

www.pibb.ac.cn



# 基于各向异性网络模型研究δ阿片受体的 动力学与关键残基<sup>\*</sup>

陈 磊 巩卫康 李春华\*\* (北京工业大学环境与生命学部,北京100124)

**摘要 目的** 阿片受体是一种G蛋白偶联受体(GPCR),主要通过变构转导胞外区内源性配体结合信号,使其与胞内区效 应蛋白偶联来介导镇痛反应。δ阿片受体(DOP)除了与疼痛控制有关外,还与情绪控制有关,是一个很有吸引力的治疗靶 点。本文旨在分析 DOP 的结构动力学和变构效应。方法 首先利用各向异性网络模型(anisotropic network model, ANM) 对 DOP 进行建模,通过慢运动模式和快运动模式残基涨落探索 DOP 的结构动力学与功能的关系。然后,结合微扰响应扫描(perturbation-response scanning, PRS)对 DOP 中与变构通信相关的关键残基进行识别。结果 慢运动模式可以很好地识别 DOP 的结构以及功能性钠离子结合位点,快运动模式可以识别出对蛋白质结构稳定起重要作用的关键残基。残基运动相关 性分析发现胞外/胞内的跨膜螺旋与环状区域之间存在正相关性,这些区域相互作用促进 DOP 与配体的结合。PRS 分析中敏 感性高和效应性高的关键残基在 DOP 的变构通信中发挥重要作用。结论 这项工作有助于加强对δ阿片受体变构通讯机制的理解,并为药物设计提供有价值的信息。

关键词 δ阿片受体 (DOP),各向异性网络模型,微扰响应扫描,动力学,变构机制
 中图分类号 Q61
 DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0047

G蛋白偶联受体 (GPCRs) 是最大的膜蛋白家 族,调节许多生理过程中的信号通路,如行为、认 知和免疫反应<sup>[1]</sup>。它们在人体生理方面的中心调 节作用使其成为关键的药理学靶点<sup>[2]</sup>。阿片受体 是一种A类GPCR,包括μ(MOP)、δ(DOP)、 κ(KOP)和孤啡肽FQ(OFQ)成员<sup>[3]</sup>,与疼痛控 制相关。其中,DOP还与情绪控制有关,因此作 用于DOP的药物显示出额外的抗焦虑和抗抑郁作 用<sup>[4]</sup>。DOP的结构和变构动力学引起了广泛的 关注。

在实验研究方面,2012年,Granier等<sup>[5]</sup>利用 X射线去探索阿片类配体识别的保守片段,揭示了 对配体亚型选择性重要的结构特征。2014年, Fenalti等<sup>[6]</sup>以1.8Å的高分辨率解析了人源DOP与 拮抗剂 naltrindole7的复合物结构。2019年,Claff 等<sup>[4]</sup>研究了与DOP结合的激动剂,并确定了激动 剂结合以及受体激活的关键决定因素。在理论方 面,Shang等<sup>[7]</sup>使用分子动力学(molecular dynamics,MD)模拟研究了正构激动剂SNC-80存 在的情况下变构剂 BMS-986187 与 DOP 的结合过 程。利用多尺度模拟, Wang 等<sup>[8]</sup>分别研究了 MOP 和 DOP 二聚反应及其激活过程中的协同机 制。此外,对于重要的变构调节剂钠离子, Shang 等<sup>[3]</sup>利用全原子 MD 模拟观察到钠离子与 MOP、 KOP 和 DOP 的结合途径类似,还发现钠离子的结 合降低了特异性激动剂的结合水平。值得注意的 是,结合 MD 模拟和实验, Sun 等<sup>[9]</sup>探索了 DOP 中钠离子的变构调节机制,揭示了钠离子利用残基 Trp274<sup>648</sup>的独特构象将信号传递到 TM5 和 TM6。

MD模拟是一种耗时的方法,特别是对于生物 大分子。为了解决这个问题,科学家们提出粗粒化 模型。其中,弹性网络模型(elastic network model, ENM)是研究蛋白质内在动力学和功能相 关运动的一种特别有效的模型<sup>[10]</sup>。高斯网络模型

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金(31971180)资助项目。

<sup>\*\*</sup> 通讯联系人。

Tel.: 010-67392001, E-mail: chunhuali@bjut.edu.cn 收稿日期: 2022-02-11, 接受日期: 2022-05-05

(Gaussian network model, GNM)<sup>[11]</sup> 和各向异性网 络模型(anisotropic network model, ANM)<sup>[12]</sup> 是 两种广泛使用的ENM,它们可以计算蛋白质结构 所具有的动力学信息。相比而言,ANM包含了残 基运动的方向性,所以能够揭示的动力学信息更 多。通常,ENM获得的低频运动模式代表与蛋白 质功能相关的大规模集体运动,而高频模式反映蛋 白质结构的几何不规则性,其下的高涨落残基被认 为是对蛋白质稳定性重要的残基<sup>[13]</sup>。由于ENM的 高效性,基于它的微扰响应方法被发展用于研究蛋 白质的变构特性。2009年,Atilgan等<sup>[14]</sup>提出了微 扰响应扫描(perturbation-response scanning, PRS) 方法探索蛋白质残基对外界微扰的响应程度,目前 该方法已被广泛应用于识别变构调控中的关键 残基<sup>[15]</sup>。

本研究基于ANM探索了DOP的动力学与功能 特性。除此之外,结合PRS方法识别出对蛋白质的 变构通信具有重要作用的关键残基。

# 1 研究体系与方法

#### 1.1 研究体系

人源δ阿片受体 (DOP) 结构是由 X 射线衍射 实验解析出来的 (PDB ID: 4N6H) (图1), 共有 303个残基,包括 N 端 (残基 36~38),7个跨膜 (transmembrane helixes,TM) 螺旋 (残基 39~77、 82~112、117~152、161~187、205~243、249~287 和 293~321)、3 个 胞内环 (intracellular loops, ICLs) (残基 78~81、153~160和244~248)、3个胞 外环 (extracellular loops, ECLs) (残基 113~116、 188~204和288~292)、1个螺旋H8 (残基 322~335) 以及C端 (残基 336~338)。

这项工作采用了 Ballesteros 和 Weinstein 定义的 GPCRs 残基编号方案<sup>[16]</sup>。简单地说,每个残基的 上标都被标记为X.YY,其中数字 X 对应于残基存 在的 TM 螺旋(从1到7),YY 为相对于螺旋中最 保守的残基(YY 值为50)的位置。例如,如果 TM2 中最保守的残基是一个天冬氨酸(残基号 95),则其标识符为2.50,即Asp95<sup>2.50</sup>。对于一个残 基 Asn310<sup>7.45</sup>,表示在 TM7 中最保守残基 Pro315<sup>7.50</sup> 之前的第5个残基处。

#### 1.2 各向异性网络模型(ANM)

在 ANM 中,蛋白质被抽象为一个弹性网络, 其中氨基酸用一个节点来表示(通常选用 C<sub>a</sub>原子 作为节点),当两个残基节点间的距离小于某一截



# Fig. 1 Crystal structure of $\delta$ opioid receptor ( DOP ) $(\mbox{ PDB ID}:4N6H\ )$

The seven transmembrane helixes (TM1-7) are connected by 3 extracellular loops (ECL1-3) and 3 intracellular loops (ICL1-3).

断半径时(本文选取17Å),它们之间用一个弹簧 相连,所有弹簧的弹性系数相同。在ANM中,整 个体系的势能函数为:

$$V_{\rm ANM} = \frac{1}{2} \gamma \sum_{ij}^{N} (R_{ij} - R_{ij}^{0})^2$$
(1)

其中,  $R_{ij}$ 和 $R_{ij}$ 分别是节点i和j之间的瞬时和平衡 距离,  $\gamma$ 是弹簧的弹性系数。蛋白质的运动模式是 由 Hessian矩阵 H所决定,矩阵的各元素为体系势 函数对位置的二阶偏导,具体形式如下:

$$\boldsymbol{H} = \begin{pmatrix} h_{11} & h_{12} \cdots h_{1N} \\ h_{21} & h_{22} \cdots h_{2N} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ h_{N1} & h_{N2} \cdots h_{NN} \end{pmatrix}$$
(2)

其中,每一个元素 $h_{ij}$ 是3×3的子矩阵。当 $i \neq j$ 时,  $h_{ii}$ 可以表示为:

$$h_{ij} = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial x_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial y_i \partial x_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial y_i \partial y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial y_i \partial z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial z_i \partial x_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial z_i \partial y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial z_i \partial z_j} \end{pmatrix}$$
(3)

当i=j时,  $h_i$ 可以表示为:

$$h_{ii} = -\sum_{i \neq j} h_{ij} \tag{4}$$

对Hessian矩阵进行分解可获得3N个本征值和

本征向量。本征值小的本征向量对应蛋白质的慢运 动模式,与功能有关;本征值大的对应蛋白质的快 运动模式,与结构稳定有关。 在ANM中, 残基的均方涨落以及残基间涨落 的交叉相关性为:

$$\left\langle \Delta \boldsymbol{R}_{i} \cdot \Delta \boldsymbol{R}_{i} \right\rangle = \frac{k_{B}T}{\gamma} \left( \boldsymbol{H}_{3i-2,3i-2}^{-1} + \boldsymbol{H}_{3i-1,3i-1}^{-1} + \boldsymbol{H}_{3i,3i}^{-1} \right) = \frac{k_{B}T}{\gamma} \sum_{k=7}^{N} \left( \lambda_{k}^{-1} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i-2} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i-2} + \lambda_{k}^{-1} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i-1} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i-1} + \lambda_{k}^{-1} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i} \right)$$

$$\left\langle \Delta \boldsymbol{R}_{i} \cdot \Delta \boldsymbol{R}_{j} \right\rangle = \frac{k_{B}T}{\gamma} \left( \boldsymbol{H}_{3i-2,3j-2}^{-1} + \boldsymbol{H}_{3i-1,3j-1}^{-1} + \boldsymbol{H}_{3i,3j}^{-1} \right) = \frac{k_{B}T}{\gamma} \sum_{k=7}^{N} \left( \lambda_{k}^{-1} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i-2} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3j-2} + \lambda_{k}^{-1} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i-1} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3j-1} + \lambda_{k}^{-1} \left[ \boldsymbol{u}_{k} \right]_{3i} \right]$$

$$(6)$$

其中, $\lambda_k^{-1}$ 是**H**矩阵的第k个本征值的倒数,  $[u_k]_{3i}$ 是**H**矩阵的第k个本征向量中的第3i个元素。

归一化的交叉相关性为:

$$\boldsymbol{C}_{ij} = \frac{\left\langle \Delta \boldsymbol{R}_i \cdot \Delta \boldsymbol{R}_j \right\rangle}{\left[ \left\langle \left( \Delta \boldsymbol{R}_i^2 \right) \right\rangle \times \left\langle \left( \Delta \boldsymbol{R}_j^2 \right) \right\rangle \right]^{\frac{1}{2}}}$$
(7)

该值的取值范围为-1~1。正负值分别表示残 基沿相同和相反的方向运动。绝对值越高,两个残 基的相关性越强。零值意味着残基的运动是完全不 相关的。

### 1.3 微扰响应扫描模型 (PRS)

线性响应理论(LRT)是一种线性扰动蛋白质 残基后,预测构象变化的方法<sup>[17]</sup>。基于 LRT 的微 扰响应扫描(PRS)方法被提出<sup>[15]</sup>,用于研究蛋 白质的变构调控并识别关键残基。基于胡克定律  $F = H \Delta R$ ,在受到外力扰动时,残基位置的改变 量为  $\Delta R$ ,其中 H是 ANM 中  $3N \times 3N$ 的 Hessian 矩 阵。当对网络中的一个残基*i*施加外力时:

 $F^{i} = (000\cdots\Delta F_{x}^{i}\Delta F_{y}^{i}\Delta F_{z}^{i}\cdots000)$ (8) 观测到其他残基的响应:

 $\Delta \boldsymbol{R}^i = \boldsymbol{H}^{-1} \boldsymbol{F}^i \tag{9}$ 

其中, Δ**R**<sup>'</sup>是在外力对残基*i* 扰动后, 所有残基位置的改变量。

对蛋白质的残基*i*施加一个力*F*,可以得到1 个其他残基产生的3N维的位移响应向量 $\Delta R$ ,依次 扰动所有残基可以得到位移响应矩阵 $\Delta R$ 。具体实 施中,在每个残基上施加7个单位向量的外力,即 方向为(1,0,0)、(0,1,0)、(0,0,1)、(1, 1,0)、(1,0,1)、(0,1,1)和(1,1,1),之 后对7次微扰得到的7个响应矩阵 $\Delta R$ 求平均,然 后对这个平均矩阵每一行中的元素相对于对角线元 素进行归一化,得到一个 $N \times N$ 阶的响应矩阵*P*, 对其数字进行颜色编码即为热图,热图中第*ij*个元 素表示微扰节点*i*, 节点*j*产生的平均响应。归一化 后的**P**矩阵中每一列的平均值代表了该列对应残基 的敏感性,即残基响应其他微扰残基的倾向性。所 有残基的敏感性就组成了敏感性特征曲线。该曲线 峰值对应的残基被认为是蛋白质变构中的功能性运 动位点。相似的,每一行的平均值代表了该行对应 残基的效应性,即衡量微扰残基影响其他残基动力 学的能力。相应曲线的峰值被认为对信号传输起重 要作用的热点残基<sup>[18]</sup>。

基于上述方法的描述,本文使用 MATLAB R2019a 对 ANM 和 PRS 的相关程序进行编写并在 DOP 这个体系上进行研究。

# 2 结果与讨论

# 2.1 基于ANM的实验与理论B-factor的比较

温度因子 (B-factor) 可以反映生物大分子的 局部结构的柔性。本文构建了DOP的ANM模型, 选用残基的C。原子作为节点。传统的ANM只有一 个截断半径参数,对截断半径的选取方法分为使用 经验值<sup>[19]</sup>和在一定范围内通过最大化理论值与实 验值的相关性进行寻优<sup>[12]</sup>。后一种方法能够提高 ANM 构建蛋白质模型的准确性, 所以在这个工作 中,采用寻优的方法对截断半径进行优化,其寻优 范围为: 6~24 Å, 步长为1 Å。在截断半径为17 Å 时,ANM计算的理论B-factor与实验B-factor的皮 尔森相关系数 (Pearson's correlation coefficient, PCC)可以达到最大值(0.64),因此,本研究选 择17Å。图2显示了在最优的参数下ANM得到的 理论和实验 B-factor 比较图。从图2可以看出, ANM 可以较好地再现 DOP 的柔性信息, TM 区域 柔性最小, ECL 和 ICL 柔性最大, 这与实验结果 一致<sup>[20]</sup>。





#### 2.2 基于ANM的DOP慢运动模式分析

全局慢运动模式代表大范围的集体运动,通常 与功能有关<sup>[13]</sup>。为研究 DOP 的功能动力学特性, 计算了 DOP 在前两个慢运动模式下的涨落(图 3a, c)。7个局部最小值分别对应于 TM1~7,峰值对应 于 ECL 和 ICL 区域,中间区域的局部最小值对应于 ECL2 中的β片层,表明 ANM 对 DOP 的结构有较 好的识别能力。

有趣的是,发现其中几个涨落较小的区域与 DOP的功能相关(图3a中圆圈)。第1个区域(残 基82~97)位于TM2,具有一定的保守性,其中 Asp95<sup>2.50</sup>是一个关键的钠结合位点,实验发现其突 变可以破坏"钠效应"。第2个区域(残基134~ 144)位于TM3,其中残基Ser135<sup>3.39</sup>、Asn131<sup>3.35</sup>和 Asp95<sup>2.5</sup>形成了第1个钠离子结合位点。位于TM7 中的第3个区域(残基301~320)也在钠离子转运 中起着重要作用,其中残基Asn310<sup>7.45</sup>和Asn311<sup>7.46</sup> 形成了钠离子的第2个配位壳,位于NP<sup>7.50</sup>xxY基序 的残基Asn314<sup>7.49</sup>和Tyr318<sup>7.53</sup>可以调节变构钠离子 结合,与GPCR的激活有关<sup>[21]</sup>。

### 2.3 基于ANM的DOP的快运动模式分析

快运动模式对应的是蛋白质局部结构的不规则 性<sup>[22]</sup>。在快运动模式下,运动幅度较大的残基通 常是热点残基,对稳定蛋白质结构至关重要<sup>[23]</sup>。 图 3b显示了前两个快运动模式的涨落分布图。由 图 3b可以看出,11个峰值区域对应的中心残基分 别是 Asn67<sup>1.50</sup>、 Ile88<sup>2.43</sup>、 Leu91<sup>2.46</sup>、 Asp95<sup>2.50</sup>、 Asp128<sup>3.32</sup>、 Asn131<sup>3.35</sup>、 Ser135<sup>3.39</sup>、 Val266<sup>6.40</sup>、 Yyr308<sup>7.43</sup>、Ser311<sup>7.46</sup>、Asn314<sup>7.49</sup>。这些残基分布在 DOP跨膜螺旋的中心区域。

接下来,将根据现有的实验和理论数据,对识 别出的关键残基功能进行讨论。高度保守的残基 Asn67<sup>1.50</sup>是DOP I-I二聚体的一个结合热点,对于 稳定 DOP 的二级结构具有重要作用<sup>[24]</sup>。在钠离子 转运的过程中, 它除了与两个钠离子配位壳残基结 合之外,还与高度保守的残基如Leu91246形成氢 键<sup>[25]</sup>。残基 Asp95<sup>2.50</sup>、Asn131<sup>3.35</sup> 和 Ser135<sup>3.39</sup> 与两 个保守的水分子组成钠离子的第1个结合口袋[21]。 残基Asp128332是DOP与抑制剂naltrindole7的结合 位点<sup>[5]</sup>。在激动剂 DPI-287 与 DOP 对接的过程中, Yyr308743与DPI-287形成氢键,使复合物的结构更 稳定<sup>[26]</sup>。Ser311<sup>7.46</sup>和Asn314<sup>7.49</sup>是第2个钠离子配 位口袋处残基,在DOP激活的过程中,Asn3147.49 的位移会导致活性 GPCR 的变构钠结合口袋崩 場<sup>[26]</sup>。Ile88<sup>2.43</sup>和Val266<sup>6.40</sup>分别位于TM2和TM6, 目前还没有关于它们对DOP变构作用的研究,值 得被进一步探讨。

综上所述,识别的关键残基在快运动模式下具 有高度的活性,在稳定 DOP 结构方面发挥着重要 作用或者在 DOP 与配体相互作用中扮演重要角色。

### 2.4 运动相关性分析

为了研究蛋白质运动过程中残基之间的关联 性,通过式(7)计算了所有残基之间的交叉相关 系数,并用二维彩图形式显示出来(图4a)。因为 低频运动模式常常与蛋白质功能有关,选择对残基 涨落贡献刚超过50%的低频运动模式进行运动相 关性的分析是一种通常的做法,可以提高信噪 比<sup>[27]</sup>,所以本文选取对涨落贡献刚大于50%的运 动模式计算运动相关性。从图4a中可以看出,对 角线区域被分成7部分,垂直于对角线的部分显示 相邻 TM 螺旋之间具有强的正相关性,表明 ANM 可以对DOP的结构具有较好的识别能力。除此之 外, 胞外/胞内跨膜螺旋与环状区域之间也具有一 定的正相互作用(图中橙红色区域),可能是因为 DOP 的跨膜螺旋部分区域在空间上是相邻的。特 别是位于TM2的残基Asp95<sup>2.50</sup>、位于TM3的 Asn1313.35 和 Ser1353.39 与位于 TM6 和 TM7 的 Trp274<sup>6.48</sup>、Ser311<sup>7.46</sup>和Asn314<sup>7.49</sup>呈较强的正相关, 研究表明这些残基位于两个钠离子结合口袋处 [21]。



Fig. 3 Residue mean square fluctuation (MSF) profiles for the DOP

(a) Fluctuation distribution of the first two slow motion modes. (b) The fluctuation distribution of the first two fast motion modes. (c) First two slowest motion modes (depicted with a cone model) mapped on the DOP structure. The cone's length is proportional to the motion magnitude, and the cone's orientation indicates the motion direction.

在 DOP 非活性构象中, Leu246<sup>ICL3</sup>和 Val243<sup>ICL3</sup>与 Val150<sup>3.54</sup>形成疏水簇。ICL3还通过 Leu246<sup>ICL3</sup>和 Val150<sup>3.54</sup>和 Arg239<sup>5.66</sup>之间的水介导氢键网络与 TM3 相互作用。这些结果表明, ICL3、TM3 和 TM5存在相互作用,进一步稳定蛋白质结构<sup>[21]</sup>。 Yyr129<sup>3.33</sup>、Met132<sup>3.36</sup>、Ile304<sup>7.39</sup>和 Yyr308<sup>7.43</sup>形成一 个结合口袋,它与DPI-287形成了疏水相互作用。 Lys214<sup>5.39</sup>、His278<sup>6.52</sup>和 Yyr129<sup>3.33</sup>与KGCHM07形成 一个极性相互作用网络<sup>[26]</sup>。总之, DOP 的跨膜螺 旋之间的相互运动不仅可以稳定构象状态,还能促 进与配体之间的结合。

#### 2.5 微扰响应扫描分析

使用PRS方法研究DOP中变构信号的可能途径。该方法是基于LRT,已成功地用于揭示变构信号转导过程中的关键区域<sup>[15]</sup>。本文对DOP中的残

基逐个微扰可以得到一个响应矩阵*P*(研究体系与 方法 1.3)。使用矩阵*P*直接可以画出 DOP 的 PRS 响应热图(图4b)。在 PRS 图谱中,第*ij*个元素表 示是扰动残基*i*对*j*产生的影响,它衡量的是蛋白 质结构的敏感性和效应性。

经过分析,发现 DOP 中具有大的敏感性残基 (变构信号的潜在接收器)主要分布在胞外环和胞 内环区域(图4c),然而具有大的效应性残基(传 播变构信号)主要分布在跨膜螺旋区域(图4d)。 图4b的顶部是敏感性曲线图。敏感性高的残基有6 簇(图4c),中心残基是Thr78<sup>iCL1</sup>、Glu112<sup>2.67</sup>、 Asp158<sup>iCL2</sup>、Asp193<sup>ECL2</sup>、Arg244<sup>iCL3</sup>、Asp290<sup>ECL3</sup>。 这些残基在前面的慢运动模式涨落分析中位于大的 柔性区域,因此对于蛋白质的功能性运动具有一定 作用。其中残基Lys79<sup>2.49</sup>在形成 DOP 的 I-I 二聚体 时发挥作用<sup>[24]</sup>。在正变构调节剂BMS-986187与 DOP结合过程中,残基Glu112<sup>2.67</sup>与BMS-986187形 成疏水相互作用<sup>[28]</sup>。口袋残基Trp114<sup>ECL1</sup>、 Ile289<sup>ECL3</sup>和Arg291<sup>ECL3</sup>分别与配体KGCH07形成ππ、疏水和阳离子-π相互作用,可以进一步稳定 DOP的激活状态<sup>[26]</sup>。由于ECL2是β链折叠,是所 有阿片受体亚型的典型<sup>[29]</sup>,负责识别多种配体, 因此位于此处的残基如Asp193<sup>ECL2</sup>可能参与配体的 结合。残基Arg244<sup>ICL3</sup>通过与TM6和TM7的其他残 基形成广泛的氢键网络,在稳定ICL3方面起着关 键作用,使DOP稳定在非活性状态<sup>[21]</sup>。在研究钠 离子与DOP结合的MD模拟实验中发现, Asp293<sup>ECL3</sup>周围的钠密度较高,因此这个位点可能 与钠离子结合有关<sup>[25]</sup>。

图 4b 的右边是效应性曲线图。效应性高的残 基有 12 簇 (图 4d),中心残基分别是 Ser42<sup>1.25</sup>、 Gly63<sup>1.46</sup>、 Asp95<sup>2.50</sup>、 Ala117<sup>2.53</sup>、 Asn131<sup>3.35</sup>、 Cys151<sup>3.36</sup>、 Asp210<sup>5.35</sup>、 Met236<sup>5.61</sup>、 Leu240<sup>5.67</sup>、

Leu246<sup>ICL3</sup>、Arg257<sup>6.31</sup>和 Ser311<sup>7.46</sup>。残基 Ser42<sup>1.25</sup>是 DOP形成A-I二聚体的界面残基,残基Gly63<sup>1.46</sup>是 DOP形成I-I二聚体时的界面残基,这些残基可以 促进二聚体的形成<sup>[24]</sup>。在这些效应残基中, Asp95<sup>2.50</sup>和Asn131<sup>3.35</sup>是组成第1个钠离子结合口袋 的残基, Asn310745是组成第2个钠离子结合口袋的 残基<sup>[21]</sup>。Ala117<sup>2.53</sup>是激活状态下的MOP单体形成 A-I二聚体时的界面残基<sup>[24]</sup>。MD模拟研究发现, Cys151<sup>3.36</sup>对阿片受体与芬太尼的识别和相互作用 至关重要<sup>[30]</sup>。Asp210<sup>5.35</sup>可以与激动剂KGCHM07 形成水介导的盐桥相互作用,稳定 DOP 的激活构 象<sup>[26]</sup>。Leu246<sup>ICL3</sup>位于双亮氨酸基序(Leu245<sup>ICL3</sup>~ Leu246<sup>ICL3</sup>)中,实验发现基序的缺失或Leu245的 突变会减缓 DOP 的溶酶体靶向性<sup>[31]</sup>。残基 Arg257<sup>6.31</sup>与Leu240<sup>5.67</sup>、Arg244<sup>ICL3</sup>和Val243<sup>ICL3</sup>形成 氢键网络,与Asp253<sup>627</sup>形成盐桥,它连接TM5和 TM6的胞内结构,将DOP稳定在非活性状态<sup>[21]</sup>。





(a) The cross-correlation map for DOP. The regions marked by black oval box in the figure are the parts of key analysis. (b) PRS heat map for DOP. The strongest disturbance (dark red) is shown in the figure, which describes the dynamic influence of disturbance residue i on residue j. Sensitivity and effectiveness are shown along the top and right, and their values are mapped to (c) and (d), respectively. The highest value on the sensitivity curve corresponds to the strongest sensor, while the highest value of effectiveness corresponds to the strongest effector.

进一步分析发现效应性高的残基中也有部分残 基处在柔性较高的区域,这些区域与敏感性高的区 域共同发挥功能性作用,如效应性强的残基 Ser42<sup>1.25</sup>、Gly63<sup>1.46</sup>和敏感性强的残基Lys79<sup>2.49</sup>共同 耦合促进DOP二聚体的形成<sup>[24]</sup>。效应性强的残基 Asp95<sup>2.50</sup>、Asn131<sup>3.35</sup>、Ser311<sup>7.46</sup>和敏感性强的残基 Asp293<sup>ECL3</sup>共同作用组成DOP中钠离子结合 口袋<sup>[21]</sup>。

基于以上分析发现,通过 PRS 确定的关键残 基在 DOP 的二聚化、功能状态稳定以及与变构配 体(如钠离子和激动剂)的相互作用中起着重要作 用,这些都参与了 DOP 的变构调节。

#### 3 结 论

本工作探索了人DOP的动力学特性,以及对 蛋白质变构具有重要作用的关键残基。首先,根据 DOP的结构构建出最优参数下的 ANM,实验与理 论B-factor的PCC值达到0.64,并且识别出了DOP 中的柔性区域,表明ANM可以较好的研究 DOP 的 动力学特性。然后,从慢运动模式的涨落图可以很 好地识别DOP的结构域,包括7个TM螺旋、3个 ICL和3个ECL。有趣的是,发现钠离子结合口袋 处具有最小的运动性, 这有助于分析钠离子的变构 调节。此外,从快运动模式的涨落曲线来看,模式 中的活性位点主要分布在TM1~3、TM6和TM7 中,这些区域在稳定 DOP 结构或与变构配体(如 拮抗剂和钠离子)的复合物结构方面起着重要作 用。接着对蛋白质的运动相关性的分析可以看出胞 外/胞内跨膜螺旋与环状区域之间存在较强的相互 作用,这有助于蛋白质的构象稳定以及与配体的结 合。最后采用 PRS 方法对 DOP 进行微扰, 识别出 的关键残基已经在实验或理论上发现直接参与 DOP 二聚化和与配体结合,认为这些关键残基对 于DOP的变构通信至关重要。这项工作有助于对δ 阿片受体变构调节的物理机制的理解,并为药物设 计提供有价值的信息。

# 参考文献

- Conn P M, Ulloa-Aguirre A, Ito J, *et al.* G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue *in vivo*. Pharmacol Rev, 2007, **59**(3): 225-250
- [2] Hauser A S, Attwood M M, Rask-Andersen M, et al. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(12): 829-842

- [3] Shang Y, Lerouzic V, Schneider S, *et al.* Mechanistic insights into the allosteric modulation of opioid receptors by sodium ions. Biochemistry, 2014, 53(31): 5140-5149
- [4] Claff T, Yu J, Blais V, et al. Elucidating the active delta-opioid receptor crystal structure with peptide and small-molecule agonists. Sci Adv, 2019, 5(11): 9115
- [5] Granier S, Manglik A, Kruse A C, *et al.* Structure of the deltaopioid receptor bound to naltrindole. Nature, 2012, **485**(7398): 400-404
- [6] Fenalti G, Giguere P M, Katritch V, et al. Molecular control of δopioid receptor signalling. Nature, 2014, 506(7487): 191-196
- Shang Y, Yeatman H R, Provasi D, *et al.* Proposed mode of binding and action of positive allosteric modulators at opioid receptors. ACS Chem Biol, 2016, 11(5): 1220-1229
- [8] Wang L, Yuan Y, Chen X, *et al.* Probing the cooperative mechanism of the  $\mu$   $\delta$  opioid receptor heterodimer by multiscale simulation. Phys Chem Chem Phys, 2018, **20**(47): 29969-29982
- [9] Sun X, Laroche G, Wang X, et al. Propagation of the allosteric modulation induced by sodium in the delta-opioid receptor. Chemistry, 2017, 23(19):4615-4624
- [10] Tirion M M. Large amplitude elastic motions in proteins from a single-parameter, atomic analysis. Phys Rev Lett, 1996, 77(9): 1905-1908
- [11] Bahar I, Atilgan A R, Erman B. Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential. Fold Des, 1997, 2(3): 173-181
- [12] Atilgan A R, Durell S R, Jernigan R L, et al. Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model. Biophys J, 2001, 80(1): 505-515
- [13] Bahar I, Atilgan A R, Demirel M C, et al. Vibrational dynamics of folded proteins: significance of slow and fast motions in relation to function and stability. Phys Rev Lett, 1998, 80(12): 2733-2736
- [14] Atilgan C, Atilgan A R. Perturbation-response scanning reveals ligand entry-exit mechanisms of ferric binding protein. PLoS Comput Biol, 2009, 5(10): e1000544
- [15] Penkler D, Sensoy O, Atilgan C, et al. Perturbation-response scanning reveals key residues for allosteric control in hsp70. J Chem Inf Model, 2017, 57(6): 1359-1374
- [16] Ballesteros J A, Weinstein H J M I N. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. Methods Neurosci, 1995, 25(5): 366-428
- [17] Ikeguchi M, Ueno J, Sato M, *et al*. Protein structural change upon ligand binding: linear response theory. Phys Rev Lett, 2005, 94(7): 078102
- [18] Dutta A, Krieger J, Lee J Y, et al. Cooperative dynamics of intact AMPA and NMDA glutamate receptors: similarities and subfamily-specific differences. Structure, 2015, 23(9): 1692-1704
- [19] Eyal E, Lum G, Bahar I. The anisotropic network model web server at 2015 (ANM 2.0). Bioinformatics, 2015, 31(9): 1487-1489
- [20] Fenalti G, Zatsepin N A, Betti C, et al. Structural basis for

bifunctional peptide recognition at human delta-opioid receptor. Nat Struct Mol Biol, 2015, **22**(3): 265-268

- [21] Fenalti G, Giguere P M, Katritch V, et al. Molecular control of delta-opioid receptor signalling. Nature, 2014, 506(7487): 191-196
- [22] Li X Y, Zhang J C, Zhu Y Y, et al. Domain motions and functionally-key residues of L-alanine dehydrogenase revealed by an elastic network model. Int J Mol Sci, 2015, 16(12): 29383-29397
- [23] Haliloglu T, Keskin O, Ma B Y, et al. How similar are protein folding and protein binding nuclei? Examination of vibrational motions of energy hot spots and conserved residues. Biophys J, 2005, 88(3): 1552-1559
- [24] Wang L, Yuan Y, Chen X, *et al.* Probing the cooperative mechanism of the mu-delta opioid receptor heterodimer by multiscale simulation. Phys Chem Chem Phys, 2018, 20(47): 29969-29982
- [25] Shang Y, Lerouzic V, Schneider S, *et al.* Mechanistic insights into the allosteric modulation of opioid receptors by sodium ions. Biochemistry, 2014, 53(31): 5140-5149
- [26] Claff T, Yu J, Blais V, et al. Elucidating the active delta-opioid

receptor crystal structure with peptide and small-molecule agonists. Sci Adv, 2019, **5**(11): eaax9115

- [27] Gong W K, Liu Y, Zhao Y P, et al. Equally weighted multiscale elastic network model and its comparison with traditional and parameter-free models. J Chem Inf Model, 2021, 61(2): 921-937
- [28] Shang Y, Yeatman H R, Provasi D, et al. Proposed mode of binding and action of positive allosteric modulators at opioid receptors. ACS Chem Biol, 2016, 11(5): 1220-1229
- [29] Lee Y, Basith S, Choi S. Recent advances in structure-based drug design targeting class a g protein-coupled receptors utilizing crystal structures and computational simulations. J Med Chem, 2018, 61(1): 1-46
- [30] Eshleman A J, Nagarajan S, Wolfrum K M, et al. Affinity, potency, efficacy, selectivity, and molecular modeling of substituted fentanyls at opioid receptors. Biochem Pharmacol, 2020, 182: 114293
- [31] Xie W Y, He Y, Yang Y R, *et al.* Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. J Neurosci, 2009, 29(11): 3551-3564

# Dynamics and Key Residues of δ Opioid Receptor Investigated by Anisotropic Network Model<sup>\*</sup>

CHEN Lei, GONG Wei-Kang, LI Chun-Hua\*\*

(Faculty of Environmental and Life Sciences, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Opioid receptor, a kind of G protein-coupled receptors (GPCRs), mainly mediates an Abstract Objective analgesic response via allosterically transducing the signal of endogenous ligand binding in the extracellular domain to couple to effector proteins in the intracellular domain.  $\delta$  opioid receptor (DOP) is associated with emotional control besides pain control, which makes it an attractive therapeutic target. However, its allosteric mechanism and key residues responsible for structural stability and signal transmission are not completely clear. This paper aims to analyze the structural dynamics and allosteric effects of DOP. Methods Firstly, the relationships between DOP structure dynamics and function were explored by means of residue fluctuations in slow motion mode and fast motion mode from the anisotropic network model (ANM). Then, perturbation response scanning (PRS) was used to identify key residues related to allosteric communication in DOP. The DOP segments and functional sodium-binding sites can be well identified by the slowest motion **Results** modes, and the key residues that play a crucial role in protein structural stability can be identified by the fastest motion modes. Correlation analysis of residue motions reveals positive correlations between extracellular/ intracellular transmembrane helices and loops, which promote the DOP structural stability and the binding of DOP with ligands. Key residues with high sensitivity and high effectiveness in PRS analysis play an important role in the allosteric communication of DOP. Conclusion This work sheds light on the allosteric communication mechanism of  $\delta$  opioid receptor and provides valuable information for drug design.

Key words  $\delta$  opioid receptor (DOP), anisotropic network model, perturbation-response scanning, dynamics, allosteric mechanism

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0047

<sup>\*</sup> This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31971180).

<sup>\*\*</sup> Corresponding author.

Tel:86-10-67392001, E-mail: chunhuali@bjut.edu.cn

Received: February 11, 2022 Accepted: May 5, 2022