 锌酶计算研究进展

### 2.1 锌酶的 QM/MM 研究

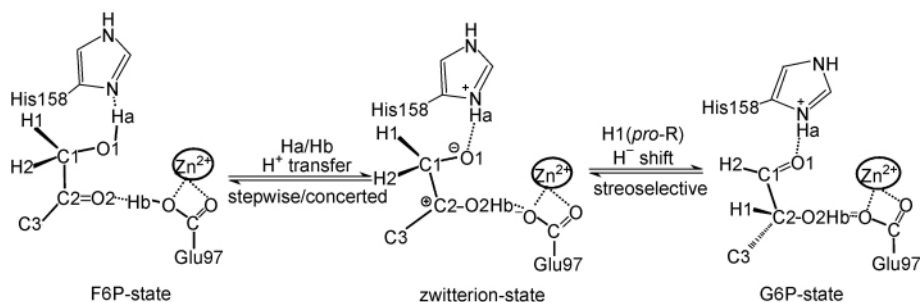


图 1 对 *pfPGI* 建议的可能的两性离子中间体反应机制<sup>[39]</sup>

Fig. 1 A possible zwitterionic intermediate-based mechanism proposed for *pfPGI*<sup>[39]</sup>

Wu 等<sup>[38]</sup>进一步通过对鼠李糖异构酶(*P. stutzeri* L-RhI)催化醛糖-酮糖互变异构过程的计算模拟,探讨了两性离子中间体机制的普适性。QM/MM MD 计算表明,残基 Asp327 和 Lys221 作为广义酸碱启动了酶反应中两性离子中间体的形成。对于底物 L-鼠李糖和 D-阿洛糖,预测的决速步能垒分别为 8.9 和 13.6 kcal/mol,这与实验观测到的相对活性一致。分子动力学模拟还进一步揭示: Zn1(结构位锌)周围第一配位层的细微差别以及底物 4、5、6-位周围氢键网络的差异与 5 种底物的相对活性密切相关,但整体来说,*P. stutzeri* L-RhI 对底物的选择性较宽,能有效催化 L-鼠李糖和 L-鼠李树胶糖、L-甘露糖

### 2.1.1 醛糖-酮糖异构化反应机理

磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerases, PGIs)能够催化 D-葡萄糖-6-磷酸(D-glucose-6-phosphate, G6P)与 D-果糖-6-磷酸(D-fructose-6-phosphate, F6P)之间的可逆互变异构。关于 PGIs 催化醛糖-酮糖异构化的反应机制一直存在争议,通过对 *pfPGI* 催化酮糖-醛糖相互转化过程的 QM/MM 计算模拟, Wu 等<sup>[39]</sup>提出了一个基于两性离子(zwitterion)中间体的两步催化反应机制,如图 1 所示。计算揭示从 C1 到 C2 位的负氢转移(第二步)是整个异构化过程的决速步骤。整个反应不仅在反应热力学、动力学上合理,而且还进一步证实了负氢转移过程具有立体选择性, *pro-R* 形式的氢(H1)具有明显更高的活性。这与实验上观察到 F6P 分子上的 *pro-R* 型 H 具有更高的异构化活性是相吻合的。并且,基于这样一个两性离子中间体,也能合理地解释实验上观察到的底物与水之间的氢交换现象。此外,通过残基突变计算分析,探明了 Glu97、His158 和 Tyr152 等保守残基在酶催化过程中扮演的重要角色。

和 L-果糖、L-来苏糖和 L-木酮糖、D-核糖和 D-核酮糖、以及 D-阿洛糖和 D-阿洛酮糖的互变异构。

### 2.1.2 组蛋白脱乙酰酶水解机制

蛋白质中赖氨酸的乙酰化状态是一个至关重要的调节器,与众多复杂的细胞过程紧密相连。组蛋白的乙酰化状态跟转录抑制(transcriptional repression)以及基因沉默(gene silencing)更是息息相关。调控其乙酰化状态的酶主要由组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferases)和组蛋白脱乙酰酶(HDACs)来完成。HDACs 又被分成四类共计 18 个亚型(isoform),其中 11 个亚型都是要依赖锌配位催化活性中心<sup>[42]</sup>。

实验上, HDAC8 的结构是表征得最清楚的 HDACs 亚型, 对于 HDAC8 的催化反应机理, 争议最大的是在 His142 和 His143 这两个保守残基的质子化状态。Wu 等<sup>[35]</sup> 通过对三个模型结构的 QM (DFT) /MM MD 比较研究, 发现唯有两个组氨酸都采用  $\delta$  位单质子化方式时, 锌的配位结构以及周围氢键网络才比较合理。并且基于这样一个较为合理的反应初始态, 提出了一个所谓的“质子穿梭 (proton-shuttle)”的两步催化反应机理, 如图 2 所

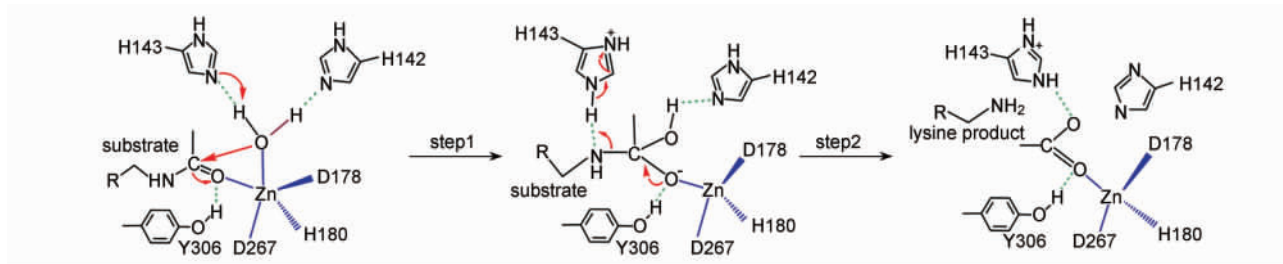


图 2 HDAC8 可能的质子穿梭反应机制<sup>[35]</sup>

Fig. 2 A possible proton-shuttle mechanism proposed for HDAC8<sup>[35]</sup>

在 HDAC8 中离  $Zn^{2+}$  大约  $7\text{\AA}$  的位置有一个六配位的  $K^+$ , 有趣的是, 这个钾离子不仅仅存在于 HDAC8 中, 还存在于 HDACs 的 I、II 两大类酶所有的亚型中。而实验上有关它的结构与功能方面的探讨极少, 对于它是否影响脱乙酰催化反应更是没有相关的实验及理论研究。通过 QM/MM MD 计算发现, 相比之下在有  $K^+$  的情况下, HDAC8 周围的蛋白环境能够更好的稳定过渡态。而且由于  $K^+$  的存在, His143 残基  $N^{\delta}$  上的负电荷将变大, 这使得 His143 的碱性增强, 与此同时,  $Zn^{2+}$  上更高的正电荷也使得  $Zn^{2+}$  束缚水分子的酸性增加, 这对于第一步反应(亲核进攻)是很有利的, 计算结果表明  $K^+$  的存在, 可以降低  $\sim 4\text{ kcal/mol}$  的反应能垒<sup>[35]</sup>。

### 2.1.3 锌配位结构的特征

锌配位结构有一个重要特征就是它的易变性 (flexibility), 即使在同样的配体环境下, 它也可能采取多种配位结构模式。如图 3 所示, Wu 等<sup>[19]</sup> 通过对嗜热菌蛋白酶 (TLN) 在 DFT 水平下的 QM/MM MD 模拟观察到, 对于 apo-态的 TLN (模型 TLNa), 计算不仅能重现晶体结构中观察到的六配位结构, 而且揭示锌配位结构呈现出可变的动态特征: Glu166 与  $Zn^{2+}$  之间的配位时而为单配位, 时而为双配位, 从而导致总配位数在 5、6 之间变化。而对于抑制剂-酶体系的 TLNb 模型, 计算模拟显示它的锌配位结构是较为稳定的四配位形式。此外, 在对

示。计算得到的速率决定步骤(第一步)的反应自由能垒为  $18.3 \pm 0.4\text{ kcal/mol}$ , 与实验测得的反应速率常数  $k_{\text{cat}} = 0.90 \pm 0.03\text{ s}^{-1}$  (亦即  $17.7\text{ kcal/mol}$ ) 相当。计算表明, His143 首先作为广义碱吸收与  $Zn^{2+}$  配位的水上的质子, 然后扮演广义酸的角色又将这个质子转给底物。因此, His143 承担着一个载体的角色, 将质子从较远的水分子上转移到了底物酰氨键的 N 原子上。

TLN 其他模型的模拟中, 也观察到了锌配位结构易变的动态特性, 甚至比 TLNa 体系还要明显。TLN 酶体系不同锌配位模式的共同之处在于其动态可变的属性是来源于配体 Glu166, 它能发生单齿、双齿配位模式的改变。从图 3 可以看出, 这种配位模式的改变是相当迅速的, 能够在皮秒范围内观察到。

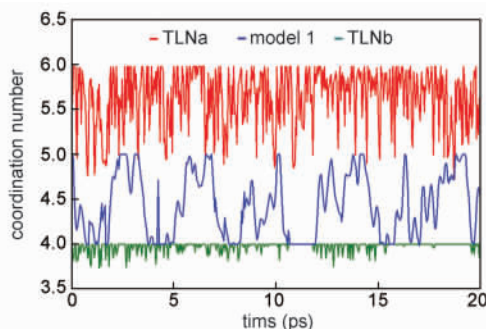


图 3 QM/MM MD 模拟观察到不同锌配位结构其配位数的演变<sup>[19]</sup>

Fig. 3 The coordination number change in the selected zinc enzyme models during the DFT QM/MM MD simulations<sup>[19]</sup>

进一步比较研究则发现, 对于 HDAC8-底物复合物体系, 无论是测定的晶体结构还是 QM/MM MD 模拟的结果都观察到, Asp178 以及 Asp267 上的羧基与  $Zn^{2+}$  的配位一直维持在单齿配位模式, 而没有出现双齿配位的情况。然而, HDAC8 体系锌的配位结构也表现出一定的易变性, 如图 3 中 model 1 所



示,它的配位数在 4—5 之间变化,但其锌配位的动态性质主要来自于水与  $Zn^{2+}$  之间的配位。类似的现象在 HDAC8-抑制剂复合物中也被观察到,SAHA 抑制剂分子与 Zn 的配位不及其他正常的氨基酸的配位强。不过整体上来说,相对于 TLN 中 Glu166 的快速单双齿配体交换,HDAC8 中 Zn 与非氨基酸小分子间配位作用的变化则相对要更缓慢一些。

最近, Wu 等<sup>[34]</sup>对比研究了 HDACs 家族中的 HDAC8、HDAC7 和 HDAC4 三个亚型, QM/MM 分子动力学模拟研究观察到了非常有意思的现象,虽然它们三者中的锌具有完全一致的第一配位层,但锌与同一抑制剂分子 SAHA 的配位方式却各不相同,分别呈现为双齿配位、单齿配位以及弱配位,如图 4 所示,且与实验晶体结构吻合。计算进一步显示, SAHA 分子应该是以质子化的中性分子形式与活性中心锌离子结合,而且 QM (DFT) /MM MD 模拟还进一步解释了同一 SAHA 配体在三个亚型中采取不同配位模式的原因。计算模拟结果表明,保守残基 Y306 的存在与否的确会对锌配位有影响,但影响很微小。然而活性口袋边沿上两个保守的苯丙氨酸残基则影响更大,在 HDAC8 中苯丙氨酸的这两个苯环以一种“类-三明治”的结构形式存在,而在 HDAC7 以及 HDAC4 当中,两个保守苯丙氨酸残基不采用这种构象(见图 4),这两个苯环结构就起到了重要的“门控”作用,使得 HDAC7 以及 HDAC4 活性口袋内的水分子比 HDAC8 要多得多,水分子的增多将增加介电常数,使得极化效应增强,并且导致 SAHA 分子与周围残基的氢键相互作用也有少许差异,最终导致了 HDAC8、HDAC7 和 HDAC4 活性中心锌的配位结合能力有所不同。这一解释推翻了在先前的理论计算中<sup>[43]</sup>提出并在后续的实验研究中<sup>[44]</sup>已经被广泛接受的观点,即 SAHA 在 HDAC8 中以去质子化状态与锌离子双配位,而在 HDAC7 或 HDAC4 中以中性分子状态与锌单配位,配位差异主要来源于保守残基 Y306 的存在与否。

#### 2.1.4 锌蛋白-抑制剂分子相互作用能的计算

抑制剂分子与锌离子间结合自由能的评估对于抑制剂分子设计特别是有选择性的抑制剂分子的设计有重要意义。诸如比较一系列潜在抑制剂分子与锌蛋白结合的自由能信息,对于药物设计中小分子筛选有巨大帮助<sup>[45]</sup>。目前用于计算这种大分子受体与小分子配体间的结合能的方法大致有 3 种。一种是通过自由能微扰或者热力学积分方法,原理上可以得到比较精确的键合自由能数据,然而这种方

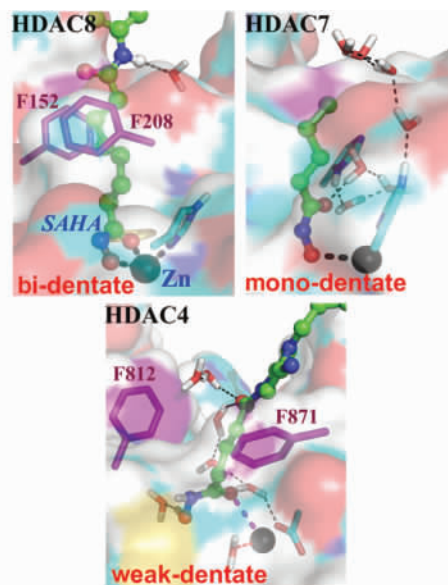


图 4 HDAC8、HDAC7 与 HDAC4 中活性口袋的比较<sup>[34]</sup>

Fig. 4 Comparison of the binding pockets in HDAC8, HDAC7 and HDAC4<sup>[34]</sup>

法需要花费大量的时间对蛋白大分子进行构象采集,因而限制了它的某些应用范围。第二种方法,也是最快速、目前应用最多的方法是分子对接 (Docking) 技术,它往往是基于分子力场通过所谓打分函数亦即势能函数来评估结合能的大小。然而这种方法的局限在于,它得到的不是结合自由能而是相对能量,而且对于金属蛋白,比如锌酶,其配位模式比较复杂多样时,一方面力场本身就评估不好这种配位结构,另一方面即使配位结构能够正确获得,往往计算得到的能量数据也过于粗糙而可信度不高。第三种是 QM/MM Docking 方法。在传统的 Docking 方法中,其使用的电荷是固定不变的,这种近似对于非金属蛋白有时还合理。但对于锌蛋白体系,由于金属离子上所带电荷较高,所以对蛋白环境与抑制剂分子间的相互诱导、极化效应加以考虑就显得十分必要。

QM/MM Docking 方法则可以将锌离子、锌配位结构涉及的相关配体以及抑制剂分子包括在 QM 区域处理,从而得到考虑了蛋白环境与小分子配体间相互极化诱导后的电荷信息。比如最近对于 MMPs 的研究<sup>[26,46]</sup>就成功比较了一系列小分子配体与锌配位结合作用能的大小,能够与实验上测定的抑制剂分子选择性大小情况基本吻合。当然,如果要进一步考虑到键合自由能,就需要对大分子构象进行大量的采样, QM/MM MD 模拟的采样效率往往还不足以满足这方面的需求。目前一些变通做法是使用

MM-PBSA 或者 MM-GBSA 技术并结合 QM/MM 方法来计算能量,应用线性响应(linear response)方法将 QM/MM 方法评估得到的相互作用能与 MM-PBSA 或者 MM-GBSA 方法计算得到的溶剂可及性表面积(solvent accessible surface areas, SASA)组合得到能量差来评估结合自由能<sup>[47, 48]</sup>,如公式 2 所示。这种将 Docking, QM/MM, 以及 MD 方法捆绑起来的评估方法用以评估金属酶与小分子配体间相互作用能已经取得了一些成功的应用实例,不过这种方法中各能量项前的系数需要参数化,因而可能会带来方法的移植性问题。

$$\Delta G = \alpha \times \Delta \langle E_{QM} + E_{QM/MM} \rangle + \gamma \times \Delta \langle SASA \rangle \quad (2)$$

### 2.1.5 其他方面的一些应用研究

应用 QM/MM 方法研究锌酶体系反应机理的成功实例还有很多,诸如嗜热菌蛋白酶<sup>[36, 49]</sup>、磷酸三酯酶<sup>[37]</sup>、磷酸二酯酶<sup>[50, 51]</sup>、碱性磷酸酶<sup>[52]</sup>、羧肽酶<sup>[53, 54]</sup>、蛋白水解气单胞菌氨肽酶<sup>[55]</sup>等也是依赖锌作为催化中心的水解酶体系。特别是对于一些参与磷酸酯化的酶,其催化中心含有两个甚至三个锌离子,使得它们的配位结构更为复杂,QM 区域需要处理的原子更多。由于在 DFT 水平下的计算花费大,而半经验水平下的 QM/MM 计算又不能合理描述这样复杂的锌配位结构,所以在 QM/MM 计算中往往需要对半经验方法进行改进或者参数优化,这就带来方法移植性可能不好的问题。此外,目前对于法尼基转移酶<sup>[41]</sup>、碳酸酐酶<sup>[41, 57]</sup>、内酰胺酶<sup>[58]</sup>、肽脱甲酰基酶<sup>[59]</sup>、胞嘧啶脱氨酶<sup>[60]</sup>等体系开展 QM/MM 计算来研究反应机理相关问题的实例也不少,在此不一一赘述。

此外,由于水分子与催化中心锌离子配位是常见到的一种配位模式,此时的锌可以起到 Lewis 碱的作用,通过极化效应增强了与之键合的水分子的解离能力,这就可能导致水分子既可能以中性分子形式也可以采取羟基离子(OH<sup>-</sup>)形式与锌进行配位,因此,应用 QM/MM 方法来评估 Zn 配位结构周围的 pKa 环境,对锌酶的研究也有重要意义。Cui 的课题组<sup>[61]</sup>在这方面已经做了大量的工作,它们在 SCC-DFTB/MM-GSBP 水平下应用热力学积分的方法准确计算了碳酸酐酶中与锌键合的水在微观环境下的 pKa 值,与实验值相当吻合。

另外,在锌蛋白结构解析过程中要对 X 射线谱得到的原子上的电子密度进行解析,然后往往要对晶体结构进行传统的基于力场方法的精炼

(refining),这样得到的中心金属锌离子周围的配位结构往往不是很合理。这是由于测定能达到的分辨率以及测定方法本身所能考虑到的构象有所导致的。而这种不完整或者不正确的结构信息就容易导致对于生物大分子结构与功能关系的错误理解。而且也会给基于这样不合理的初始结构而开展的计算带来麻烦。最近 Merz 等<sup>[62]</sup>基于已经解析得到的一些锌蛋白晶体结构,引入 QM/MM 方法来代替传统的基于力场的结构精炼方法,使得锌配位结构特别是 Zn-S 配位距离得到了较大改进。并且这种所谓的 QM/MM X-ray refinement 方法也减小了对于权重系数的依赖性,展现出较好的方法移植性。

## 2.2 锌酶力场的发展

### 2.2.1 成键模型与非键模型

分子力场方法对锌配位结构的描述有两类模型:成键模型与非键模型。

$$E = \sum_{\text{bonds } j} \frac{1}{2} k_i^{b*} (r_i - r_i^0)^2 + \sum_{\text{angles } j} \frac{1}{2} k_i^{a*} (\theta_i - \theta_i^0)^2 + \sum_{\text{torsions } j} k_i^{\phi*} [1 + \cos(n_i \phi_i - \delta_i)] + E_{\text{non-bond}} \quad (3)$$

在成键模型(bonded model)<sup>[63-65]</sup>中,如式 3 所示,能量公式中显含了键长、键角、二面角等相互作用项,因此这种方法会阻止各种配位模式间的互变以及配体间的交换,由于在某些锌蛋白中锌的配位数是可变的,成键模型这时就不再适合,而且这种方法的参数移植性不好。

$$E = E_{\text{es}} + E_{\text{vdW}} \quad (4)$$

$$E_{\text{es}} = \sum_{ij}^N \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

$$E_{\text{vdW(LJ-12-6)}} = \sum \varepsilon_{ij} \left\{ \left( \frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^6 \right\} \quad (5)$$

在非键模型(non-bonded model)<sup>[66]</sup>中,如式 4 所示,锌与配体间相互作用能仅由静电和范德华两项组成。其中静电就是简单处理为经典的 Coulomb 形式,锌上电荷固定为 +2,而范德华则往往采用 Lennard-Jones 12-6 形式,Stote 等<sup>[66]</sup>提出的锌的范德华参数被广泛使用。但众所周知,它的主要问题是对于描述低配位(4, 5)的情况并不好,其往往导致与 XRD 晶体结构截然不同的配位状态<sup>[67]</sup>。

### 2.2.2 非极化力场框架下锌酶力场的改进

在成键模型基础上,一些学者对锌酶分子力场进行了改进。由 Pang 提出的 semi-bonded 模型<sup>[68]</sup>,

是在 Zn 的周围加上一些虚拟的分数电荷来模仿其价电子,不过这一方法只测试过四配位的情况,对高配位的结构并不清楚。而最近由 Merz 等<sup>[69]</sup>提出的 ZAFF 力场,以及 Wang 等<sup>[70]</sup>发展的力场方法,都是基于四配位的锌配位结构,也只测试过锌四配位的情况。

在非键模型框架下, Lim 等<sup>[71]</sup>提出一种有别于传统非键模型的能量形式来描述锌与配位原子间的相互作用,电荷转移和局域极化效应被经验化地考虑到总的能量形式中去。金属锌以及配位原子上的电荷不再是固定不变,通过一个依赖于 Zn 与配位原子间距离大小的简单公式来重新分配锌与配位原子上的电荷。分子动力学模拟发现,这种简单的模型即能大大改进含 S 较多的四配位锌配位结构的描述,不过对高配位数锌配位结构的描述情况尚不可知。

最近, Wu 等<sup>[72]</sup>通过设计一个短程长程有效函数(short-long effective function, SLEF)代替传统的 Coulomb 函数来描述所有其他原子和锌离子之间的静电相互作用,并重新拟合锌的范德华参数,而不改变任何其他相互作用能的形式。短程有效函数用来描述锌离子及其配体间配位相互作用,而长程有效函数则让其表现为与  $1/r$  形式相似。以 QM/MM MD 的结果为参考,基于力匹配(force matching)的方法优化得到相关参数,提出了 Amber99SB-SLEF1 力场。通过对配位数为 4、5、6 的几个锌酶体系进行的初步分子动力学模拟测试,发现大多情况下可以维持原本在晶体结构中呈现的配位结构, SLEF 力场在一定程度上改善了对锌配位结构的描述而且表现出不错的可迁性,但此模型还有进一步的改进空间,对某些体系诸如双锌酶仍然处理不好。

### 2.2.3 针对锌的极化力场的发展

Piquemal 等<sup>[73]</sup>发展了 AMOEBA 极化力场用来模拟二价锌离子在水溶液下的行为。不仅能得到与量子化学计算可比的配位结构,而且在热力学数据上也大大改进。Zhang 等<sup>[20]</sup>应用 APPC (adaptive polarized protein-specific charge) 模型近似考虑了一个双锌配位体系的电荷转移与极化效应,不仅得到正确的配位数,还在分子动力学模拟过程中观察到了与锌配位的水在锌的第一配位层内的快速进出运动(in-and-out motion)。然而极化力场的计算代价要昂贵不少,目前的极化力场大多还只能用于一些小分子体系的研究。

总之,现有通用的大分子力场对锌蛋白结构的

描述往往都不好,为了改善对锌配位结构的描述,上述各种做法的本质其实都是为了尽可能地正确评估锌与周围分子特别是配体分子间的极化、电荷转移等相互作用,从而提高力场的准确性、可移植性和普适性。

## 3 展望

虽然本文总结了近期应用 QM/MM 组合方法在锌酶研究中取得成功的一些实例,但因 QM/MM 方法本身的某些特点以及锌酶体系的复杂性,也使得有些更为复杂的生物物理、生物化学问题的探索仍然无法深入。由于 ab initio QM/MM MD 模拟所能承受的时间尺度短,所以在过去十年里采用的 QM/MM 分子动力学模拟主要都是在半经验水平下进行的。虽然 QM 采用半经验方法处理时可以达到几百皮秒甚至纳秒级别的分子动力学模拟,但毕竟半经验方法对锌配位结构描述的可信度有待确定,热力学性质计算也往往偏差较大,即使通过参数优化改进了计算结果,也会带来方法、参数可移植性的问题。如今随着计算能力的提高,特别是 GPU 计算技术已经渐渐获得实际应用和推广,相信在不久的将来,对于锌酶体系的模拟,基于从头算,特别是在 DFT 水平下的 QM/MM 分子动力学模拟将渐渐占据主导地位。

此外,随着 QM/MM 方法的广泛应用,其方法本身的发展也非常重要。但在进入新世纪以后鲜有进一步的重大突破,现在遇到的一些瓶颈问题若能解决必然能带来新的应用方面的突破。比如如何考虑 QM/MM 交界处两个区域间的电荷转移,特别是对于 QM 区域带有较多的电荷时、或带较高电荷的金属离子距离 MM 边界比较近时,显然这种 QM 区与 MM 区之间的电荷转移是不可忽视的现象。再比如目前的方法中 QM 区域的选择一旦确定后就无法在同一计算中根据结构的调整自动更新 QM 区域的定义,这就会导致在 MD 模拟的过程中如果原本在 MM 区域的分子/离子进入了 QM 结构区域并且可能起重大的电子结构方面贡献的时候却无法重新被定义到 QM 区域去,这在现实中特别是对于小分子配体诸如水来说是很可能会发生的。但对于目前的绝大多数的 QM/MM 方法来说,这种在 QM 与 MM 区域之间分数电荷的转移或者小分子交换的情况还是无法正确处理的,有时通过加大 QM 区域能回避这些问题,但一味通过加大 QM 区原子数将大大增加计算量而变得不可行。在这些前沿充满挑战的领



域,目前也有相关的一些想法被提出来,比如“open-boundary”和“flexible-boundary”边界处理方式的提出就是为了考虑QM与MM区域间电荷转移的问题<sup>[74-76]</sup>,比如建议在QM与MM区域间增加诸如“buffer region”或者“switching shell”,即是为了试图处理小分子在QM与MM间动态交换的问题<sup>[77]</sup>。但这些方面的进展似乎都比较缓慢,目前来看并没有形成一个被广泛采用的模型。

而在锌酶力场发展方面,尽管锌酶力场的开发得到了重视,也已经开展了不少工作,并且极化力场又是目前计算化学领域的研究热点之一,但是目前极化力场,特别对于金属的极化力场方面的发展还处于很初级的阶段。而且极化力场相比非极化力场的计算代价往往也会昂贵不少,要用它来对一些生物大分子体系做长时间尺度(纳秒/微秒)的模拟研究还是不切实际的<sup>[78,79]</sup>。总体来说,要将极化力场真正应用到实际的生物大分子体系还有很长一段路要走。因此,在现有的非极化力场的框架下改进力场对锌配位结构的描述,试图改善相关的热力学性质的计算结果,仍然具有非常重要的意义,在很长一段时间内也仍然还会是主流。

总之,随着QM/MM方法本身的进一步发展完善,以及锌酶力场的进一步开发,计算模拟将不再仅仅局限于反应机理、结构确定、功能分析这些用以认知锌酶大分子本身的理论研究和基础研究,它们将在创新药物分子设计、人工酶合成等前沿应用研究领域也会发挥越来越重要的作用。此外,组合各种理论模拟工具,开展锌酶体系的多尺度计算模拟,仍将是当前以及未来锌酶计算模拟领域的重要探索方向之一,并且计算模拟在锌酶研究中将扮演更加重要的角色,对实验探索也将具有越来越重要的互补与促进作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. *J. Proteome Res.*, 2006, 5: 196—201
- [2] Auld D S. *Biomaterials*, 2001, 14: 271—313
- [3] Anzellotti A I, Farrell N P. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37: 1629—1651
- [4] Parkin G. *Chem. Rev.*, 2004, 104: 699—767
- [5] Maret W, Li Y. *Chem. Rev.*, 2009, 109: 4682—4707
- [6] Shankar S, Srivastava R K. *Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy*, 2008, 615: 261—298
- [7] Mueller S, Kraemer O H. *Curr. Cancer Drug Tar.*, 2010, 10: 210—228
- [8] Li X, Wu J F. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2010, 5: 109—141
- [9] Bourboulia D, Stetler-Stevenson W G. *Seminars in Cancer Biology*, 2010, 20: 161—168
- [10] Ropero S, Esteller M. *Molecular Oncology*, 2007, 1: 19—25
- [11] Parkin G. *Chem. Comm.*, 2000, 1971—1985
- [12] Yi L, Yeung N, Sieracki N, Marshall N M. *Nature*, 2009, 855—862
- [13] Bock C W, Katz A K, Glusker J P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117: 3754—3763
- [14] Sigel H, Martin R B. *Chem. Soc. Rev.*, 1994, 23: 83—91
- [15] Cook J D, Penner-Hahn J E, Stemmler T L. *Methods in Nano Cell Biology*, 2008, 90: 199—216
- [16] Somoza J R, Skene R J, Katz B A, Mol C, Ho J D, Jennings A J, Luong C, Arvai A, Buggy J J, Chi E, Tang J, Sang B C, Verner E, Wynands R, Leahy E M, Dougan D R, Snell G, Navre M, Knuth M W, Swanson R V, McRee D E, Tari L W. *Structure*, 2004, 12: 1325—1334
- [17] Schuetz A, Min J, Allali-Hassani A, Schapira M, Shuen M, Loppnau P, Mazitschek R, Kwiatkowski N P, Lewis T A, Maglathin R L, McLean T H, Bochkarev A, Plotnikov A N, Vedadi M, Arrowsmith C H. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 11355—11363
- [18] Bottomley M J, Lo Surdo P, di Giovine P, Cirillo A, Scarpelli R, Ferrigno F, Jones P, Neddermann P, de Francesco R, Steinkuhler C, Gallinari P, Carfi A. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 26694—26704
- [19] Wu R B, Hu P, Wang S L, Cao Z X, Zhang Y K. *J. Chem. Theory Comput.*, 2010, 6: 337—343
- [20] Li Y L, Mei Y, Zhang D W, Xie D Q, Zhang J Z H. *J. Phys. Chem. B*, 2011, 115: 10154—10162
- [21] Lipton A S, Heck R W, Staeheli G R, Valiev M, de Jong W A, Ellis P D. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 6224—6230
- [22] Ressalan S, Iyer C S P. *Rev. Anal. Chem.*, 2004, 23: 159—232
- [23] Tamames B, Sousa S F, Tamames J, Fernandes P A, Ramos M J. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, 2007, 69: 466—475
- [24] Ramos M J, Fernandes P A. *Accounts Chem. Res.*, 2008, 41: 689—698
- [25] Kraut D A, Carroll K S, Herschlag D. *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, 72: 517—571
- [26] Khandelwal A, Lukacova V, Comez D, Kroll D M, Raha S, Balaz S. *J. Med. Chem.*, 2005, 48: 5437—5447
- [27] Irwin J J, Raushel F M, Shoichet B K. *Biochemistry*, 2005, 44: 12316—12328
- [28] Gao H, Ke Z, De Yonker N J, Wang J, Xu H, Mao Z W, Phillips D L, Zhao C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133: 2904—2915
- [29] Himo F. *Theor. Chem. Acc.*, 2006, 116: 232—240
- [30] Senn H M, Thiel W. *Angew. Chem.*, 2009, 48: 1198—1229
- [31] Hu H, Yang W T. *J. Mol. Struct-Theochem*, 2009, 898: 17—30
- [32] Acevedo O, Jorgensen W L. *Acc. Chem. Res.*, 2010, 43:

- 142—151
- [33] Ranaghan K E, Mulholland A. J. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 2010, 29: 65—133
- [34] Wu R, Lu Z, Cao Z, Zhang Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133: 6110—6113
- [35] Wu R, Wang S, Zhou N, Cao Z, Zhang Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132: 9471—9479
- [36] Blumberger J, Lamoureux G, Klein M L. *J. Chem. Theory Comput.*, 2007, 3: 1837—1850
- [37] Zhang X, Wu R, Song L, Lin Y, Lin M, Cao Z, Wu W, Mo Y. *J. Comput. Chem.*, 2009, 30: 2388—2401
- [38] Wu R, Xie H, Mo Y, Cao Z. *J. Phys. Chem. A*, 2009, 113: 11595—11603
- [39] Wu R, Xie H, Cao Z, Mo Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 7022—7031
- [40] Wong K Y, Gao J. *Biochemistry*, 2007, 46: 13352—13369
- [41] Riccardi D, Yang S, Cui Q. *BBA-Proteins and Proteomics*, 2010, 1804: 342—351
- [42] Yang X J, Seto E. *Oncogene*, 2007, 26: 5310—5318
- [43] Wang D F, Helquist P, Wiest O. *J. Org. Chem.*, 2007, 72: 5446—5449
- [44] Bradner J E, West N, Grachan M L, Greenberg E F, Haggarty S J, Warnow T, Mazitschek R. *Nat. Chem. Biol.*, 2010, 6: 238—243
- [45] Menikarachchi L C, Gascon J A. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2010, 10: 46—54
- [46] Cho A E, Rinaldo D. *J. Comput. Chem.*, 2009, 30: 2609—2616
- [47] Khandelwal A, Balaz S. *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, 2007, 21: 131—137
- [48] Khandelwal A, Balaz S. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, 2007, 69: 326—339
- [49] Lamoureux G, Blumberger J, Klein M L. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2006, 232: 256—256
- [50] Wong K Y, Gao J. *Febs Journal*, 2011, 278: 2579—2595
- [51] Xiong Y, Lu H T, Zhan C G. *J. Comput. Chem.*, 2008, 29: 1259—1267
- [52] Lopez-Canut V, Roca M, Bertran J, Moliner V, Tunon I. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133: 12050—12062
- [53] Klusak V, Barinka C, Plechanovova A, Mlcochova P, Konvalinka J, Rulisek L, Lubkowski J. *Biochemistry*, 2009, 48: 4126—4138
- [54] Szeto M W Y, Mujika J I, Zurek J, Mulholland A J, Harvey J N. *J. Mol. Struct-Theochem*, 2009, 898: 106—114
- [55] Schurer G, Lanig H, Clark T. *Biochemistry*, 2004, 43: 5414—5427
- [56] Ho M H, de Vivo M, dal Peraro M, Klein M L. *J. Chem. Theory Comput.*, 2009, 5: 1657—1666
- [57] Riccardi D, Koenig P, Guo H, Cui Q. *Biochemistry*, 2008, 47: 2369—2378
- [58] Wu S S, Xu D G, Guo H. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132: 17986—17988
- [59] Xiao C, Zhang Y. *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111: 6229—6235
- [60] Yao L, Yan H, Cukier R I. *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110: 26320—26326
- [61] Riccardi D, Cui Q. *J. Phys. Chem. A*, 2007, 111: 5703—5711
- [62] Li X, Hayik S A, Merz K M. *J. Inorg. Biochem.*, 2010, 104: 512—522
- [63] Hoops S C, Anderson K W, Merz K M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113: 8262—8270
- [64] Bredenberg J, Nilsson L. *Int. J. Quantum Chem.*, 2001, 83: 230—244
- [65] Li W, Zhang J, Wang J, Wang W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 892—900
- [66] Stote R H, Karplus M. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 1995, 23: 12—31
- [67] Zimmer M. *Coord. Chem. Rev.*, 2009, 253: 817—826
- [68] Pang Y P. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 2001, 45: 183—189
- [69] Peters M B, Yang Y, Wang B, Fuesti-Molnar L, Weaver M N, Merz K M. *J. Chem. Theory Comput.*, 2010, 6: 2935—2947
- [70] Lin F, Wang R. *J. Chem. Theory Comput.*, 2010, 6: 1852—1870
- [71] Sakharov D V, Lim C. *J. Comput. Chem.*, 2009, 30: 191—202
- [72] Wu R, Lu Z, Cao Z, Zhang Y. *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, 7: 433—443
- [73] Gresh N, Piquemal J P, Krauss M. *J. Comput. Chem.*, 2005, 26: 1113—1130
- [74] Zhang Y, Lin H. *Theor. Chem. Acc.*, 2010, 126: 315—322
- [75] Zhang Y, Lin H. *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, 4: 414—425
- [76] Pezeshki S, Lin H. *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, 7: 3625—3634
- [77] Kerdcharoen T, Morokuma K. *Chemical Physics Letters*, 2002, 355: 257—262
- [78] Warshel A, Kato M, Pislakov A V. *J. Chem. Theory Comput.*, 2007, 3: 2034—2045
- [79] Jorgensen W L. *J. Chem. Theory Comput.*, 2007, 3: 1877—1877