

Molecular Dynamics Insight into the Interaction Mechanism of Inhibitor PMI with MDMX*

Wei yuan Cheng¹, Zhi qiang Liang², Wei Wang², Chang hong Yi², Keyan Wang², Hongyun Li², Jianzhong Chen^{2#}

¹Affair Office, Shandong Jiaotong University, Jinan
²School of Science, Shandong Jiaotong University, Jinan
Email: #chenjianzhong1970@163.com

Received: Aug. 23rd, 2012; revised: Aug. 27th, 2012; accepted: Sep. 3rd, 2012

Abstract: Restoration of p53 function is considered to be a new therapeutic strategy for anti-cancers. Molecular Dynamics (MD) simulations coupled with Molecular Mechanics/Possion-Boltzman Surface Area (MM-PBSA) method were used to study the mechanism of the PMI-MDMX interaction. The results show that van der Waals energy drives the PMI-MDMX interaction. Calculations based on residue-residue interaction were also performed, and the results not only suggest that five residues of PMI can produce strong interaction with MDMX, but also the CH-CH, CH- π , π - π interactions predominate the binding of PMI in the hydrophobic cleft of MDMX. We expect that this study can contribute significantly to the designs of the potent inhibitors inhibiting the PMI-MDMX interaction.

Keywords: p53-MDMX Interaction; Molecular Dynamics; MM-PBSA; Binding Free Energy

肿瘤蛋白 MDMX 与抑制剂 PMI 作用机制的分子动力学研究*

程伟渊¹, 梁志强², 王伟², 伊长虹², 王克彦², 李洪云², 陈建中^{2#}

¹ 山东交通学院办公室, 济南

² 山东交通学院理学院, 济南

Email: #chenjianzhong1970@163.com

收稿日期: 2012 年 8 月 23 日; 修回日期: 2012 年 8 月 27 日; 录用日期: 2012 年 9 月 3 日

摘要: 恢复抑癌蛋白 p53 的功能已经成为一种治疗癌症的新途径。本文采用分子动力学模拟和 MM-PBSA 方法计算了抑制剂 PMI 与肿瘤蛋白 MDMX 的结合自由能。结果表明范德华相互作用驱动了 PMI 与 MDMX 的结合。同时也使用基于残基对的自由能分解方法计算了残基-残基相互作用, 结果不仅表明 PMI 的 5 个残基能与 MDMX 产生强烈的相互作用, 而且也表明 CH-CH, CH- π , π - π 相互作用主导了 PMI 在 MDMX 疏水性裂缝中的结合。我们期望这个研究能为抑制 p53-MDMX 相互作用药物的研发提供理论上的启示。

关键词: p53-MDMX 相互作用; 分子动力学; MM-PBSA; 结合自由能

1. 引言

人类 p53 蛋白是由 393 个氨基酸组成的核磷蛋白, p53 蛋白的一级结构可分为三个区域: N 端酸性

区, 由 1-75 位氨基酸组成; 中间疏水区, 由 100-300 位氨基酸组成; C 端碱性区, 主要由 310-390 位氨基酸组成。在正常的细胞中, p53 及其下游分子 MDM2 可以调控促癌转移分子 Slug, 通过形成 p53-MDM2-Slug 复合体改变 Slug 的稳定性, 抑制癌细胞转移能力

*资助信息: 国家自然科学基金(Nos. 11104164)、山东交通学院博士启动资金和校自然科学基金。

#通讯作者。

[1]。因此蛋白 p53 素有“基因卫士”之称，它在细胞生长周期和 DNA 修补等方面起到重要作用[2]。活性的 p53 能有效地抑制肿瘤的生长，保护人体肌体细胞免受肿瘤的侵袭[3]。但是肿瘤蛋白 MDM2/MDMX 能直接与 p53 结合，限制了 p53 的活性功能，世界上 50% 的癌症患者的体内发现了 MDM2/MDMX 的过度表达证实这个结论[4]。因此，阻断 p53 与 MDM2/MDMX 相互作用成为治疗癌症的新途径。

肿瘤蛋白 MDM2 和 MDMX 的 N 端与 p53 蛋白 N 端的 TA 区域结合，从而负调控 p53 的功能活性[5]。MDMX 又称作 MDM4，在氨基酸残基序列上，MDMX 与 MDM2 的序列一致性达到 54%[6,7]，在结构上 MDMX 与 MDM2 显示了一个共同的 $\beta\alpha\beta\alpha$ 的拓扑结构(图 1)[8]。两个肿瘤蛋白都直接与 p53 相互作用，致使 p53 功能失活。但是 MDMX 不能用作 p53 的转录靶标，这又在作用上不同于 MDM2。研究表明 MDMX 在人体内的过度表达的确诱发了几种癌症[9]。因此抑制 p53-MDM2 和 p53-MDMX 相互作用的双重抑制剂的研发成为癌症治疗的重点。

抑癌蛋白 p53 疏水性表面的三个氨基酸残基 Phe19', Trp23'和 Leu26'插入到 MDM2 和 MDMX 的疏水性裂缝[5,10,11]，从而与 MDM2/MDMX 相互作用。在结构上，由 MDM2 的残基 His96 到 MDMX 的 Pro95 的转换致使 C 端 α 螺旋产生小的偏差[8]。因此一些课题组以 p53-MDM2/MDMX 相互作用为靶标设计多个类型的肽类和非肽类抑制剂[3,12-14]。这些抑制剂能以较高的亲和能与 MDM2 结合，较好地抑制了 p53-MDM2 相互作用，但对 p53-MDMX 相互作用抑制效果比较差。Pazgier 等人合成的肽类抑制剂 PMI 能与 MDMX 产生较高的结合能[8]。PMI 在结构上呈现出 α 螺旋的形式(图 1)，其残基序列为 TSFAEYWNLSP，PMI 能够以 4.15 nM 的较强结合能力与 MDMX 结合[8]。因此在原子层次上研究 PMI 与 MDMX 的相互作用机制对以 p53-MDMX 相互作用为靶标的抑制剂的设计有重要意义。

目前，分子动力学模拟和结合自由能计算已经成为研究蛋白质-蛋白质相互作用的重要工具。它们能够在原子层次上理解 PMI 与 MDMX 的相互作用机制，有利于阐明 PMI-MDMX 复合物的结构-亲和能关系。本文选取了来自蛋白质库的结构(3EQY)[8]作为研究的初始模型。图 1 给出了 PMI-MDMX 复合物的

结构。本工作采用已经成功使用的 MM-PBSA 方法[7,15-24]和分子动力学模拟研究 PMI 与 MDMX 的结合机制。能够为 p53-MDMX 相互作用的小分子抑制剂的设计提供理论上的指导。

2. 材料和方法

2.1. 分子动力学模拟

用于 PMI-MDMX 复合物分子动力学模拟的初始构象取自蛋白质库(3EQY)，所有的结晶水分子保留在初始构象中。复合物晶体结构中缺失的氢原子由 Amber12 中的 Tleap 模块添加[25]。MDMX，PMI 和水分子的力场参数均取自 Amber 中的 ff03 力场[26]。

分子动力学模拟采用 Amber12 中的 Sander 程序。PMI-MDMX 的复合体溶解在显性的 TIP3P 水盒子里，水盒子的厚度为 10 Å。两个氯离子添加到由水和复合体组成的系统，以保证整个系统的电中性。为了消除原子间一些不合理的接触，对复合体体系执行两步的系统优化：1) 约束溶质，优化溶剂和中和离子，约束力常数为 100 kcal/(mol·Å²)；2) 无约束地优化整个系统。每一步优化均先执行 3000 步的最下降优化，接着执行 3000 步的共轭梯度优化。然后在 300 ps 内把系统从 0 K 加热到 300 K，随后进行 300 ps 的常温 300 K，常压 1 标准大气压的动力学平衡。最后是 10 ns 的无约束分子动力学模拟。

模拟期间采用 SHAK 方法限制所有含氢原子化学键的伸缩[27]。模拟积分步长为 2 fs。PME 方法用来计算长程静电相互作用。应用周期性边界条件以消除

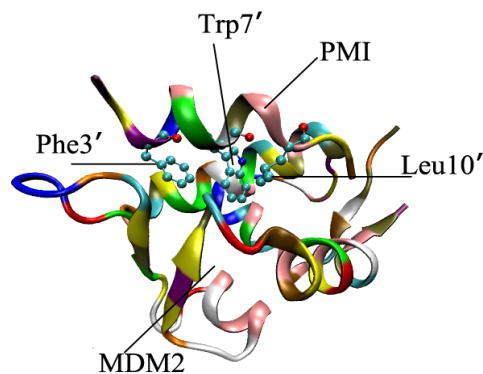


Figure 1. Structure of PMI-MDMX complex. MDMX and PMI are showed in new cartoon, the residues Phe3', Trp7' and Leu10' are displayed in ball-stick mode

图 1. PMI-MDMX 复合物的结构，MDMX 和 PMI 以新卡通模式显示，Phe3'、Trp7'和 Leu10'以球棒模式显示

溶剂盒子的边缘效应。非成键相互作用的截断值为 10.0 Å。同时，监测了系统的能量和主链原子相对于初始优化结构的 RMSD 随时间的函数，以判断系统平衡的可靠性。

2.2. MM-PBSA 计算

采用单轨迹方案的 MM-PBSA 方法计算肽类抑制剂 PMI 与 MDMX 的结合自由能。从动力学模拟轨迹中每隔一定的时间间隔取出体系的结构，删掉构象中的水分子和氯离子，对每一个构象由下面的方程计算结合自由能。

$$\Delta G = \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (1)$$

其中 ΔE_{MM} 是气相中的分子力学能贡献， ΔG_{sol} 溶解自由能对分子结合的贡献， $T\Delta S$ 表示熵变对结合自由能的贡献。 ΔE_{MM} 可以进一步分成两部分：

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdw} \quad (2)$$

式中 ΔE_{ele} 和 ΔE_{vdw} 分别表示气相中的静电相互作用和范德华能。溶解自由能也由如下的两个成分组成：

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{pb} + \Delta G_{surf} \quad (3)$$

式中 ΔG_{pb} 和 ΔG_{surf} 分别代表极性溶解自由能和非极性溶解自由能。前者的成分可以通过有限差分法求解泊松 - 玻尔兹曼方程获得，溶质和溶剂的介电常数分别设为 1.0 和 80.0。后一项由下列的经验方程求解：

$$\Delta G_{surf} = \gamma SASA + \beta \quad (4)$$

式中的值分别取为 0.00542 kcal/(mol·Å²) 和 0.92 kcal/mol。

$T\Delta S$ 是由于自由度的变化导致的熵变对结合自由能的贡献， $T\Delta S$ 可以表述为方程(5)为：

$$T\Delta S = T(\Delta S_{trans} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{vib}) \quad (5)$$

其中 ΔS_{trans} 和 ΔS_{rot} 分别表示平动和转动自由度变化导致的熵变化，这两项用经典的统计力学方法计算。 ΔS_{vib} 表示振动自由度的变化产生的熵贡献，该项应用简振模方法进行计算。本文选择的体系中，抑制剂与 MDMX 的疏水性基团间产生较强的吸引作用，致使结合前后运动的模式发生了变化。

2.3. 残基 - 残基相互作用的计算

自由能分解到每一个残基的贡献，有助于定量地

理解抑制剂和残基的相互作用，有助于定量地阐明 PMI-MDMX 复合体的结构亲和能关系。Amber12 中基于成对残基相互作用的自由能分解程序 GBSA (Generalized Born/Surface Area) 能将残基 - 残基相互作用分解为下面的方程表达式。

$$\Delta G_{residue-residue} = \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdw} + \Delta G_{pb} + \Delta G_{surf} \quad (6)$$

其中真空中的静电相互作用 (ΔE_{ele}) 和范德华作用 (ΔE_{vdw}) 由分子力学方法计算，极性溶剂化能 (ΔG_{pb}) 由 GB 模型计算，而非极性溶剂化能 (ΔG_{surf}) 由 LCPO 方法计算获得。

3. 结果和讨论

3.1. 动力学平衡的稳定性

为评估动力学模拟的质量和系统平衡的可靠性，我们使用 Amber 中的 Ptraj 模块分析了蛋白质主链原子相对晶格结构的均方根偏差(RMSD)随时间的函数(图 2)。依据图 2，动力学模拟 4 ns 以后，系统达到了平衡，且 RMSD 的平均值为 1.15 Å，涨落范围低于 0.60 Å。同时我们还监控了系统的动能、势能和总能量随时间的变化关系(图 3)，由图 3 观察到，模拟过程中三种能量很稳定，无异常变化。以上结果表明用于后加工分析的动力学轨迹的稳定性是可靠的。

3.2. 结合自由能计算

抑制剂与蛋白质的结合自由能不仅能衡量二者结合的强弱，也能反映出抑制剂与蛋白质结合的不同作用成分。因此本文使用 MM-PBSA 方法计算了抑制剂 PMI 和 MDMX 的结合自由能，自由能的组成成分列在表 1 中。

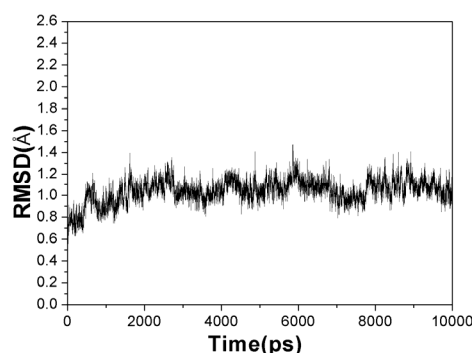


Figure 2. Root-mean-square deviation of the backbone atoms on PMI-MDMX complex
图 2. MD 模拟中主链原子的均方根偏差

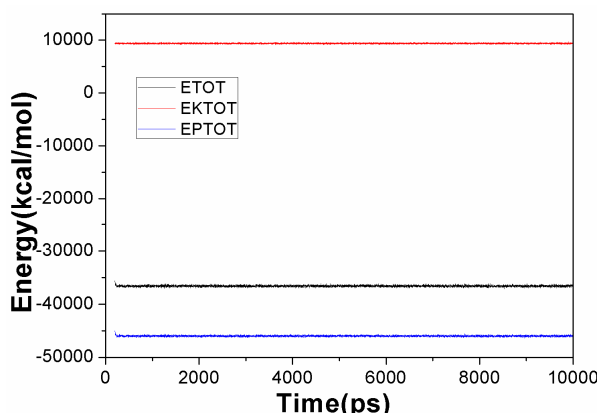


Figure 3. The energies of PMI-MDMX complex as function of time observed during MD simulation, EKTOT (up), EPTOT (down) and ETOT (middle)

图 3. 动力学模拟过程中 PMI-MDMX 复合体的能量随时间的变化关系: EKTOT(上), EPTOT(下)和 ETOT(中)

依据表 1 列出的各自由能成分, PMI 与 MDMX 的结合自由能为 -17.18 kcal/mol, 体现出 PMI 能以较强的结合能力与 MDMX 相互作用。PMI 与 MDMX 的范德华相互作用能 ΔE_{vdw} 是 -61.30 kcal/mol, 该作用利于 PMI 与 MDMX 的结合, 同时与溶剂可及表面积相关的非极性溶解自由能 ΔG_{surf} (-7.81 kcal/mol) 也为 PMI 的结合提供了有利贡献。从表 1 可以看到, 虽然静电相互作用能 ΔE_{ele} 也非常有利于抑制剂 PMI 与 MDMX 的结合, 但该有利的相互作用完全被更强的极性溶解自由能 ΔG_{pb} 抵消。在两个有力的作用成分中, 范德华相互作用能是非极性溶解自由能的 8 倍多, 因此范德华相互作用是 PMI 与 MDMX 结合的主导力量。该结果与我们先前的计算研究相吻合^[28,29]。

Table 1. Results calculated by MM-PBSA method (kcal/mol)^a
表 1. MM-PBSA 计算所得到的能量(kcal/mol)^a

Component	PMI-MDMX		MDMX		PMI		Delta	
	Mean	Std	Mean	Std	Mean	Std	Mean	Std
E_{ele}	-2010.49	40.34	-1657.35	31.52	-225.19	11.59	-127.96	8.90
E_{vdw}	-385.79	14.09	-309.37	14.35	-15.12	3.21	-61.30	2.35
E_{int}	2090.15	26.07	1843.06	23.50	247.09	9.57	-0.00	0.00
E_{gas}	-306.13	15.49	-123.66	14.27	6.79	1.20	-189.26	20.85
G_{surf}	33.13	0.47	31.46	0.46	9.04	0.15	-7.37	0.30
G_{pb}	-1180.98	37.32	-1077.54	28.04	-251.62	9.34	148.18	22.90
G_{sol}	-1147.85	37.14	-1046.08	27.91	-242.58	9.31	140.81	22.81
G_{pbele}	-3191.47	13.48	-2734.89	12.87	-476.80	5.22	20.22	2.80
G_{pbtot}	-1453.98	26.81	-1169.74	23.83	-235.79	10.16	-48.45	3.95
TS_{tra}	16.10	0.00	15.97	0.00	14.28	0.00	-14.16	0.00
TS_{rot}	15.92	0.01	15.75	0.01	12.89	0.03	-12.72	0.04
TS_{vib}	1090.43	3.88	955.42	3.13	139.41	0.85	-4.39	3.54
TS_{tot}	1122.45	3.88	987.14	3.13	166.58	0.85	-31.27	3.56
ΔG_{bind}							-17.18	

^a E_{ele} 和 E_{vdw} 分别表示静电作用能和范德华作用能, E_{int} 表示由键伸、键角弯折和二面角扭转贡献的内能, $E_{gas} = E_{ele} + E_{vdw} + E_{int}$; G_{surf} 和 G_{pb} 分别是非极性溶剂化能和极性溶剂化能, G_{sol} 是溶解自由能且 $G_{sol} = G_{surf} + G_{pb}$; $G_{pbele} = E_{ele} + G_{pb}$; $G_{pbtot} = G_{sol} + E_{gas}$; TS_{tra} , TS_{rot} 和 TS_{vib} 分别表示体系的平动、转动和振动自由度熵变对自由能的贡献; $TS_{tot} = TS_{tra} + TS_{rot} + TS_{vib}$; $\Delta G_{bind} = G_{pbtot} - TS_{tot}$ 。

3.4. 结构 - 能量关系分析

为了能定量地研究 PMI 与 MDMX 的结合模式, 阐明 PMI-MDMX 复合体的结构 - 功能关系, 本文采用基于残基对的自由能分解方法计算了抑制剂与 MDMX 各残基的相互作用(图 4)。同时, 图 5 画出了 PMI-MDMX 复合体中主要残基的相对位置。依据图

4, PMI 的 5 个残基能与 MDMX 产生强于 1.0 kcal/mol 的相互作用, 这表明抑制剂 PMI 的确能和 p53 相互竞争与 MDMX 的结合, 从而能较好地干扰 p53-MDMX 相互作用, 我们将从结构和能量的角度阐述它们的作用机制。

抑制剂 PMI 的残基 Phe3' 与 MDMX 的 4 个残基产生较强烈的相互作用, 这 4 个残基分别是 Ile60、

Met61、Tyr66 和 Gln71。Phe3'与 Tyr66 的相互作用能是-2.84 kcal/mol, 这在结构上与两个残基的苯环相互靠近而产生的 π - π 相互作用相吻合(图 5)。从图 5 和表

2 中可观察到, Phe3'与 Gln71 间形成了一个氢键, 该氢键为 PMI 与 MDMX 的结合贡献了-3.52 kcal/mol 的相互作用能(图 4)。Phe3'与残基 Ile60 和 Met61 的相

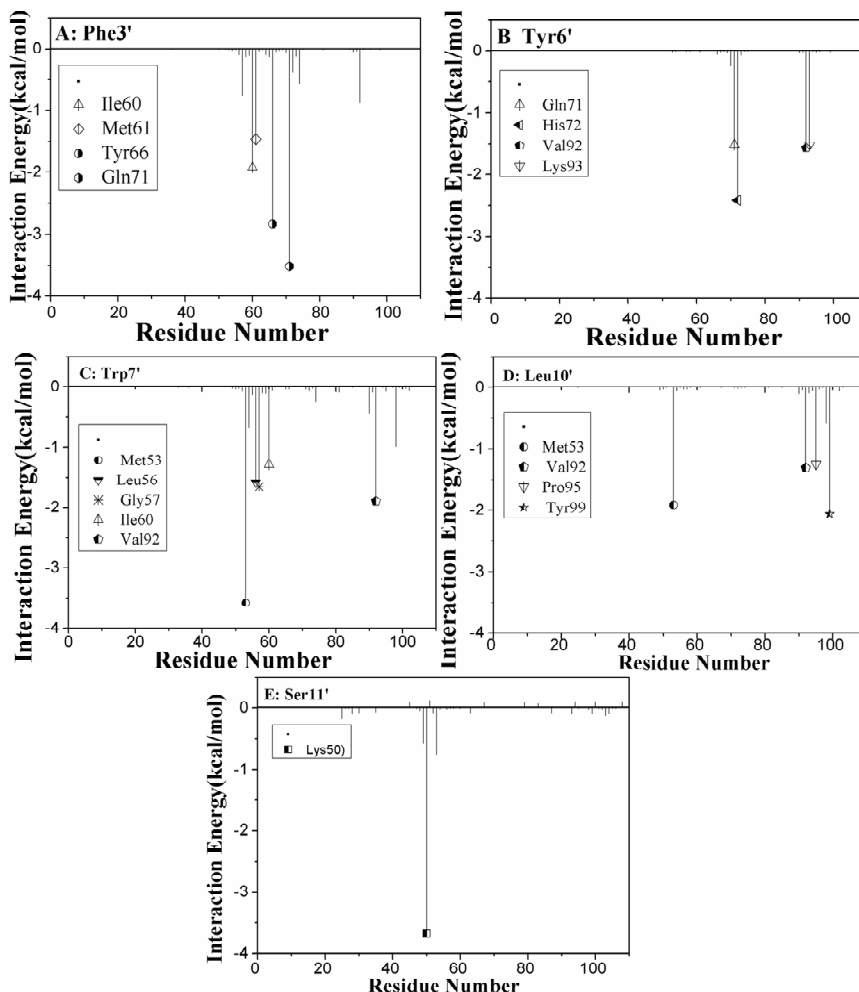


Figure 4. Residue-residue interaction spectrum between the inhibitor PMI and MDMX
图 4. 抑制剂 PMI 中关键残基与 MDMX 各个分离残基的相互作用谱

互作用分别是-1.92 和-1.46 kcal/mol, 这两个相互作用能主要来源于残基 Ile60 和 Met61 的 CH 基团与 Phe3'的苯环间的 CH- π 相互作用(图 5)。因此, 4 个残基 Ile60、Met61、Tyr66 和 Gln71 形成了 MDMX 与残基 Phe3'的疏水性结合口袋。

由图 4 可得, 抑制剂 PMI 的残基 Trp7'与 MDMX 的 5 个残基产生了较强的相互作用, 这些残基分别是 Met53、Leu56、Gly57、Ile60 和 Val92。Trp7'与 Met53 产生了最强的相互作用, 相互作用能是-3.58 kcal/mol, 该能量主要有两个来源: 1) Met53 的烷基与 Trp7'的吲哚产生 CH- π 相互作用, 2) Trp7'的吲哚环上的 N

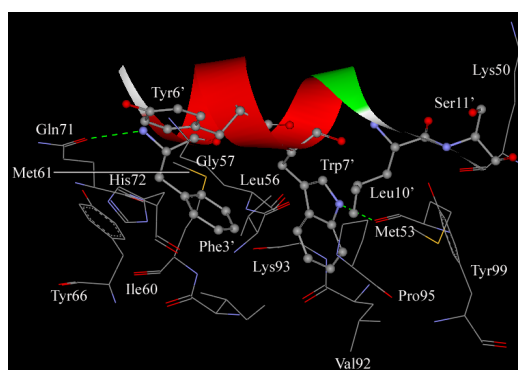


Figure 5. Relative geometries of the key residues in PMI-MDMX complex and hydrogen bonds
图 5. PMI-MDMX 复合体中主要残基的相对位置以及形成的氢键

Table 2. The hydrogen bonds of the key residues
表 2. 主要残基的氢键分析

Donor ^a	Acceptor ^b	Distance ^c /Å	Angle ^d (°)	Freq. ^e /%
Phe3'-N-H	Gln71-OE1	3.112	146.83	46.54
Trp7'-NE1-HE1	Met53-OE1	2.754	151.43	92.25

^a 供体原子; ^b 受体原子; ^c 距离; ^d 角度; ^e 占有率。

提供一个氢原子与 Met53 的羰基氧原子(O)形成一个氢键(见表 2 和图 5)。Trp7'与 Leu56, Gly57, Ile60 和 Val92 相互作用能分别是-1.58, -1.66, -1.29 和-1.89 kcal/mol, 该结果恰好在结构上吻合了这 4 个残基的 CH 基团与 Trp7'的吲哚环间的 CH- π 相互作用。故 MDMX 的残基 Met53、Leu56、Gly57、Ile60 和 Val92 形成了 Trp7'的疏水性结合口袋。

依据图 4, PMI 的残基 Leu10'与 MDMX 的 4 个残基 Met53、Val92、Pro95 和 Tyr99 形成强于-1.0 kcal/mol 的相互作用。Leu10'与 Met53 和 Val92 的相互作用能分别是-1.91 和-1.31 kcal/mol, 从结构上看, 这两个作用主要来自 Met53 和 Val92 的烷基与 Leu10'烷基间的 CH-CH 相互作用(图 5)。Leu10'与 Pro95 和 Tyr99 的相互作用能分别是-1.25 和-2.06 kcal/mol, 这在结构上与 Leu10'的烷基和 His96 的五元环和 Pro95 多元环间的 CH- π 相互作用吻合(见图 5)。因此残基 Met53、Val92、Pro95 和 Tyr99 构建了 Leu10'的疏水性结合口袋。

依据图 4, 除上述分析的三个残基外, 还观察到另外两个残基 Tyr6'和 Ser11'也与 MDMX 产生较强的相互作用。Tyr6'与残基 Gln71、His72、Val92 和 Lys93 的相互作用能分别是-1.52, -2.42, -1.57 和-1.52 kcal/mol, 这主要归功于 Tyr6'的苯环与残基 Gln71、His72、Val92 和 Lys93 烷基间的 CH- π 相互作用。Ser11'与 Lys50 的作用是-3.68 kcal/mol, 这个作用主要来源于 Ser11'的烷基与 Lys50 烷基间的 CH-CH 相互作用。上述分析基本上与 J. Z. H. Zhang 等人的量子力学研究^[30]以及我们先前的研究相吻合^[28,29]。总之, CH-CH, CH- π 和 π - π 相互作用驱动了 PMI 在 MDMX 疏水性裂缝中的结合。

4. 结论

本文对 PMI-MDMX 复合体执行了 10 ns 的分子动力学模拟以研究抑制剂 PMI 与 MDMX 的作用机

制。采用 MM-PBSA 方法计算了 PMI 与 MDMX 的结合自由能, 结果表明范德华相互作用主导了抑制剂 PMI 与 MDMX 的结合。同时使用基于残基对的自由能分解方法计算了残基-残基相互作用, 结果显示 PMI 的 5 个残基 Phe3'、Tyr6'、Trp7'、Leu10'和 Ser11'能够与 MDMX 产生较强的相互作用。我们期望该研究能够为抑制 p53-MDM3/MDMX 相互作用双重抑制剂的设计提供理论上的启示。

5. 致谢

本文由国家自然科学基金(Nos. 11104164)、山东交通学院博士启动资金和校自然基金资助。

参考文献 (References)

- [1] S. P. Wang, W. L. Wang, Y. L. Chang, et al. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nature Cell Biology*, 2009, 11(6): 694-704.
- [2] K. H. Vousden, D. P. Lane. p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(4): 275-283.
- [3] A. Shmueli, M. Oren. Regulation of p53 by Mdm2: Fate is in the numbers. *Molecular Cell*, 2004, 13(1): 4-5.
- [4] S. Uldrijan, W. J. Pannekoek and K. H. Vousden. An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX. *The EMBO Journal*, 2006, 26(1): 102-112.
- [5] G. M. Popowicz, A. Czarna and S. Wolf. Structures of low molecular weight inhibitors bound to MDMX and MDM2 reveal new approaches for p53-MDMX/MDM2 antagonist drug discovery. *Cell Cycle*, 2010, 9(6): 1104-1111.
- [6] T. L. Joseph, A. Madhumalar, C. J. Brown, et al. Differential binding of p53 and nutlin to MDM2 and MDMX: Computational studies. *Cell Cycle*, 2010, 9(6): 1167-1181.
- [7] J. Chen, D. Zhang, Y. Zhang, et al. Computational studies of difference in binding modes of peptide and non-peptide inhibitors to MDM2/MDMX based on molecular dynamics simulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(2): 2176-2195.
- [8] M. Pazgier, M. Liu, G. Zou, et al. Structural basis for high-affinity peptide inhibition of p53 interactions with MDM2 and MDMX. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(12): 4665-4670.
- [9] Y. F. M. Ramos, R. Stad, J. Attema, et al. Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53. *Cancer Research*, 2001, 61(5): 1839-1842.
- [10] J. Phan, Z. Li, A. Kasprzak, et al. Structure-based design of high affinity peptides inhibiting the interaction of p53 with MDM2 and MDMX. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(3): 2174-2183.
- [11] A. Czarna, G. M. Popowicz, A. Pecak, et al. High affinity interaction of the p53 peptide-analogue with human Mdm2 and Mdmx. *Cell Cycle*, 2009, 8(8): 1176-1184.
- [12] K. Ding, Y. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, et al. Structure-based design of spiro-oxindoles as potent, specific small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49(12): 3432-3435.
- [13] J. K. Murray, S. H. Gellman. Targeting protein-protein interactions: Lessons from p53/MDM2. *Biopolymers*, 2007, 88(5): 657-686.
- [14] B. L. Grasberger, T. Lu, C. Schubert, et al. Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005,

- 48(4): 909-912.
- [15] J. Chen, S. Zhang, X. Liu, et al. Insights into drug resistance of mutations D30N and I50V to HIV-1 protease inhibitor TMC-114: Free energy calculation and molecular dynamic simulation. *Journal of Molecular Modeling*, 2010, 16(3): 459-468.
- [16] E. L. Wu, K. L. Han and J. Z. H. Zhang. Selectivity of neutral/weakly basic P1 group inhibitors of thrombin and trypsin by a molecular dynamics study. *Chemistry—A European Journal*, 2008, 14(28): 8704-8714.
- [17] T. Hou, R. Yu. Molecular dynamics and free energy studies on the wild-type and double mutant HIV-1 protease complexed with amprenavir and two amprenavir-related inhibitors: Mechanism for binding and drug resistance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 50(6): 1177-1188.
- [18] J. Chen, J. Wang, B. Xu, et al. Insight into mechanism of small molecule inhibitors of the MDM2-p53 Interaction: Molecular dynamics simulation and free energy analysis. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2011: 46-53.
- [19] J. Wang, P. Morin, W. Wang, et al. Use of MM-PBSA in reproducing the binding free energies to HIV-1 RT of TIBO derivatives and predicting the binding mode to HIV-1 RT of efavirenz by docking and MM-PBSA. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(22): 5221-5230.
- [20] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, et al. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, 25(9): 1157-1174.
- [21] W. Wang, P. A. Kollman. Free energy calculations on dimer stability of the HIV protease using molecular dynamics and a continuum solvent model. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 303(4): 567-582.
- [22] J. Chen, M. Yang, G. Hu, et al. Insights into the functional role of protonation states in the HIV-1 protease-BEA369 complex: Molecular dynamics simulations and free energy calculations. *Journal of Molecular Modeling*, 2009, 15(10): 1245-1252.
- [23] J. Z. Chen, M. Y. Yang, C. H. Yi, et al. Molecular dynamics simulation and free energy calculations of symmetric fluoro-substituted diol-based HIV-1 protease inhibitors. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2009, 899(1-3): 1-8.
- [24] C. H. Yi, J. Z. Chen, S. H. Shi, et al. A computational analysis of pyrazole-based inhibitors binding to Hsp90 using molecular dynamics simulation and the MM-GBSA method. *Molecular Simulation*, 2010, 36(6): 454-460.
- [25] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, et al. AMBER 12. University of California, San Francisco, 2012.
- [26] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 2003, 24(16): 1999-2012.
- [27] T. G. Coleman, H. C. Mesick and R. L. Darby. Numerical integration. *Annals of Biomedical Engineering*, 1977, 5(4): 322-328.
- [28] W. Cheng, J. Chen, Z. Liang, et al. A computational analysis of interaction mechanisms of peptide and non-peptide inhibitors with MDMX based on molecular dynamics simulation. *Computational and Theoretical Chemistry*, 2012, 984: 43-50.
- [29] 程伟渊, 梁志强, 张庆刚等. p53-MDM2 相互作用的分子力学和动力学研究[J]. *原子与分子物理学报*, 2012, 29(3): 393-399.
- [30] Y. Ding, Y. Mei and J. Z. H. Zhang. Quantum mechanical studies of residue-specific hydrophobic interactions in p53-MDM2 binding. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(36): 11396-11401.