

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.003

分子动力学模拟 HPV(16, 18)E6 蛋白

张雯雯 康文渊 邹金晶 毕振飞 豆荣昆 茆灿泉[△]

(西南交通大学生命科学与工程学院 四川 成都 610031)

摘要 目的: 对人乳头瘤病毒 HPV16, 18 中 E6 蛋白结构进行分子模拟和分析, 寻找可以作为蛋白-配体相互作用的关键结构区域。**方法:** 以 HPV16 E6 蛋白为模板, 对 HPV18 E6 蛋白进行同源建模, 对构建的 HPV18 E6 模型以及晶体结构模型 HPV16 E6 进行分子动力学模拟, 通过微观上的 loop 环分析和宏观上的整体运动分析研究了 HPV18 E6 与 HPV16 E6 在溶剂环境下结构变化的异同。**结果:** 发现靠近 N 端 loop 环在蛋白-配体结合过程中能介导控制配体、水、离子进出的“门控”的作用, 解释了两个蛋白在水溶剂中的运动构象的变化。**结论:** 本研究解释了 HPV16 E6 与 HPV18 E6 两个蛋白在溶剂中的运动机制, 并发现了 loop 环在其中扮演“门控”的作用, 解释了两个蛋白在水溶剂中的运动构象的变化, 该发现能够为基于两个蛋白为靶点的药物设计提供理论依据。

关键词: HPV; E6 蛋白; 同源建模; 分子动力学模拟

中图分类号: R-33; Q75; R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)04-610-06

Molecular Dynamics Simulation of E6-protein in HPV Type 16, 18

ZHANG Wen-wen, KANG Wen-yuan, ZOU Jin-jing, BI Zhen-fei, DOU Rong-kun, MAO Can-quan[△]

(Southwest Jiao Tong University College of Life Science and Engineering, Chengdu, Sichuan, 610031, China)

ABSTRACT Objective: To search for the key regions used as protein-ligand interactions by simulating and analyzing the E6 protein structure of HPV16 and 18. **Methods:** The HPV16 E6 protein was used as a template for homology modeling of HPV18 E6 protein, the crystal structure model of HPV (18, 16) E6-protein was studied by molecular dynamics simulation. By analyzing the microscopic loop and the macroscopic motion, we study the similarities and differences of structural changes of HPV18 E6 and HPV16 E6 in aqueous solvents. **Results:** The results indicated loop in the N-terminal region played a role of “gatekeeper” that could mediate ligand, water and ion in the process of protein-ligand interactions and reveal the changes of the conformation of two proteins in aqueous solvents. **Conclusions:** The movement mechanisms of HPV18 E6 and HPV16 E6 in aqueous solvents, as well as the role of loop that acting as a “gatekeeper” were elucidated. Meanwhile, these simulation results interpret the changes of the conformation of two proteins in aqueous solvents and provide theoretical basis for drug design based on two proteins.

Key words: HPV; E6 protein; Homology modeling; Molecular dynamic

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q75; R37 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)04-610-06

前言

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一类约 8 kb 大小的闭环无包膜球形 DNA 病毒, 易感染人的表皮及黏膜细胞^[1]。高危型 HPV 病毒可诱发癌症, 其中以 HPV16 和 18 最甚, 为 90 %以上宫颈癌致癌原因^[2]。随着生物分子学、病理学、免疫学等技术的发展, HPV 疫苗的研发有长足的发展, 但高危型 HPV 感染病例仍然缺少广泛有效的治疗手段。

HPV-E6 蛋白在病毒增殖过程中是必不可少的, 并且能够使其逃避宿主细胞的免疫作用以及细胞凋亡^[3-5]。研究发现^[6,7], 通过进行 RNA 干扰、多肽配体以及黄酮类小分子等方式对 E6 蛋白活性抑制, 结果显示 p53 活性恢复从而诱导 HPV 呈阳性的癌细胞发生细胞凋亡。这些发现表明, E6 的抗凋亡潜能对于 HPV 阳性癌细胞的生存至关重要。同时, 也表明 E6 的功能性

抑制将是一个极具前景的治疗方案。

前人的研究大多关注于 HPV16 E6 的结构分析, 而对同样重要的 HPV18 E6 鲜有报道, 本文通过同源建模(homology modeling)技术, 构建合理的 HPV18 E6 结构, 采用分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟, 通过微观上的 loop 环分析和宏观上的整体运动分析研究了 HPV18 E6 与 HPV16 E6 在溶剂环境下结构变化的异同。为基于 HPV18 E6 结构为基础的药物筛选以及针对该蛋白为基础的药物设计提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HPV16 E6 与 HPV18 E6 蛋白质序列来自于 GenBank 数据库 (ID: AHK23256.1 和 AGU90423.1), HPV16 E6 晶体结构来自于 PDB 数据库(ID: 4XR8^[8])。

作者简介: 张雯雯(1990-), 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: hyacinthus1990@163.com

[△] 通讯作者: 茆灿泉(1965-), 博士生导师, 教授, 研究方向: 生物制药, E-mail: maocq@home.swjtu.edu.cn

(收稿日期: 2017-05-23 接受日期: 2017-06-18)

1.2 方法

1.2.1 同源建模 HPV18 E6 蛋白的晶体结构虽尚未解析,但因其与 HPV16 E6 的序列相似度高,且为同源蛋白,更且, Malecka KA^[9] 等人实验发现一系列对于 HPV E6 有抑制作用的化合物对于 HPV18 E6 同样有作用,说明两者在结合腔的大小和形状相似,故以 HPV16 E6 为蛋白模板,采用 Modeller9.16^[10] 以 HPV16 E6 作为模板对 HPV18 E6 进行同源建模,构建 100 个模型,使用 ERRAT2^[11] 进行评分,评分最高的蛋白被选择;对评分较差区域使用进行 loop 环优化,生成 10 个模型,同样 ERRAT2 评分最高的蛋白被选择,采用 Rosetta 进行能量最小化,最小化算法采用 lbfgs_armijo_nonmonotone,最小阈值设为 0.001,生成 10 个模型, Rosetta Score^[12] 得分最优的被选择。最后模型使用 ERRAT2 及拉氏图(Ramachandran Plot)^[13,14] 进行整体评估。

1.2.2 分子动力学模拟 对构建的 HPV18 E6 模型以及晶体结构模型 HPV16 E6 使用 GROMACS 分子模拟套件(版本 5.0.6)^[15] 进行分子动力学模拟,采用对蛋白较为友好的 Amber99SB-ILD^[16] 全原子力场,采用更加准确的 TIP3P 水模型,盒子设置为十二立方盒子,盒子最近处距离蛋白边缘的距离设置为 1.2 nm,通过加入氯原子以使得体系整体电荷成中性。对该体系进行能量最小化,方法为最陡梯度法。对能量最小化后的体系进行热浴(NVT, Number of particles, Volume, and Temperature), 设置时长为 200 ps。压浴(NPT, Number of particles, Pressure, and Temperature)设置时长为 1ns。正式模拟两个模型模拟时间设置为 30 ns 具体参数如之前模拟论文^[17]。

1.3 数据分析方法

碳链骨架的均方根偏差(RMSD), C α 原子的均方根涨落(RMSF)和蛋白的回转半径(Gyrate)均使用 GROMACS 分子模拟套件(版本 5.0.6)和 Python Pandas 模块计算。蛋白运动主成份分析(PCA)与协方差分析使用 bio3d^[18] 完成,蛋白运动的氢键分析使用 MDTraj^[19] 软件完成,绘图使用开源软件 Matplotlib, 三维结构绘图采用 VMD 和 Pymol 完成。

2 结果与讨论

2.1 同源建模与模型评价

由于 HPV18 E6 的晶体结构并未解析,故采用同源建模的方法进行模型的构建,通过 BLAST 搜索发现与已知晶体结构 HPV16 E6 模板(PDB ID: 4XR8_F)最大相似度为 59%,同时二者为同源蛋白且能与相同的小分子结合,故使用该结构作为蛋白模板进行同源建模,建模后的结果采用 ERRAT2 进行评分,结果如图 1.Aa, 从图中可以清晰的发现残基序号 30, 60 以及 50 周围的氨基酸残基结构较为不合理,从模型的三维结构可以清晰的发现 30 与 60 两个位置位于蛋白的 loop 环区域,而氨基酸残基序号 150 周围效果不佳的原因是模板结构并未覆盖该区域导致的,但该区域位于蛋白末端,远离结合腔的结构区域,且二级结构为 loop 环,本身就不稳定,故该部分质量较差对整体模拟影响不大。氨基酸残基序号 60 区域附近 Error value 较小,所以进行氨基酸残基序号 30-40 位置和 60 位置进行 loop 环优化。优化后最优模型如图 1.Ab, 可以发现 loop 环优化后整体评分升高, Overall quality factor 接近晶体结构的 90 阈值。

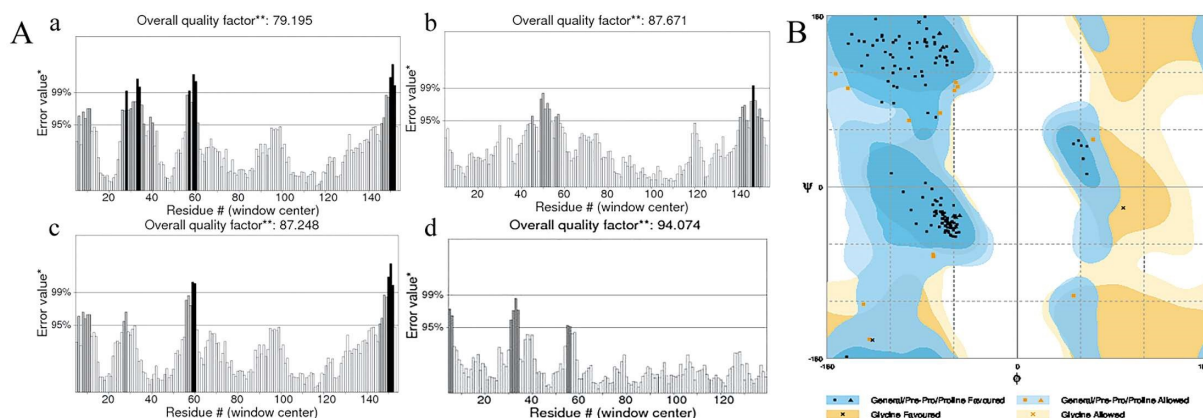


图 1 A. ERRAT2 评分图(a HPV18 同源建模评分;b LOOP 环优化后评分;c HPV16 能量最小化评分;d HPV16 晶体结构评分)B. 拉氏图
Fig.1 A ERRAT2 Score (a. Homology Modeling Rating of HPV18;b. Rating of Optimized Loop; c. Energy Minimization Rating of HPV16; d. Crystal Structure Rating of HPV16)

B) Ramachandran Plot

进一步采用 Rosetta 进行能量最小化, Rosetta 提供了几种能量最小化的方式,但均为沿着向量的方向进行梯度下降。在此模型中我们使用最为常用的 lbfgs_armijo_nonmonotone 方法,其作为一种多步算法但是其仅需调用一次即可完成局部最小化的搜索。能量最小化前后整体得分由 1092.863 下降为 430.152, 采用 ERRAT2 评分可以发现相比能量最小之前得分之前竟有轻微升高, 氨基酸残基 60 处的 Error Value 值升高,

变为高于 Error value 99%(见图 1.Ac)。但结合模板结构 ERRAT2 分析可以发现同样位置可信度同样较低,故认为能量最小化后的结果是优于能量最小化之前的结果(见图 1.Ad)。由于能量最小化是寻找局部能量最小化区域,故先进行蛋白结构优化最后进行能量最小化的效果优于先能量最小化后蛋白结构优化,这样可以规避采用最陡能量最小化过程中进入较浅的能量阱中,从而模型优化不理想,后期模拟平衡需要更长的时

间。最后采用经典的拉氏图评分检测模型质量。HPV18 E6 结构模型的拉氏图评分如图 1.B, 其中左上角深蓝色部分代表 beta 折叠区域, 左侧中间部分代表右手螺旋部分, 右上侧深蓝色部分代表左手螺旋部分, 可以发现模型的氨基酸残基均位于允许区域, 绝大部分位于核心区域。综上结果分析, 模型的质量接近晶体结构质量评分^[20], 可以用于后续研究。

2.2 HPV16 E6 与 HPV18 E6 关键 loop 环分析

将 HPV18 E6 与 HPV16 E6 两者模型使用 Pymol 进行结构比对后使用 VMD 显示, 结果如图 2。

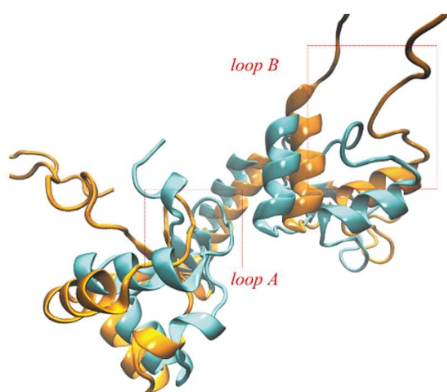


图 2 HPV16 E6 和 HPV18 E6 三维模型比较 (蓝色: HPV16, 橙色: HPV18)

Fig.2 Comparison of Three-dimensional Model between HPV16 E6 and HPV18 E6 (Blue: HPV16; Orange: HPV18)

由图 2 可以发现两者蛋白虽然相似度仅为 59%, 但是整体结构十分相似, 均有一个由多个 α 螺旋构成的结合口袋, 能够与 E6AP 结合从而介导 p53 的结合, 成为一个可成药的药物结合靶点^[21]。HPV16 E6 与 HPV18 E6 主要的差别位于两个 loop 环区域, 结合腔两侧的 loop 环相对于 HPV16 E6 均更长, 左侧 loop 环(图中 loop A, HPV18 E6 30-60 位置), 调控结合口袋的体积和构象。右侧 loop 环(loop B)相比 loop A 远离结合腔区域, 猜测更多的可能行使其它功能。loop A 的研究变得更为有意义, 故对两个蛋白分别进行分子动力学模拟研究其在溶剂环境的动态变化进一步研究。

由于 HPV16 E6 晶体结构为蛋白配体复合物 (HPV16 E6, E6AP, P53 三聚体) 的三维结构, HPV18 E6 同样基于该晶体做的同源建模, 模型本身为配体结合后的构象, 这不利于分析蛋白与配体结合后构象的变化, 为了捕捉 loop A 在 HPV16 E6 和 HPV18 E6 与配体结合过程中 loop A 发生的变化, 我们通过对失去配体后的蛋白在溶剂环境下的模拟有利于发现蛋白在未结合状态下的构象, 从而可以推导结合后构象运动轨迹。在蛋白模拟后我们首先进行均方根偏差(RMSD)分析(图 3Aa), 分析蛋白碳链骨架与初始结构之间的变化情况, 结果如图 3Bc。由图可以发现 HPV16 E6 在模拟过程中 RMSD 很快趋于稳定, 值约为 0.2nm, 而 HPV18 E6 模拟过程中 RMSD 相对变化较大, 且整个 30 ns 过程中 RMSD 一直处于升高的状态, 其中在模拟 15 ns 后升高变得较为缓和, 提示 HPV18 E6 在水溶剂中相对 HPV16 E6 有更大的构象变化。猜测这与初始模型的质量以及 HPV18 E6 有更大的 loop 环相关。为此, 我们进一步进行

均方根涨落(RMSF)分析(图 3 Ab), 均方根涨落公式为:

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum (r_i - r_{ref})^2}{T}}$$

r_i 和 r_{ref} 分别代表某一时刻的构象和初始构象比较, T 表示时间, 均方根涨落可以用来表征氨基酸残基在模拟时间内的运动情况, 常常用来探究蛋白质柔性区域, 从图中可以清晰发现 HPV18 E6 的两个 loop 环运动相对 HPV16 E6 均有提升, 特别是氨基酸残基序列 25-35 附近区域, 均方根波动最高值约为 0.65 nm, 高于蛋白 C 端的无规卷曲区域, 同时由于该段区域的变化导致 HPV18 E6 与 HPV16 E6 结合腔左侧的蛋白变化不成相关性。分析其变化的原因可能是因为蛋白在失去肽段的联系以后, 该区域 loop 环发生了一定的改变从而介导蛋白构象的转变从而适应配体结合和解离之间的变化。Katia Zanier^[22]等人通过解析 HPV16 E6 与 E6AP 复合物晶体结构发现氨基酸序列 31, 32 与 E6AP 产生疏水联系, 侧面证明了这一观点。为了解构象变化的机制, 进一步对该区域进行氢键分析, 分析该区域氨基酸残基均方根波动的原因。由于轨迹文件较大, 不利于后续分析, 故后续分析均匀取 300 帧的坐标进行分析, 结果如图 3B。

氢键的识别方式采用 Baker-Hubbard 定义^[23]的氢键联系方法, 从图中可以发现在 HPV16 E6 模型 Cys30 上的氮原子与 Gln35 上的氧原子形成了较高的氢键占有率, 而同等位置上的 HPV18 E6 模型并没有这种情况产生, 通过模拟轨迹的分析可以发现 Cys30 和 Gln35 位于 loop 环的两侧, 两者之间能够形成氢键从而使得 loop 构象的活动方式和范围降低, 从而降低其在模拟过程中该区域的均方根涨落。而对应的 Ile30 上的氮原子和 Ile28 上的氧原子距离较远, 没有达到形成氢键的标准, 同时通过模拟轨迹发现其位于 loop 环同侧, 其并未像 HPV16 E6 一样会形成异侧的联系, 导致 loop 环结构宽松, 有更大的活动范围, 从而导致 HPV18 E6 蛋白该位置均方根涨落较大如图 3C。

通过上述分析可以推测 loop A 环在 HPV16 E6 以及 HPV18 E6 失去配体后发生了很大的构象改变, 其中 HPV18 E6 的 loop A 环相比 HPV16 E6 loop 环发生了更剧烈的运动, 主要原因为 HPV16 E6 可以形成稳定的氢键, 而 HPV18 这可能导致 HPV18 E6 与 HPV16 E6 之间对小分子敏感性的差异。

2.3 HPV16 E6 与 HPV18 E6 模拟过程中结构变化分析

为进一步探究蛋白整体的运动方式, 对模拟过程中蛋白结构变化进行分析。首先蛋白模拟后结果进行回转半径(Radius of Gyration)分析, 回转半径是所有质量可以被集中获得相同质量惯性矩的轴距, 因此, 回转半径是质量与旋转轴的 "等效距离", 对于面积为 S 的条形横截面, 回转半径公式为:

$$R_g = \sqrt{\frac{I_s}{S}}$$

回转半径可以用来表示蛋白质的紧密程度, 由图 4 可以清楚的发现 HPV16 E6 整体回转半径较为稳定, 而 HPV18 E6 回转半径显著降低, 由 2.1 nm 降低至 1.6 nm, 说明在模拟过程中蛋白质链压缩, 分子构象的广度被缩减。

进一步将回转半径轴向拆分, 发现 HPV18 E6 回转半径主

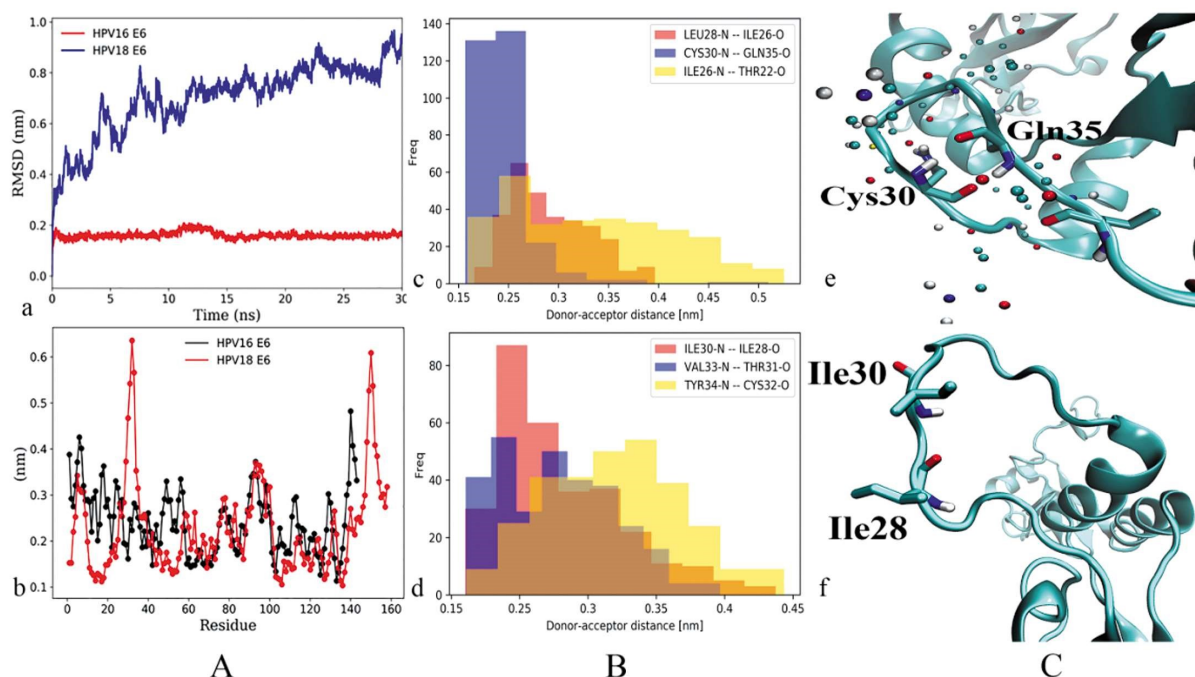


图3 HPV E6 关键 loop 分析: A 均方根曲线(a 均方根偏差 (RMSD); b 均方根涨落 (RMSF)); B 氢键占有率分析(c HPV 16; d HPV18); C 氢键分析 (e HPV16; f HPV18)

Fig.3 Analysis of key loop of E6 protein: A Backbone Root Mean Square Deviation (a. RMSD; b. RMSF); B Occupation Ratio of Hydrogen Bond (c HPV 16; d HPV18); C Analysis of Hydrogen Bond (e HPV16; f HPV18)

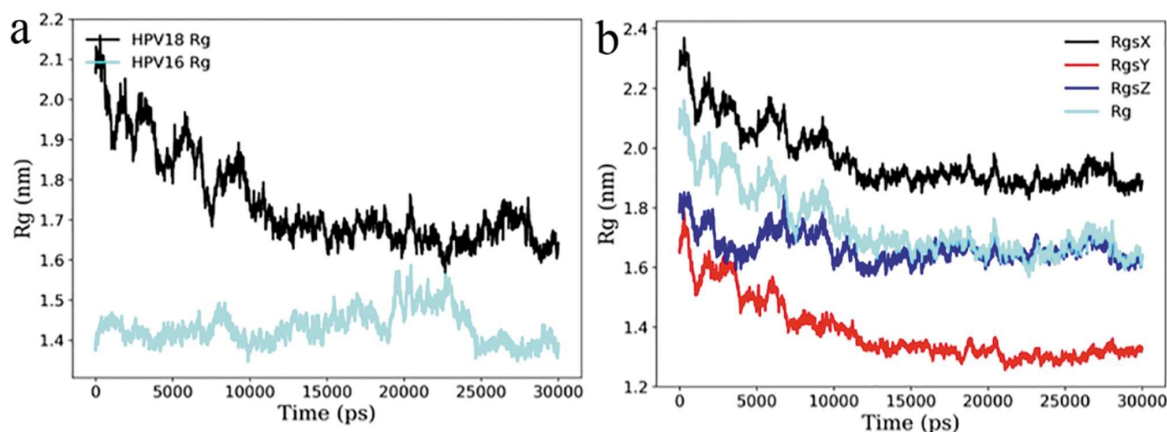


图4 回转半径分析

Fig.4 Analysis of Radius of Gyration

要是 x 和 y 两个维度数值降低, 而 z 维度并未有大的改变, 说明蛋白在两个维度上均发生了压缩。为进一步探究两个蛋白模型在水中的构象变化, 我们对二者进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 从 HPV16 E6 主成分分析可以发现前 20 个本征值可以解释 93.5 % 的信息, 其中前三个本征值可以分别可以解释 30 %, 15.5 % 和 12.5 % 的信息, 三个本征值可以表示 68.3 % 的信息。从 HPV18 E6 主成分分析可以发现前 20 个本征值可以解释 94.9 % 的信息, 其中前三个本征值分别可以解释 42.1 %, 18.5 % 和 9.6 % 的数据, 将蛋白运动分别投影在 PC1, PC2, PC3 三个维度上可以发现能够很好的对两种运动形态很好的分簇, 故对蛋白进行协方差分析, 结果如图 5 及 6。

由于对角线表示的为氨基酸残基与本身相比的相关性, 故对角线程最深的蓝色, 表示正相关为 1, 从整个图形可以发现

HPV16 E6 整体呈负相关性, 但是分布区域较散, 没有明显的较大负相关区域, 负相关主要分布在氨基酸残基序列 10 周围和 100(图 5.a), 50 和 100(图 5.b)以及 120 和 75(图 5.c)区域具有负相关性。而 HPV18 E6 有更多的较大区域程相关性, 其中氨基酸残基序列 100 周围分别和 10, 50 相互之间具有负相关(图 6.bd), 150 周围和 15, 50, 80 呈负相关性(图 6.ac), 50 周围和 15 周围呈正相关性(图 6.f), 120 周围与 150 周围呈正相关性(图 6.e)。相关性较高部分用 pymol 作图结果如图 7A(HPV16 E6)和图 7B(HPV18 E6), 蓝色线条表示负相关区域, 红色表示正相关区域, 可以发现正相关区域大多存在于螺旋整体运动以及 loop 环区域, 而负相关主要是 loop 环与 α 螺旋之间相互相对运动导致的, 这与协方差分析图结果类似, 结合回旋半径分析可以清楚的发现, 当小分子或多肽配体与蛋白相互作用

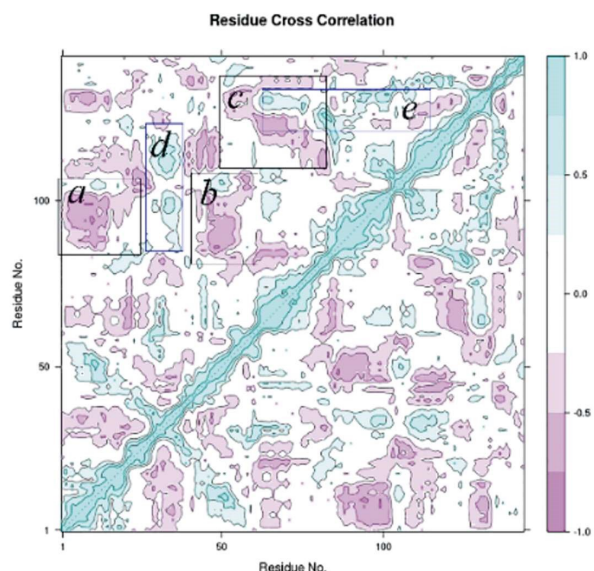


图 5 HPV16 协方差分析

Fig.5 Analysis of Covariance of HPV16

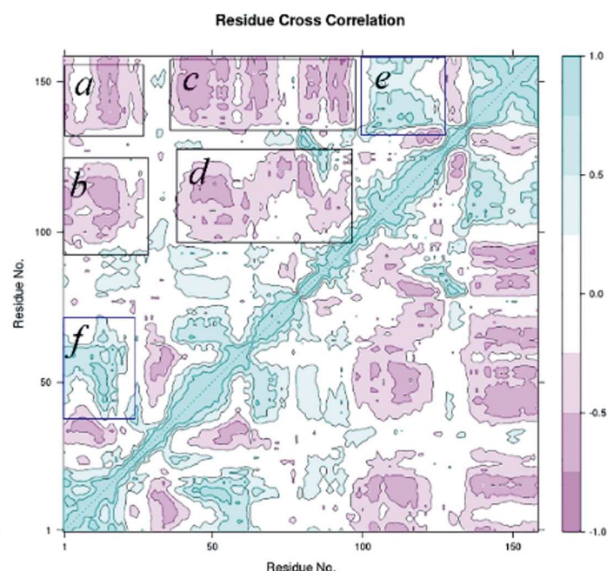


图 6 HPV 18 协方差分析

Fig.6 Analysis of Covariance of HPV 18

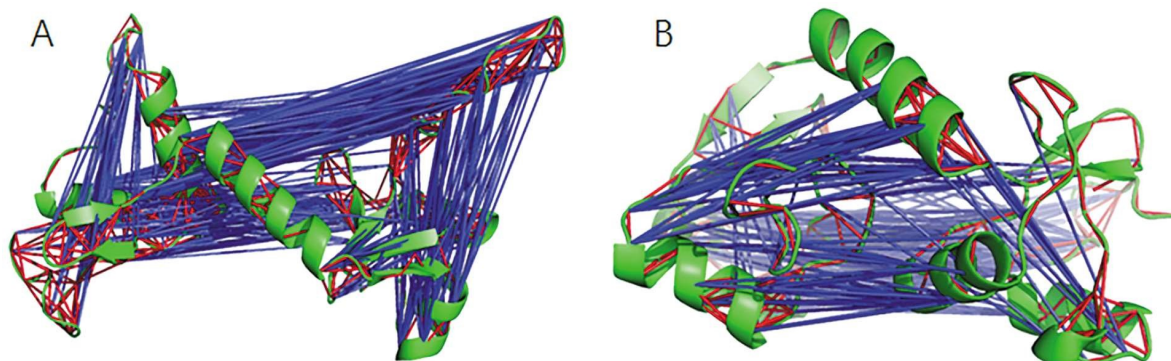


图 7 残基交叉相关分析(A HPV16 B HPV18)

Fig.7 Analysis of Residue Cross Correlation (A HPV16 B HPV18)

消失后,loop 环区域向内收缩内折,而使得蛋白质整体压缩,这样的构象使得腔内环境暴露更小,利于蛋白整体构象的稳定。不难想象出,当小分子或多肽配体化合物与 HPV16 E6 或 HPV18 E6 相互作用时,将会促使蛋白的诱导契合作用从而 loop A 环打开,暴露结合腔,同时结合腔平展以给予蛋白配体直接更大的结合空间,从而发生相互作用。

3 结论

本研究首次对 HPV18 E6 进行了模拟研究,并结合 HPV16 E6 进行了关键结构域分析,分析首次发现两者蛋白靠近 N 端 loop 环在蛋白配体结合过程中可能介导 "门控" 的作用,HPV16 E6 相比 HPV18 E6 有较小的 loop 环,使得 loop 环内可以形成稳定的氢键从而运动相对较小,而 HPV18 E6 有较大的 loop 环从而导致在结合腔具有更大的空间位阻,导致 HPV18 E6 与配体相互结合需要跨过更多的能量势垒,可能导致了 HPV16 E6 具有更多配体的原因。通过整体的构象变化研究发现二者在配体不存在的情况下均收缩蛋白结构,loop 环内折以保存更低的能量构象。由于 HPV18 E6 具有更大的 loop 环,导致产生更大的改变,改变主要集中在 X 和 Y 轴两个维度的压缩。

HPV16 E6 与 HPV18 E6 两者均为高风险亚基,均可以介导 p53 蛋白的下降,有证据表明 HPV16 E6 与 HPV18 E6 均可与一些小分子或多肽相互结合导致其作用失活,从而使 p53 蛋白升高,故该位点成为一个潜在的药物蛋白靶标^[7]。HPV E6 研究更多的是侧重于小分子或肽的筛选^[24],对蛋白本身关键调控区域的研究较为匮乏,本研究从蛋白本身出发,分析了 HPV16 E6 与 HPV18 E6 两个蛋白在溶剂中的运动机制,并发现 loop 环在其中扮演 "门控" 的作用,解释了蛋白在失去配体后在水溶液中的构象变化,从而找出配体调控的关键区域,研究能够为以两个蛋白为靶点的小分子或多肽药物设计提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] Bravo I G, Felez-Sanchez M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine [J]. *Evol Med Public Health*, 2015, 2015 (1): 32-51
- [2] Nelson E A, Lam H S, Choi K C, et al. A pilot randomized study to assess immunogenicity, reactogenicity, safety and tolerability of two human papillomavirus vaccines administered intramuscularly and intradermally to females aged 18-26 years [J]. *Vaccine*, 2013, 31(34): 3452-3460
- [3] Kho E Y, Wang H K, Banerjee N S, et al. HPV-18 E6 mutants reveal

- p53 modulation of viral DNA amplification in organotypic cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(19): 7542-7549
- [4] Howie H L, Katzenellenbogen R A, Galloway D A. Papillomavirus E6 proteins[J]. *Virology*, 2009, 384(2): 324-334
- [5] Ronchi V P, Klein J M, Edwards D J, et al. The active form of E6-associated protein (E6AP)/UBE3A ubiquitin ligase is an oligomer [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(2): 1033-1048
- [6] Cherry J J, Rietz A, Malinkevich A, et al. Structure based identification and characterization of flavonoids that disrupt human papillomavirus-16 E6 function[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84506
- [7] Zanier K, Stutz C, Kintscher S, et al. The E6AP binding pocket of the HPV16 E6 oncoprotein provides a docking site for a small inhibitory peptide unrelated to E6AP, indicating druggability of E6 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112514
- [8] Martinez-Zapien D, Ruiz F X, Poirson J, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53[J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 541-545
- [9] Malecka K A, Fera D, Schultz D C, et al. Identification and characterization of small molecule human papillomavirus E6 inhibitors[J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(7): 1603-1612
- [10] Sali A, Blundell T L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints[J]. *J Mol Biol*, 1993, 234(3): 779-815
- [11] MacArthur M W, Driscoll P C, Thornton J M. NMR and crystallography--complementary approaches to structure determination[J]. *Trends Biotechnol*, 1994, 12(5): 149-153
- [12] O'Meara M J, Leaver-Fay A, Tyka M D, et al. Combined covalent-electrostatic model of hydrogen bonding improves structure prediction with Rosetta [J]. *J Chem Theory Comput*, 2015, 11(2): 609-622
- [13] Gopalakrishnan K, Sowmiya G, Sheik S S, et al. Ramachandran plot on the web (2.0)[J]. *Protein Pept Lett*, 2007, 14(7): 669-671
- [14] Kolaskar A S, Sawant S. Prediction of conformational states of amino acids using a Ramachandran plot [J]. *Int J Pept Protein Res*, 1996, 47(1-2): 110-116
- [15] Pronk S, Pall S, Schulz R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(7): 845-854
- [16] Maier J A, Martinez C, Kasavajhala K, et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB[J]. *J Chem Theory Comput*, 2015, 11(8): 3696-3713
- [17] 康文渊, 徐锡明, 郭建秀, 等. 分子动力学模拟残基突变对芳香烃受体配体结合区的影响[J]. *化学通报*, 2017, (02): 179-184
- Kang Wen-yuan, Xu Xi-ming, Guo Jian-xiu, et al. Molecular Dynamics Studies on the Structure of Aryl Hydrocarbon Receptor Fragment Affected by Site-Directed Mutagenesis [J]. *Chemistry*, 2017 (02): 179-184
- [18] Skjaerven L, Jariwala S, Yao X Q, et al. Online interactive analysis of protein structure ensembles with Bio3D-web [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(22): 3510-3512
- [19] McGibbon R T, Beauchamp K A, Harrigan M P, et al. MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories [J]. *Biophys J*, 2015, 109(8): 1528-1532
- [20] Nicolau N J, Giuliatti S. Modeling and molecular dynamics of the intrinsically disordered e7 proteins from high- and low-risk types of human papillomavirus[J]. *J Mol Model*, 2013, 19(9): 4025-4037
- [21] Martinez-Zapien D, Ruiz F X, Poirson J, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53[J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 541-545
- [22] Zanier K, Charbonnier S, Sidi A O, et al. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins [J]. *Science*, 2013, 339(6120): 694-698
- [23] Baker E N, Hubbard R E. Hydrogen bonding in globular proteins [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 1984, 44(2): 97-100
- [24] Karlsson O A, Ramirez J, Oberg D, et al. Design of a PDZbody, a bivalent binder of the E6 protein from human papillomavirus [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9382

(上接第 609 页)

- [23] Schofield AV, Bernard O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48(4): 301-316
- [24] Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase [J]. *Nature*, 1998, 393(6687): 805-809
- [25] Ren XD, Wang R, Li Q, et al. Disruption of Rho signal transduction upon cell detachment [J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(6): 3511-3518
- [26] Abouzahr Rifai S, Hasmim M, Boukerche H, et al. Resistance of tumor cells to cytolytic T lymphocytes involves Rho-GTPases and focal adhesion kinase activation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(46): 31665-31667
- [27] 赵莹, 杨福春, 魏晓晴, 等. ROCK I / II 基因下调对血管平滑肌细胞迁移及增殖的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(17): 3232-3234+3271
- Zhao Ying, Yang Fu-chun, Wei Xiao-qing, et al. Effects of ROCK I / II gene expression down-regulated on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(17): 3232-3234+3271
- [28] An L, Liu Y, Wu A, et al. microRNA-124 Inhibits Migration and Invasion by Down- Regulating ROCK1 in Glioma [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69478
- [29] Lei P, Xie J, Wang L, et al. microRNA-145 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting ROCK1 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 155-160
- [30] Stiles JM, Kurisetty V, Mitchell DC, et al. Rho kinase proteins regulate global miRNA expression in endothelial cells [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2013, 10(6): 251-263