



生物化学与生物物理进展  
*Progress in Biochemistry and Biophysics*  
ISSN 1000-3282, CN 11-2161/Q

## 《生物化学与生物物理进展》网络首发论文

题目: 基于各向异性网络模型研究  $\delta$  阿片受体的动力学与关键残基  
作者: 陈磊, 巩卫康, 李春华  
DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0047  
收稿日期: 2022-02-11  
网络首发日期: 2022-05-07  
引用格式: 陈磊, 巩卫康, 李春华. 基于各向异性网络模型研究  $\delta$  阿片受体的动力学与关键残基[J/OL]. 生物化学与生物物理进展.  
<https://doi.org/10.16476/j.pibb.2022.0047>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## 基于各向异性网络模型研究 $\delta$ 阿片受体的动力学与关键残基

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质偶联来介导镇痛反应。 $\delta$  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的识别 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 分析中的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  $\delta$  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**  $\delta$  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

学科分类号 Q61

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0047

\*基金项目: 国家自然科学基金 (31971180) 资助项目

\*\*联系人: 李春华, Tel.: +86-010-67392001, E-mail: chunhuali@bjut.edu.cn

收稿日期: 2022-02-11, 接受日期: 2022-05-05

# Dynamics and Key Residues of $\delta$ Opioid Receptor Investigated by Anisotropic Network Model

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

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

## Abstract

**Objective** Opioid receptor, a kind of G protein-coupled receptors (GPCRs), mainly mediates an 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.

**Results** The DOP segments and functional sodium-binding sites can be well identified by the slowest motion 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.

**Conclusions** 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

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31971180).

\*\* Corresponding author: LI Chunhua. Tel.: +86-010-67392001, E-mail: chunhuali@bjut.edu.cn

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

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>。它们在调节人体生理方面的中心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  $\mu$  (MOP)、 $\delta$  (DOP)、 $\kappa$  (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 等人利用 X-ray 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<sup>[5]</sup>。2014 年, Fenalti 等人以 1.8 Å 的高分辨率解析了人源 DOP 与拮抗剂 naltrindole7 的复合物结构<sup>[6]</sup>。2019 年, Claff 等人研究了与 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<sup>[4]</sup>。在理论方面, Shang 等人使用分子动力学 (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<sup>[7]</sup>。利用多尺度模拟, Wang 等人分别研究了 MOP 和 DOP 二聚反应及其激活过程中的协同机制<sup>[8]</sup>。此外, 对于重要的变构调节剂钠离子, Shang 等人利用全原子 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<sup>[3]</sup>。值得注意的是, 结合 MD 模拟和实验, Sun 等人探索了 DOP 中钠离子的变构调节机制, 揭示了钠离子利用残基 Trp274<sup>6,48</sup> 的独特构象将信号传递到 TM5 和 TM6<sup>[9]</sup>。

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 (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 等人提出了微扰响应扫描 (perturbation-response scanning, PRS) 方法<sup>[14]</sup>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>。

在本研究中，我们基于 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  $\delta$  阿片受体(DOP)结构是由 X-ray 实验解析出来的 (PDB ID: 4N6H)，如图 1 所示，共有 303 个残基，包括 N 端 (残基 36-38)，7 个跨膜 (transmembrane helices, 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。

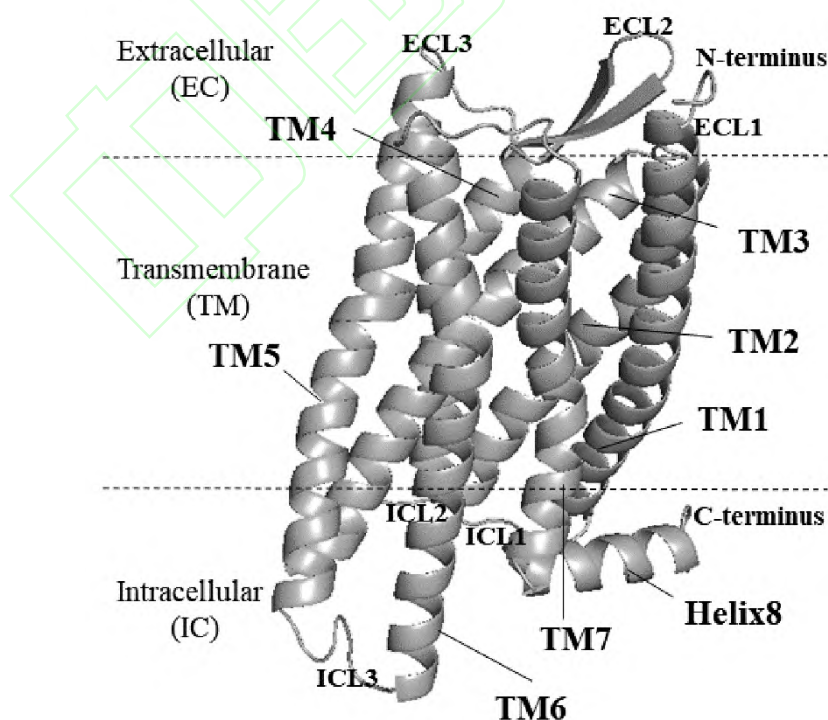


图 1.  $\delta$  阿片受体 (DOP) 的晶体结构 (PDB ID: 4N6H)。7 个跨膜螺旋 (TM1-7) 由 3 个细

胞外环 (ECL1-3) 和 3 个细胞内环 (ICL1-3) 连接

**Fig. 1** Crystal structure of  $\delta$  opioid receptor (DOP) (PDB ID: 4N6H). The seven transmembrane helices (TM1-7) are connected by three extracellular loops (ECL1-3) and three intracellular loops (ICL1-3)

## 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  $C_\alpha$  原子作为节点), 当两个残基节点间的距离小于某一截断半径时 (本文选取  $17\text{\AA}$ ), 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:

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

其中,  $R_{ij}$  和  $R_{ij}^0$  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  $\mathbf{H}$  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:

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

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

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

当  $i = j$  时,  $h_{ii}$  可以表示为:

$$h_{ii} = - \sum_{i \neq j} h_{ij} \quad (4)$$

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:



$$\begin{aligned}
\langle \Delta \mathbf{R}_i \cdot \Delta \mathbf{R}_i \rangle &= \frac{k_B T}{\gamma} \left( \mathbf{H}_{3i-2,3i-2}^{-1} + \mathbf{H}_{3i-1,3i-1}^{-1} + \mathbf{H}_{3i,3i}^{-1} \right) \\
&= \frac{k_B T}{\gamma} \sum_{k=7}^N (\lambda_k^{-1} [u_k]_{3i-2} [u_k]_{3i-2} + \lambda_k^{-1} [u_k]_{3i-1} [u_k]_{3i-1} + \lambda_k^{-1} [u_k]_{3i} [u_k]_{3i})
\end{aligned} \tag{5}$$

$$\begin{aligned}
\langle \Delta \mathbf{R}_i \cdot \Delta \mathbf{R}_j \rangle &= \frac{k_B T}{\gamma} \left( \mathbf{H}_{3i-2,3j-2}^{-1} + \mathbf{H}_{3i-1,3j-1}^{-1} + \mathbf{H}_{3i,3j}^{-1} \right) \\
&= \frac{k_B T}{\gamma} \sum_{k=7}^N (\lambda_k^{-1} [u_k]_{3i-2} [u_k]_{3j-2} + \lambda_k^{-1} [u_k]_{3i-1} [u_k]_{3j-1} + \lambda_k^{-1} [u_k]_{3i} [u_k]_{3j})
\end{aligned} \tag{6}$$

其中,  $\lambda_k^{-1}$  是  $\mathbf{H}$  矩阵的第  $k$  个本征值的倒数,  $[u_k]_{3i}$  是  $\mathbf{H}$  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:

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta \mathbf{R}_i \cdot \Delta \mathbf{R}_j \rangle}{\left[ \langle (\Delta \mathbf{R}_i^2) \rangle \times \langle (\Delta \mathbf{R}_j^2) \rangle \right]^{1/2}} \tag{7}$$

该值的取值范围为-1 到 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  $\mathbf{F} = \mathbf{H} \Delta \mathbf{R}$ , 在受到外力扰动时, 残基位置的改变量为  $\Delta \mathbf{R}$ , 其中  $\mathbf{H}$  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:

$$\mathbf{F}^i = (000 \cdots \Delta F_x^i \Delta F_y^i \Delta F_z^i \cdots 000)^T \tag{8}$$

观测到其他残基的响应:

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

其中,  $\Delta \mathbf{R}^i$  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  $\mathbf{F}^i$ , 可以得到一个其他残基产生的  $3N$  维的位移响应向量  $\Delta \mathbf{R}^i$ , 依次扰动所有残基可以得到位移响应矩阵  $\Delta \mathbf{R}$ 。具体实施中, 我们在每个残基上施加七个单位向量的外力, 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, 即残基响应其它微扰残基的倾向性。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它残基动力学的的能力。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, 我们使用 MATLAB R2019a 对 ANM 和 PRS 的相关的程序进行编写并在 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。我们构建了 DOP 的 ANM 模型, 选用残基的  $C_\alpha$  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, 我们采用寻优的方法对截断半径进行优化, 其寻优范围为: 6-24Å, 步长为 1Å, 在截断半径为 17Å 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 可以较好的再现 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>。



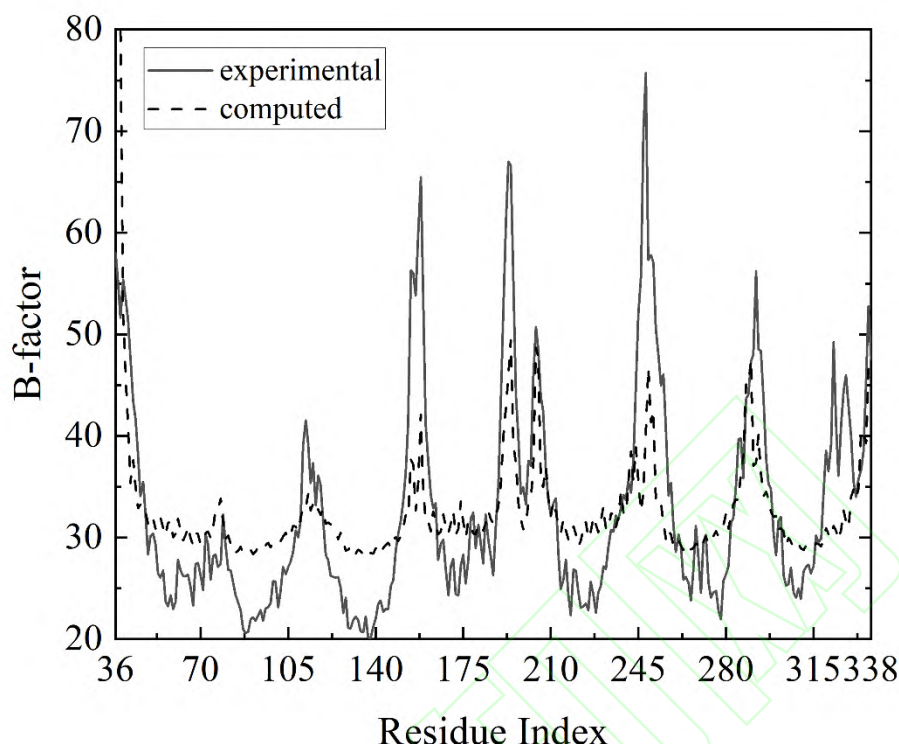


图 2. DOP 的理论（虚线）与实验（实线）B-factor 的比较

**Fig. 2** Comparison between the theoretical (dotted line) and experimental (solid line) B-factor of DOP

## 2.2 基于 ANM 的 DOP 的慢运动模式分析

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，如图 3a 和 3c 所示。7 个局部最小值分别对应于 TM1-TM7，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  $\beta$  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，在图 3a 中用圆圈突出表示。第一个区域(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”。第二个区域(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> 形成了第一个钠离子结合位点。位于 TM7 中的第三个区域(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> 形成了钠离子的第二个配位壳，位于 NP<sup>7.50</sup>xxY 基序的残基 Asn314<sup>7.49</sup> and Tyr318<sup>7.53</sup> 可以调节变构钠离子结合和与 GPCR 的激活有关<sup>[21]</sup>。

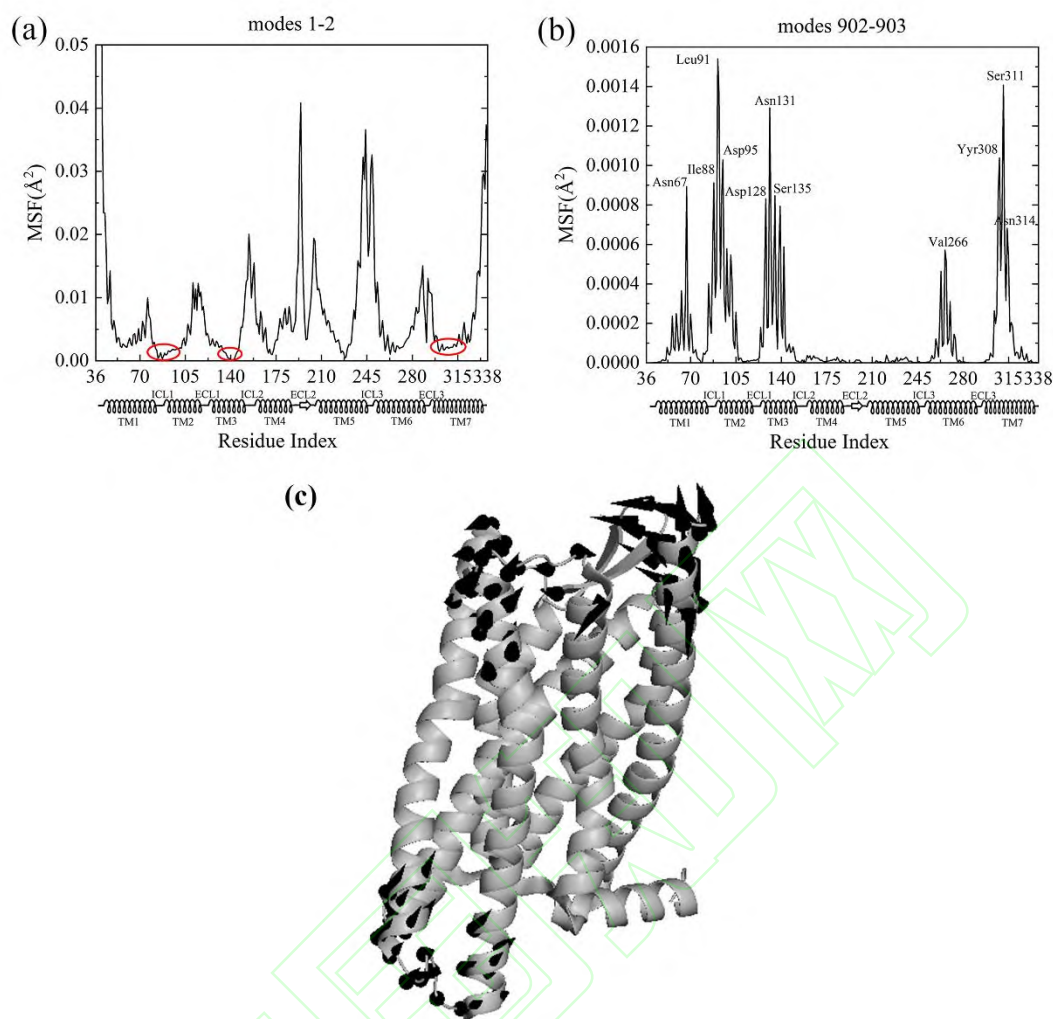


图 3 (a) 前两个最慢运动模式涨落分布。(b) 前两个快运动模式涨落分布。(c) 前两个最慢的运动模式(用圆锥模型表示)映射在 DOP 结构上。圆锥体的长度与运动的大小成正比, 圆锥体的方向表示运动的方向。

**Fig. 3** (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.

### 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 的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的功能进行讨论。高度保守的残基 Asn67<sup>1.50</sup> 是 DOP 的 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 Leu91<sup>2.46</sup> 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一个结合口袋<sup>[21]</sup>。残基 Asp128<sup>3.32</sup> 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, Yyr308<sup>7.43</sup> 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> 是第二个钠离子配位口袋处残基,在 DOP 激活的过程中, Asn314<sup>7.49</sup> 的位移会导致活性 GPCR 的变构钠结合口袋的崩塌<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(7)式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,如图 4a 所示。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>,所以我们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正的相互作用(图中橙红色区域),可能是因为 DOP 的跨膜螺旋的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 Asn131<sup>3.35</sup> 和 Ser135<sup>3.39</sup> 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<sup>[21]</sup>。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>。我们对 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, 如图 4b 所示。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 中具有大的敏感性的残基 (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的残基 (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, 如图 4c 所示, 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的作用。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  $\pi$ - $\pi$ 、疏水和阳离子- $\pi$  相互作用, 可以进一步稳定 DOP 的激活状态<sup>[26]</sup>。由于 ECL2 是  $\beta$ -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, 如图 4d 所示, 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> 是组成第一个钠离子结合口袋的残基, Asn310<sup>7.45</sup> 是组成第二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>6,27</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>。

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，我们发现通过 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。



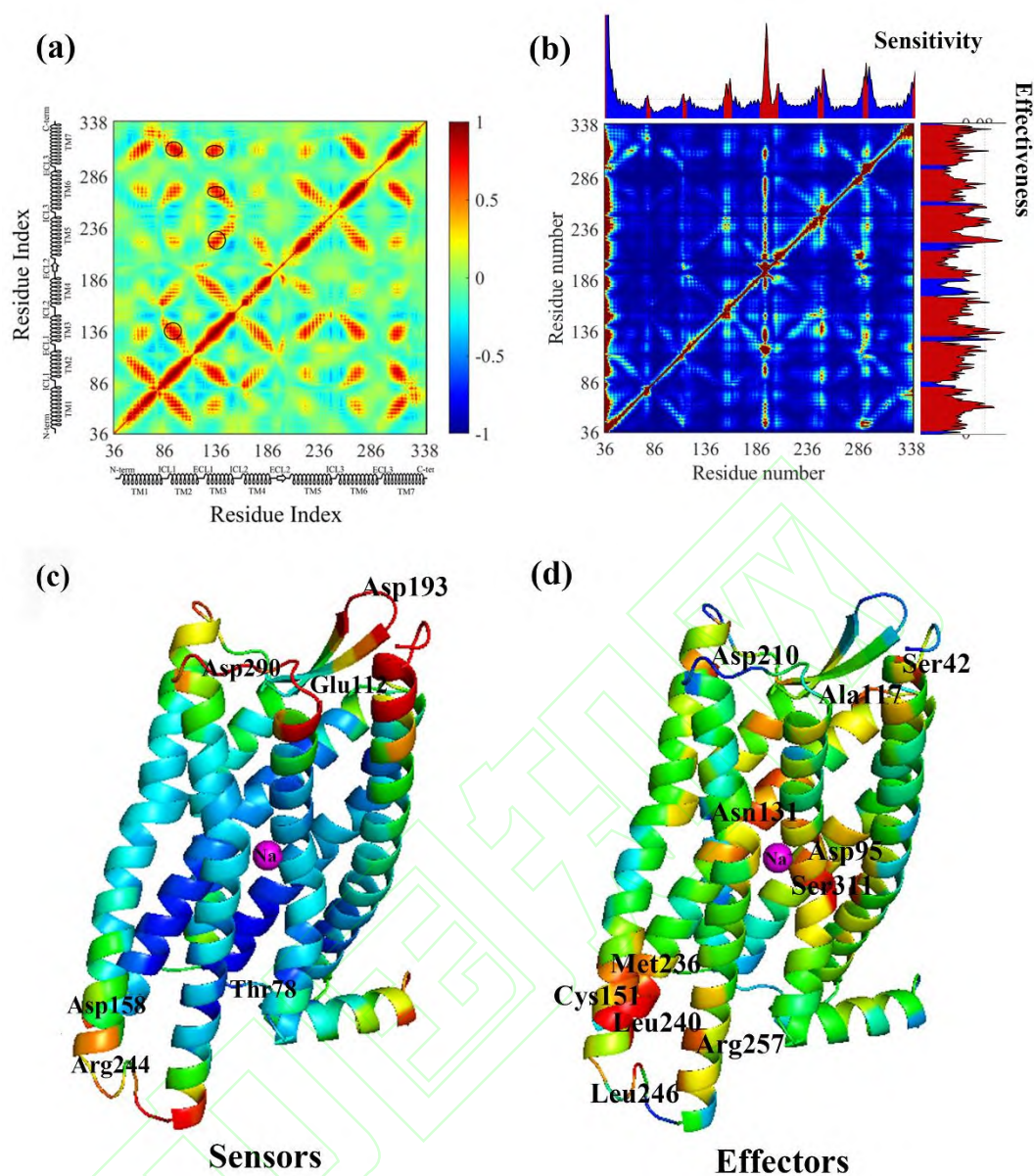


图 4. (a) DOP 的残基运动交叉相关图。图中用黑色椭圆形框标出的区域为重点分析的部分。(b) DOP 的 PRS 热图。图中显示最强的扰动 (深红色), 它描述了扰动剩余  $i$  对剩余  $j$  动力学的影响。沿顶部和右侧显示了敏感性和有效性, 其值分别映射到图(c)和(d)。敏感性曲线上的最高值对应于最强的传感器, 而有效性的最高值对应于最强的效应器。

**Fig. 4** (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 figures (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.



### 3 结论

本工作探索了人  $\delta$  阿片受体蛋白质 (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 的二聚化和与配体的结合, 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  $\delta$  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。

## References

- [1] 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 delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature*, 2012, 485(7398): 400-404
- [6] Fenalti G, Giguere P M, Katritch V, et al. Molecular control of  $\delta$ -opioid receptor signalling. *Nature*, 2014, 506(7487): 191-196
- [7] 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 in Neuroences*, 1995, 25(05): 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)
- [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, Zatzepin 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-us*, 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 fentanyl at opioid receptors. *Biochem Pharmacol*, 2020, 182
- [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