

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.001

• 基础研究 •

M1 毒蕈碱乙酰胆碱受体同源建模模板的选取及验证*

赵恒毅 胡梦薇 史玉欢 王宇 祁红 荣征星 徐见容 王昊[△]

(上海交通大学医学院药理学教研室 上海 200025)

摘要 目的:探讨不同同源模板所获得 M1 毒蕈碱乙酰胆碱受体模型的合理性及可靠性。**方法:**以牛视紫红素受体、人源 β 2- 肾上腺素受体、M2 胆碱受体和 M3 胆碱受体为模板,分别对 M1 胆碱受体进行同源建模;采用分子对接获得各 M1 胆碱受体同源模板与配体的互作模式,并与已报道的 M 胆碱受体晶体结构进行静态比对,得到最佳 M1 胆碱受体同源模板;采用分子动力学模拟分析配体与关键残基距离的变化,对 M1 胆碱受体同源模板进行动态验证。**结果:** M2 胆碱受体与 M1 胆碱受体的序列相似度较高,为 67.9%;以 Inactive M2 胆碱受体为模板构建的 M1 胆碱受体(M1R_{inactive-M2R})与其他晶体结构间 RMSD 值的均值最低,为 1.39 Å; M1R_{inactive-M2R} 别构位点 K392 及 E397 残基侧链与结合口袋距离更近,与配体结合构象更匹配;分子对接结果显示,双位点别构激动剂 VU0184670 与 M1R_{inactive-M2R} 别构结合位点 Y85、Y381 的距离分别为 4.8 Å、6.8 Å, 优于其他模型;分子动力学模拟后,配体与 Q177 残基的距离由 7.4 Å 降至 2.9 Å,提示配体 VU0184670 向 Q177 方向偏转,与文献结果一致。**结论:**以 Inactive M2 受体结构为模板构建的 M1 胆碱受体模型最为合理,更接近 M1 胆碱受体的晶体结构。本研究为 M1 胆碱受体药物开发提供重要工具,为其他 GPCRs 受体同源建模提供创新范式。

关键词: M1 胆碱受体;同源建模;分子对接;分子动力学模拟

中图分类号: R965.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)32-6201-08

Evaluation and Validation of Homology Models of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor*

ZHAO Heng-yi, HU Meng-wei, SHI Yu-huan, WANG Yu, QI Hong, RONG Zheng-xing, XU Jian-rong, WANG Hao[△]

(Department of Pharmacology, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the reasonability and reliability of M1 muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) constructed from different GPCR models. **Methods:** M1 mAChRs complexes were obtained by homology modeling from bovine rhodopsin, human β 2-adrenergic receptors, human M2 and M3 mAChRs. The receptor-ligand interactions were obtained by docking, and were compared with the crystal structure of M1 mAChR in static state. The variety of distances between ligand and crucial residues of M1 mAChR were evaluated by molecular dynamic simulation to validate the optimum model of M1 mAChR in dynamic state. **Results:** M2 mAChR possessed highest sequence similarities with M1 mAChR (67.9%). The mean of RMSDs between the M1 mAChR constructed by Inactive M2 (M1R_{inactive-M2R}) and other crystal structures was smallest (1.39 Å). The allosteric sites (K392 and E397) of M1R_{inactive-M2R} were closer to the binding pockets, which were corresponded with the ligand binding conformation. Docking results showed that the distances between bitopic allosteric agonist (VU0184670) and allosteric sites (Y85 and Y381) of M1R_{inactive-M2R} were 4.8 Å and 6.8 Å respectively, more reasonable than other M1 mAChR models. The distance between ligand and residue of Q177 was decreased from 7.4 Å to 2.9 Å after dynamic simulation, indicating the rotation of VU0184670 towards Q177, which was corresponded to previously reported results. **Conclusions:** Our results have proved that the M1 mAChR constructed by Inactive M2 mAChR (M1R_{inactive-M2R}) exhibited high structural similarity with crystal structure of M1 mAChR and was reasonable and reliable in both static and dynamic states. Our study provides important strategies for the development of M1 mAChR drugs, and also novel paradigms for the exploration of other GPCRs.

Key words: M1 muscarinic acetylcholine receptor; Homology modeling; Docking; Molecular dynamic simulation

Chinese Library Classification (CLC): R965.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)32-6201-08

前言

毒蕈碱型乙酰胆碱受体 (muscarinic acetylcholine receptors, M 胆碱受体) 属于 G 蛋白偶联受体 (Gprotein-coupled re-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81373395, 81503174); 上海市科委“科技创新行动计划”生物医药领域科技支撑项目(14431905600)

作者简介: 赵恒毅(1991-), 硕士研究生, 研究方向: 神经药理学, 电话: 15216609537, E-mail: cpuzhaohengyi@163.com

[△] 通讯作者: 王昊, 博士, 教授, 主要研究方向: 神经药理学, E-mail: angela_wanghao@hotmail.com

(收稿日期: 2017-03-28 接受日期: 2017-04-24)

ceptors, GPCRs)A 家族,包括 M1~M5 五种亚型^[1]。其中 M1 胆碱受体亚型主要分布在皮层、海马及纹状体等中枢神经系统,参与学习记忆、精神情绪等活动^[2]。针对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)动物模型,激动 M1 胆碱受体能够显著提高学习和空间记忆能力,因此,寻找 M1 胆碱受体选择性药物一直是抗 AD、精神分裂症认知障碍药物研发的重要策略^[3-6]。然而,由于 M1 胆碱受体的晶体结构尚未被解析,成为该研究的重要障碍^[7]。

GPCRs 的结构解析一直是困扰科学家们的重大难题,目前已经解析的 GPCRs 仅有视紫红质、 β 肾上腺素受体、M 胆碱受体等三十余种^[8]。而针对尚未解析 GPCRs 的结构生物学研究通常采用同源建模的方法。同源建模是以已解析晶体结构的同源蛋白结构为模板,构建未知目标序列结构模型的方法。与冷冻电镜、X 射线衍射等蛋白质结构测定方法相比,同源建模成本低、效率高,是研究 GPCRs 结构的有利工具。但其准确性依赖于同源模型的序列相似度、关键氨基酸位置及取向的匹配程度等,可靠性和可重复性难以保证。

故此,本研究拟应用不同 GPCRs 模板进行 M1 胆碱受体同源建模,结合分子对接和分子动力学模拟方法,比较不同模板所得同源结构在静态和动态互作模型中的合理性,并与已报道的 M1 胆碱受体晶体结构进行比对分析,验证上述方法的可靠性和可重复性,获得 M1 胆碱受体最佳模型,为 M1 胆碱受体药物开发提供重要工具,为其他 GPCRs 受体同源建模提供创新范式。

1 材料与方法

1.1 仪器与软件

SJTU 高性能计算集群(搭配 NVIDIA Kepler K20 GPU),药物设计软件系统 Molecular Operating Environment(MOE) 2014^[9],分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟软件 Amber 14^[10],MD 模拟拓扑文件生成及轨迹分析软件 AmberTools 14,序列比对及构象叠合软件 PyMol 1.7,绘图软件 Origin 8.0,以及相互作用图谱生成软件 LigPlot 1.4^[11]。

1.2 M1 胆碱受体的同源建模

利用 MOE 软件对人源 M1 胆碱受体(human M1 acetylcholine receptor, hM1)的序列(UniProtKB ID: P11229)进行多重序列比对,以牛视紫红质受体(PDB ID: 1F88,分辨率:2.8 Å)、人源 β 2-肾上腺素受体(PDB ID: 2RH1,分辨率:2.4 Å)、非激动状态人源 M2 胆碱受体晶体结构(PDB ID: 3UON,分辨率:3.0 Å,拮抗剂:3-quinuclidinyl benzilate)、激动状态人源 M2 胆碱受体晶体结构(PDB ID: 4MQS,分辨率:3.5 Å,激动剂: iperoxo)以及人源 M3 胆碱受体晶体结构(PDB ID: 4DAJ,分辨率:3.4 Å)为模板^[1,8,12-14],通过同源建模的方法构建 M1 胆碱受体的初始三维结构模型,将各模板构建的 M1 胆碱受体分别记为 M1R_{RhoR}、M1R _{β -AR}、M1R_{inactive-M2R}、M1R_{active-M2R} 以及 M1R_{M3R},根据打分情况选出各自的最佳构象并进行能量最小化。通过 MOE 的 Superpose 模块分析各构象与其他晶体结构的均方根偏差值(root-mean-square derivation, RMSD),用以反映各 M1 胆碱受体模型与晶体结构间的差异。利用 Protein geometry 模块绘制拉氏图,并对各构象中关键氨基酸的位置和取向的合理性进行

评估,从而验证模型的合理性和可靠性。

1.3 M1 胆碱受体与配体分子对接

利用 MOE 软件提供的蛋白质-小分子对接方法,应用 Dock 模块、Triangle Matcher 方法^[15],将各模板构建的 M1 胆碱受体结构与 M1 胆碱受体双位点别构激动剂 VU0184670 进行分子对接,分别生成一系列的候选复合物模型,根据软件打分和实际结合情况选出最佳构象^[16]。参考文献报道的关键氨基酸位点^[17],将受体结合位点限制在 Y381、K392、E397 以及 E401,设置打分函数为 London dG, Retain 为 100 再次进行分子对接,选取打分较高的复合物使用 3D 质子化和能量最小化优化构象,并根据关键氨基酸与配体的结合位置及取向对各 M1 胆碱受体的侧链结构进行比对,选取较为合理的 M1 胆碱受体复合物作为后续复合物分子动力学模拟的初始结构模型。

1.4 分子动力学模拟

分子动力学模拟均应用 Amber14 完成,标准氨基酸置于 ff12SB 力场^[18]。用氯离子中和 M1 胆碱受体及 M1-VU0184670 复合物的正电荷以获得中性复合物模型,通过 tleap 程序包产生模拟所需要的拓扑文件。在初始构象中,M1 胆碱受体及复合物浸在 TIP3P 水分子构成的八面体水盒内,并保证复合物周围至少有 12Å 厚的水分子层^[19]。在分子动力学轨迹产生前,利用 Amber 14 中的 pmemd 程序(CUDA 版)对整个 M1 胆碱受体、复合物系统进行三步能量最小化处理:(1)限制蛋白约束力为 50,分别进行 5000 步最陡下降法及 5000 步共轭梯度法最小化;(2)限制蛋白约束力为 10,分别进行 5000 步最陡下降法及 5000 步共轭梯度法最小化;(3)不做任何限制,分别进行 10000 步最陡下降法及 15000 步共轭梯度法最小化。在分子动力学模拟阶段,利用 Particle Mesh Ewald(PME)方法计算长程电荷相互作用^[20]。在模拟过程中,打开 SHAKE 设置,并在系统升温、密度调整、系统平衡阶段将步长设置为 1.0fs,在后面的正式模拟阶段将步长调整为 2.0fs。系统升温阶段,部分限制系统的振动范围,在 NVT 系综下将温度从 0K 升到 300K,模拟 250000 步;密度调整阶段,仍旧在 NVT 系综下降低系统限制,在 300K 温度下继续模拟 250000 步以调整密度;系统平衡阶段,在 NPT 系综下去除系统限制,在 300K 温度下模拟 5000ps(500000 步)以平衡系统。最后,在 NPT 系综和 300K 温度条件下,整个系统不加任何限制模拟 20000ps,以获得 M1 胆碱受体及复合物模型的运动轨迹。在模拟过程中,每 2ps 保存一个构象,记录运动轨迹,并对多轨迹进行聚类分析选取优势构象,得到参与配体相互作用的关键氨基酸。将分子动力学模拟前后的 M1 胆碱受体复合物与非激动状态的 M1 胆碱受体晶体结构^[21](PDB ID: 5CXV,分辨率:2.7Å)进行比对,对同源建模、分子对接以及分子动力学模拟的结果进行验证。

2 结果

2.1 M1 胆碱受体同源建模

在人源 M 胆碱受体各亚型的晶体结构尚未被解析前,牛视紫红质受体以及人源 β 2-肾上腺素受体常被用作 M1 胆碱受体的模板^[12,13],近年来,M2 及 M3 胆碱受体的晶体结构相继被解析,因此,本研究首先将牛视紫红质受体、人源 β 2-肾上腺素受体、人源 M2 胆碱受体、人源 M3 胆碱受体与 M1 胆碱受体进

行多重序列比对。由于在 M1 胆碱受体结构中,存在远离配体结合口袋、柔性较大且序列保守性差的胞内 3 环(intracellular loop 3, i3),因此在序列比对时将该区域排除。

比对结果显示,M2 胆碱受体、M3 胆碱受体与 M1 胆碱受体的序列相似度分别为 67.9%和 75.0%,远高于牛视紫红素受体(23.4%)和 β 2-肾上腺素受体(33.0%)。为考察以各晶体结构为模板构建的 M1 胆碱受体模型的合理性和可靠性,将上述结

构与模板的晶体结构进行比较,以 RMSD 值作为指标评价 M1 胆碱受体模型与晶体结构间的差异(表 1)。排除 i3 环的比对结果显示,M1R_{inactive-M2R}、M1R_{M3R}与各晶体结构间 RMSD 值的平均值均为 1.39 Å;结合口袋比对结果显示,M1RRhoR 与各晶体结构间 RMSD 值的平均值可达 3.26 Å,提示 M1R_{inactive-M2R}和 M1R_{M3R}更接近 M1 胆碱受体的真实结构,而 M1R_{RhoR}与 M1 胆碱受体的真实结构可能存在较大的差异。

表 1 同源模板构建的 M1 胆碱受体与其晶体结构间的 RMSD 值

Table 1 The RMSD values between the crystal structure and the M1 receptor models (Unit: Å)

		RhoR	β -AR	inactive M2R	active M2R	M3R	Mean
i3-excluded	M1R _{RhoR}	0.91	2.86	3.03	3.04	2.91	2.55
	M1R _{β-AR}	2.76	0.47	1.11	1.79	1.27	1.48
	M1R _{inactive-M2R}	2.89	1.12	0.24	1.69	1.03	1.39
	M1R _{active-M2R}	2.85	1.74	1.71	0.31	1.56	1.63
	M1R _{M3R}	2.71	1.22	0.95	1.52	0.54	1.39
Pocket	M1R _{RhoR}	3.40	4.34	3.11	2.44	3.02	3.26
	M1R _{β-AR}	3.01	3.34	1.90	1.45	2.02	2.34
	M1R _{inactive-M2R}	3.73	3.46	0.19	2.10	0.58	2.01
	M1R _{active-M2R}	3.25	3.51	2.03	0.28	1.99	2.21
	M1R _{M3R}	3.85	3.52	0.56	2.07	0.35	2.07

注:i3-excluded 表示排除结构高度柔性的 i3 环比对,pocket 表示关键口袋结合位点对比。

Note: i3-excluded: comparison with the highly flexible i3 loop excluded; pocket: comparison of the binding sites.

进一步通过氨基酸在三维空间中二面角(ψ 角和 ϕ 角)的数值评估 M1R_{RhoR}、M1R _{β -AR}、M1R_{inactive-M2R}、M1R_{active-M2R}以及 M1R_{M3R}的残基空间位置是否合理。拉氏图和氨基酸二面角打分(Z-Score)^[22]分布结果显示,M1 胆碱受体各氨基酸的二面角

分布基本合理,即在 Core zone 和 Allowed zone 之内,其中 Core zone 中的氨基酸数量均占据总分布的 90%以上;少数异常残基(Outlier)均分布在 i3 环,远离配体口袋结合区域,对后续实验的影响可以忽略不计(图 1 及表 2)。

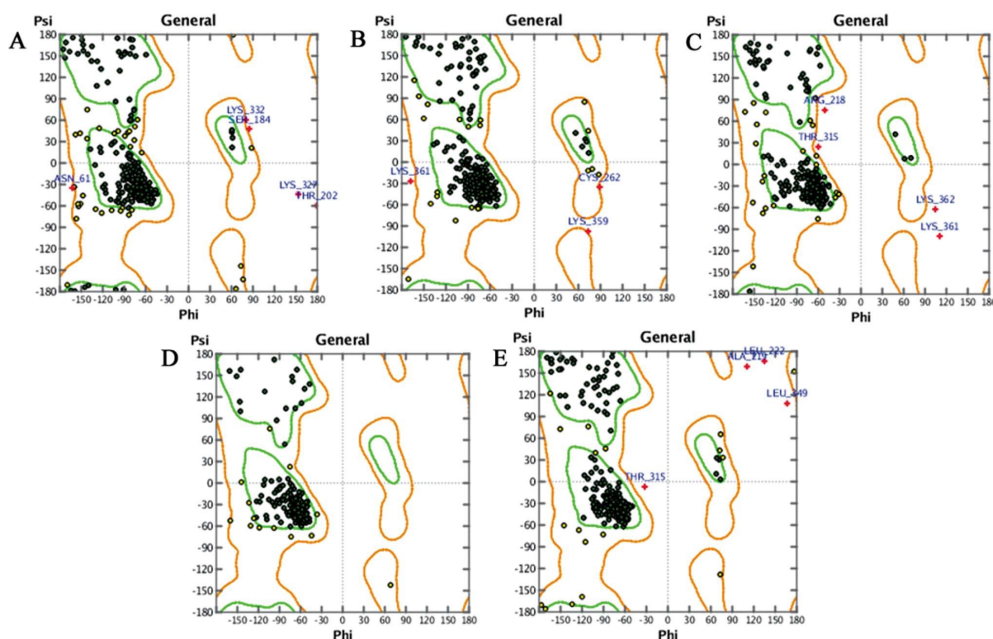


图 1 同源模板构建 M1 胆碱受体模型拉氏图

Fig.1 The ramachandran plot of M1 mAChR models

Note: A: M1R_{RhoR}; B: M1R _{β -AR}; C: M1R_{inactive-M2R}; D: M1R_{active-M2R}; E: M1R_{M3R}

表 2 同源模板构建 M1 胆碱受体氨基酸二面角打分 (Z-Score) 分布
Table 2 The dihedral angle score of amino acids of M1 mAChR models

	Core zone	Allowed zone	Outlier
M1R _{RhoR}	268	23	6
M1R _{β-AR}	271	15	3
M1R _{inactive-M2R}	269	15	5
M1R _{active-M2R}	264	10	1
M1R _{M3R}	274	10	2

注:最佳二面角分布 (Score > 0.02); 合理二面角分布 (0.0005 ≤ Score ≤ 0.02); 异常二面角分布 (Score < 0.0005)。

Note: Core zone: Score > 0.02; Allowed zone: 0.0005 ≤ Score ≤ 0.02; Outlier: Score < 0.0005.

进一步选取 M1 胆碱受体经典正构位点 D105 和别构位点 Y82、K392 及 E397 进行评估,考察 M1R_{RhoR}、M1R_{β-AR}、M1R_{inactive-M2R}、M1R_{active-M2R} 以及 M1RM3R 结合口袋关键氨基酸取向的合理性。如图 2 所示,对于序列和结构相对保守的正构位点 D105,各 M1 胆碱受体模型的残基取向无明显差异;而对于序列保守性较低的别构位点 Y82,与其他 M1 胆碱受体模型相比,M1R_{RhoR} 的残基取向远离结合口袋靠近膜外;对于序列保守性最低、位于 M1 胆碱受体胞外 3 环(extracellular loop 3, o3)的别

构位点 K392 及 E397,M1R_{inactive-M2R} 的残基取向更靠近结合口袋,提示以 InactiveM2 为模板构建的 M1 胆碱受体的关键氨基酸位置更符合配体结合构象。

上述结果提示 M1R_{RhoR} 部分关键氨基酸残基取向远离配体结合口袋,不符合 M1 胆碱受体与配体的互作特征,因此后续研究选择 M1R_{β-AR}、M1R_{inactive-M2R}、M1R_{active-M2R} 及 M1R_{M3R} 作为受体部分进行分子对接。

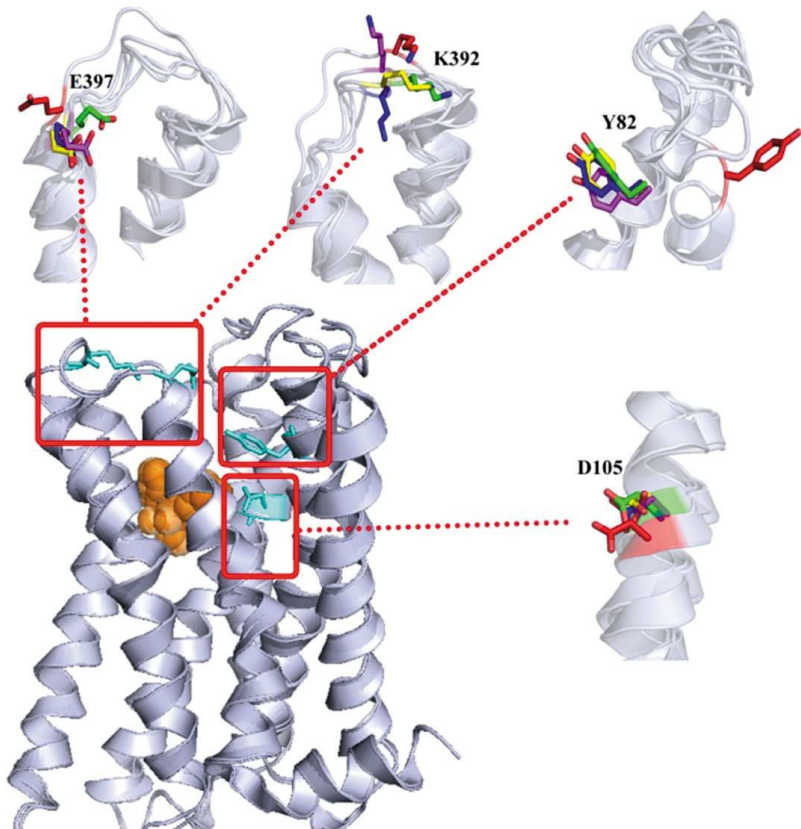


图 2 M1 胆碱受体的配体结合部位(橙)及关键氨基酸(青)

Fig.2 Binding sites(orange) and key residues(cyan) of M1 mAChR

注:红:M1R_{RhoR};绿:M1R_{β-AR};蓝:M1R_{inactive-M2R};黄:M1R_{active-M2R};紫:M1R_{M3R}

Note: red: M1R_{RhoR}; green: M1R_{β-AR}; blue: M1R_{inactive-M2R}; yellow: M1R_{active-M2R}; purple: M1R_{M3R}

2.2 M1 胆碱受体同源模型与配体分子对接

利用 MOE 软件,将 M1R_{β-AR}、M1R_{inactive-M2R}、M1R_{active-M2R} 以及 M1R_{M3R} 设置为受体部分,将 M1 胆碱受体双位点别构调节剂

VU0184670 设置为配体部分进行对接。对接时,参考相关生物实验结果,将 Y381、K392、E397、E401 设置为潜在受体结合位点,根据打分函数选出最优构象。如图 3 所示,在各受体 - 配体

复合物模型中,VU0184670 的苯甲酰胺部分均靠近膜外,酰胺 N 原子与 E397、E401 存在相互作用,与先前报道的对接结果一致^[17]。而 VU0184670 嘧啶环部分在不同复合物中互作模式存在差异,在 M1R_{inactive-M2R} 中,VU0184670 靠近 M1 胆碱受体别构结合位点 Y85、Y381^[23],距离分别为 4.8 Å、6.8 Å;而在 M1R_{β-AR}、M1R_{active-M2R} 及 M1R_{M2R} 模型中,仅与 Q181、Y179 位点存在较弱

的电荷或疏水作用,提示 VU0184670 可与 M1R_{inactive-M2R} 的 Y85、Y381 位点发生互作,以 Inactive M2 为模板构建的 M1R_{inactive-M2R} 所得的互作模型与文献报道更为符合。因此,结合 2.1 中关键残基比对及本部分分子对接结果,选取 M1R_{inactive-M2R} 进行后续的动力学模拟,以进一步验证同源建模的准确性。

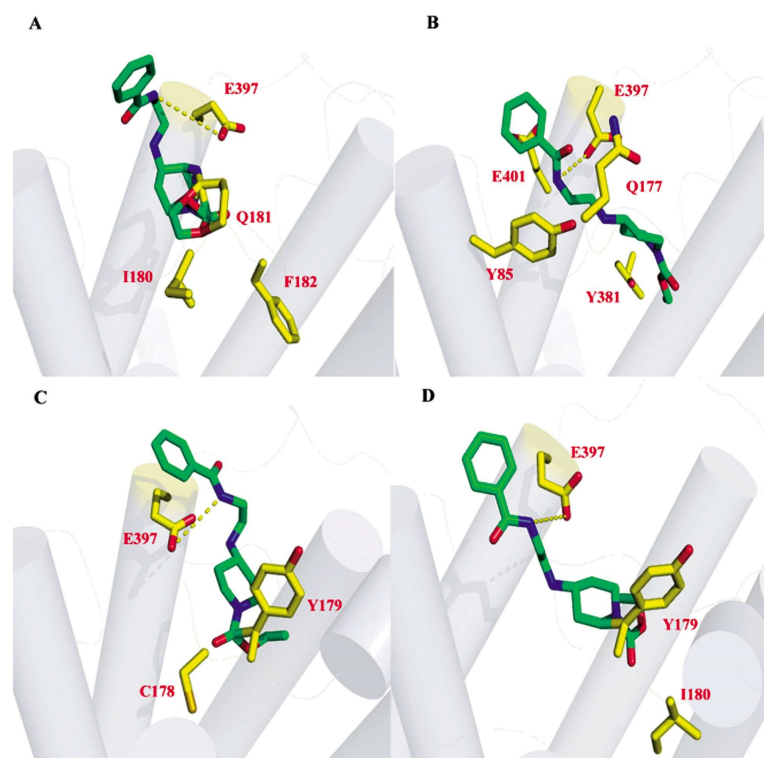


图 3 M1 胆碱受体模型与 VU0184670 的对接结果

Fig.3 The docking results of M1 mAChR and VU0184670

注:A: M1R_{β-AR}; B: M1R_{inactive-M2R}; C: M1R_{active-M2R}; D: M1R_{M2R}; 灰: M1 胆碱受体骨架结构;

黄: M1 胆碱受体参与互作的关键残基; 绿: 配体 VU0184670

Note: A: M1R_{β-AR}; B: M1R_{inactive-M2R}; C: M1R_{active-M2R}; D: M1R_{M2R}; grey: skeleton structure of M1 mAChR

yellow: key residues of M1 mAChR involved in interaction; green: VU0184670

2.3 M1R_{inactive-M2R} 与 M1 胆碱受体晶体结构复合物模型对比分析

将 M1R_{inactive-M2R} 模型与刚解析的 M1 胆碱受体晶体结构进行比对,以确保 M1 胆碱受体模型的可靠性。如图 4 所示,对于正构位点,D105^{3.32} 和 Y408^{7.43} 在 Inactive M1 及 M1R_{inactive-M2R} 中位置差异不大;相较于 Inactive M1, Y404^{7.39} 位点在 M1R_{inactive-M2R} 中远离噻托溴铵的结合口袋,与其同源模板 Inactive M2 的晶体结构相吻合。对于别构位点,E397^{7.32} 和 E401^{7.36} 在 Inactive M1 及 M1R_{inactive-M2R} 中位置差异不大;而相较于 Inactive M1, K392^{7.27} 位点在 M1R_{inactive-M2R} 中更靠近配体,由于 K392^{7.27} 位点处于柔性极大、位置极易变动的胞外 o3 环,这种差异可能与配体自身结构及与受体正构、别构位点结合位置密切相关。

2.4 M1 胆碱受体与配体复合物的分子动力学模拟

为进一步验证 M1R_{inactive-M2R} 模型在动力学模拟中的可靠性,按照结合口袋的差异将分子动力学模拟轨迹中的复合物象进行聚类分析,获得动力学模拟前后 M1R_{inactive-M2R} 与 VU0184670 之间的互作模型。如图 5 所示,在复合物模型中,

配体与动力学模拟前后 M1R_{inactive-M2R} 的 Y85、E397、E401、Y404 位点存在互作。在动力学模拟后 M1R_{inactive-M2R} 模型中,配体与 Y404 残基的距离由 4.5 Å 增至 7.3 Å,与 Q177 残基的距离由 7.4 Å 降至 2.9 Å,提示配体 VU0184670 向 Q177 方向偏转,与文献中 M2 胆碱受体晶体结构动力学模拟结果相近^[8],进一步验证本研究中 M1R_{inactive-M2R} 在分子动力学动态模拟中的稳定性和可靠性。

3 讨论

综合序列比对、口袋结构比对及关键氨基酸位点分析结果,以 M 胆碱受体各亚型为模板构建的 M1 胆碱受体的关键氨基酸位置更符合配体结合构象,而对于视紫红素受体、β2 肾上腺素受体为模板构建的 M1 胆碱受体与真实结构存在较大的差异。分析原因:① GPCR 受体间的最大差异在于胞外表面,与牛视紫红素受体、β2-肾上腺素受体相比,Inactive M2 胆碱受体具有更为简单开放的胞外表面及更长的 o2 环,并被保守

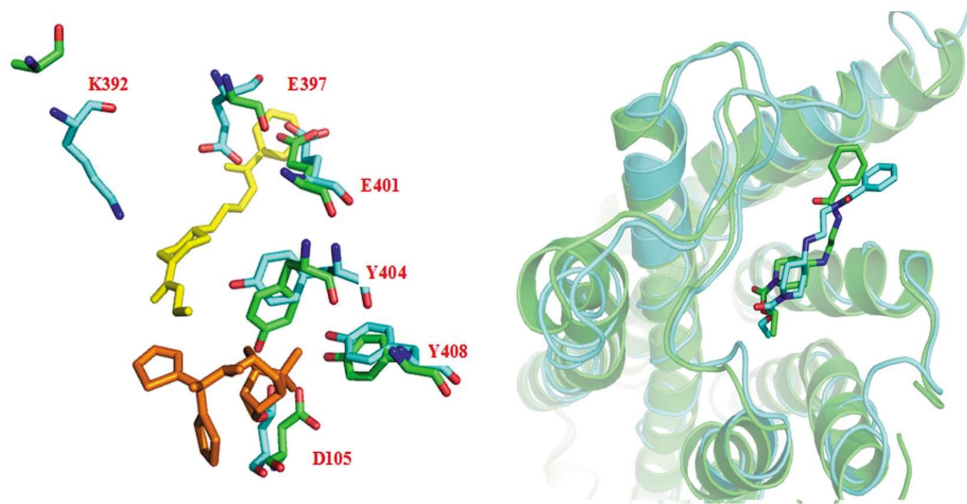


图 4 M1 胆碱受体晶体结构与 M1Rinactive-M2R 比对结果

Fig.4 Structural comparison of the M1 mAChR and M1Rinactive-M2R

注:绿:M1 胆碱受体晶体结构;青:M1Rinactive-M2R;橙:噻托溴铵;黄:配体 VU0184670

Note: green: crystal structure of M1 mAChR; cyan: M1Rinactive-M2R; orange: tiotropium; yellow: VU0184670

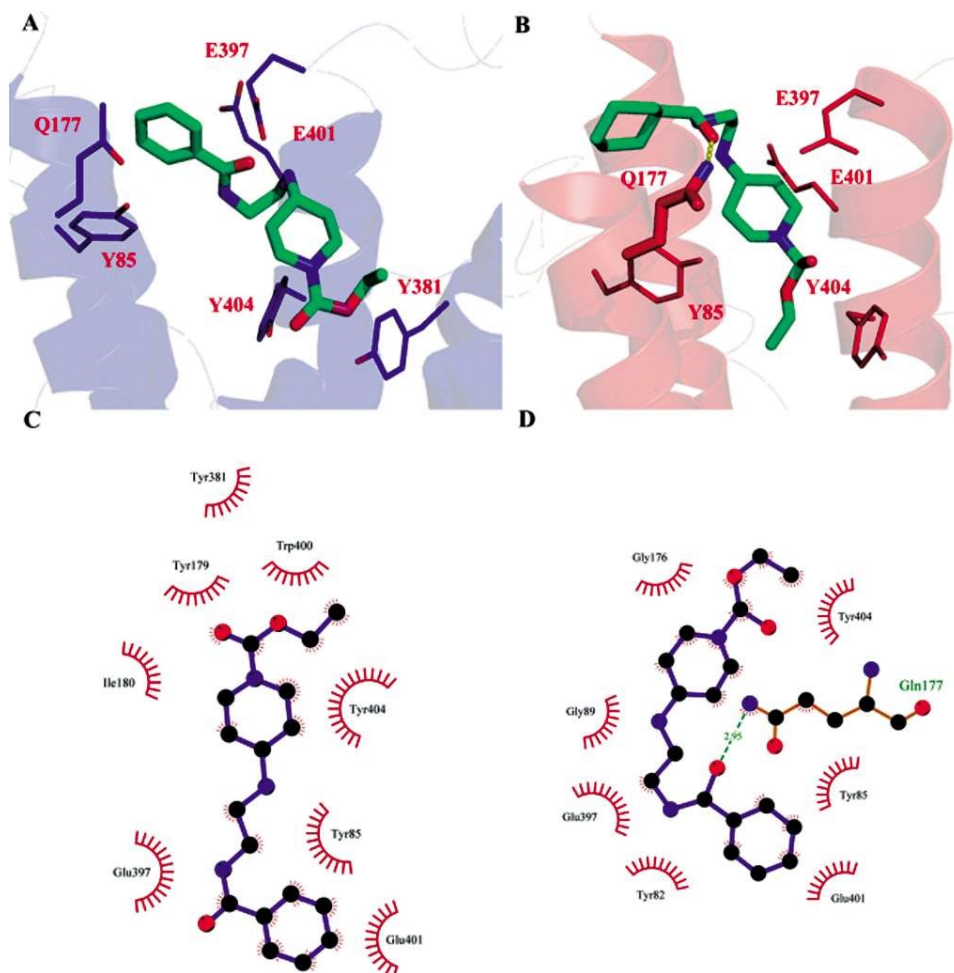


图 5 动力学模拟前 M1R_{inactive-M2R} (蓝)、动力学模拟后 M1R_{inactive-M2R} (红)与配体 VU0184670(绿)的对接结果及互作模型

Fig.5 The interactions of crystal structure of M1R_{inactive-M2R} before dynamic simulation(blue), M1R_{inactive-M2R} after dynamic simulation(red) docked with VU0184670(green)

注:A, C:动力学模拟前 M1R_{inactive-M2R};B, D:动力学模拟后 M1R_{inactive-M2R}

Note: A, C: M1R_{inactive-M2R} before dynamic simulation, B, D: M1R_{inactive-M2R} after dynamic simulation

的 Cys 96³²⁵ 和 Cys 176⁵²⁸ 形成的二硫键所稳定(M 胆碱受体各氨基酸采用 Ballesteros-Weinstein 命名法^[24])。因此,以 M1R_{RhoR}、M1R_{β-AR} 构建的 M1 胆碱受体可靠性较低;② M1~M4 胆碱受体晶体结构序列比对结果表明,排除 i3 环后,各 M 胆碱受体 RMSD 值均小于 1 Å,整体结构相差不大^[14]。其中 Inactive M2 和 Inactive M1 仅在远离胞外、胞内环的保守区,如第 1 个跨膜螺旋区(transmembrane helix 1, TM1)、TM3 及 TM7 区存在某些氨基酸倾斜角度及位置的差异,对受体-配体相互作用影响不大^[21]。

排除 i3 环的比对结果显示,以 Inactive M2 为模板构建的 M1 胆碱受体模型与各晶体结构间 RMSD 值的平均值为 1.39 Å,而以 Active M2 为模板构建的模型与各晶体结构间 RMSD 值的平均值可达 1.63 Å,且与 M1R_{active-M2R} 相比,M1R_{inactive-M2R} 与配体的对接结果更符合实际情况。与激动状态相比,非激动状态的 M2 胆碱受体与非激动状态下的 M1 胆碱受体及其他亚型的结构更为接近,而激动状态下的 M2 胆碱受体处于一种较为特殊的状态,与非激动状态下的各亚型均存在较大差异^[1]。结合本研究的结果,以 Inactive M2 胆碱受体为模板构建的 M1 胆碱受体结构更优于以 Active M2 构建的 M1 胆碱受体结构。

分子对接结果显示,M1R_{inactive-M2R}、M1R_{active-M2R} 以及 M1R_{M2R} 在 D105³³² 位点残基取向无明显差异,这是由于 D105³³² 位点属于配体结合的正位结合口袋区域^[17,25,26]。文献结果显示,在该区域内,Inactive M1 胆碱受体与 Inactive M3/M4 几乎没有结构差异,与 Inactive M2 的差异主要表现在 D³³²、Y⁷³⁹ 和 Y⁷⁴³ 三个氨基酸位点。但此差异是由于 Inactive M2 晶体结构的配体 QNB 存在一个体积较大的双环结构,使与该结构相邻的三个氨基酸位点 D³³²、Y⁷³⁹ 和 Y⁷⁴³ 产生外移,提示 M1R_{inactive-M2} 正构位点氨基酸的偏移是由配体的特定结构所致,对本研究结果无影响^[21]。

M1R_{inactive-M2R} 与 M1 胆碱受体晶体结构复合物模型对比分析显示,二者在正构及别构位点整体一致,仅在别构位点 K392⁷²⁷ 存在较大差异。这是由于 M1 胆碱受体晶体结构配体噻托溴铵是一种非选择性的 M 受体拮抗剂,主要占据 Inactive M2 受体的正构位点,与 K392⁷²⁷ 距离较远;而 VU0184670 是双位点激动剂,既能占据正构位点也可以占据别构位点,与 K392⁷²⁷ 位点较为接近,因此对于噻托溴铵和 VU0184670 两种配体,Inactive M2 在 K392⁷²⁷ 位点存在不同的空间取向。细胞内钙流实验显示,仅突变 K392 为天冬氨酸,VU0184670 对 M1 胆碱受体的 EC₅₀ 值变化不大,但三突变 K392D/E397V/E401H 与双突变 EE397/401DD 相比,EC₅₀ 值增加 3 倍,最大响应值 ACh_{max} 降低至一半,提示 K392⁷²⁷ 位点对互作影响有限,仅协同参与 VU0184670 与 M1 胆碱受体的相互作用^[17]。

动力学模拟后,配体 VU0184670 向 o2 环上 Q177 位点方向偏移,与文献中 M2 胆碱受体晶体结构动力学模拟结果相近,Kruse 在对结合有噻托溴铵的 M2 和 M3 胆碱受体结构进行 1 μs 的动力学模拟后,也发现与 M3 胆碱受体相比,M2 胆碱受体的 o2 靠近口袋区域的氨基酸在动力学模拟中位置更为灵活,Tyr³³³ 能够促进 Phe 181(M2)/Leu 225(M3)远离正构位点,从而促进配体从正构位点向胞外移动^[8]。在动力学模拟中,

M1Rinactive-M2R 表现出与 Inactive M2 受体晶体结构相一致的构象变化特征,表明本研究所获得的 M1R_{inactive-M2R} 模型稳定、可靠,适用于相关分子动力学研究。

综上所述,本研究应用同源建模、分子对接和分子动力学模拟方法,比较不同模板所得同源结构在静态和动态互作模型中的合理性,发现以 Inactive M2 胆碱受体为模板构建的 M1 胆碱受体合理性最佳,更接近 M1 胆碱受体的晶体结构,为 M1 胆碱受体结构功能研究提供有利方法,为 M1 胆碱受体药物开发提供重要工具,为其他 GPCRs 受体同源建模提供创新思路。

参考文献 (References)

- [1] Kruse A C, Ring A M, Manglik A, et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor [J]. *Nature*, 2013, 504(7478): 101-106
- [2] Navarria A, Wohleb E S, Voleti B, et al. Rapid antidepressant actions of scopolamine: Role of medial prefrontal cortex and M1-subtype muscarinic acetylcholine receptors [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 82: 254-261
- [3] Scarr E. Muscarinic M1 receptor agonists: can they improve cognitive performance?[J]. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2013, 16(4): 717-720
- [4] Gazova Z, Soukup O, Sepsova V, et al. Multi-target-directed therapeutic potential of 7-methoxytacrine-adamantylamine heterodimers in the Alzheimer's disease treatment [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2016, 1863(2): 607-619
- [5] Jiang S, Li Y, Zhang C, et al. M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(2): 295-307
- [6] Kolisnyk B, Al-Onaizi M A, Xu J, et al. Cholinergic Regulation of hnRNP A2/B1 Translation by M1 Muscarinic Receptors [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(23): 6287-6296
- [7] Chin S P, Buckle M J, Chalmers D K, et al. Toward activated homology models of the human M1 muscarinic acetylcholine receptor [J]. *J Mol Graph Model*, 2014, 49: 91-98
- [8] Kruse A C, Hu J, Pan A C, et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor[J]. *Nature*, 2012, 482(7386): 552-556
- [9] Molecular Operating Environment. 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2016: Chemical Computing Group Inc, 2013
- [10] Case D A, Berryman J T, Betz R M, et al. AMBER 2014 [CP]. University of California, San Francisco, 2014
- [11] Singh N, Sudandiradoss C, Abraham J. Screening of Furanone in Cucurbita melo and Evaluation of its Bioactive Potential Using In Silico Studies [J]. *Interdisciplinary Sciences Computational Life Sciences*, 2016, 8(4): 395-402
- [12] Palczewski K. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor[J]. *Science*, 2000, 289(5480): 739-745
- [13] Cherezov V, Rosenbaum D M, Hanson M A, et al. High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human 2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor[J]. *Science*, 2007, 318(5854): 1258-1265
- [14] Haga K, Kruse A C, Asada H, et al. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist [J]. *Nature*, 2012, 482(7386): 547-551

- [15] Yuriev E, Ramsland P A. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review [J]. Journal of Molecular Recognition, 2013, 26 (5): 215-239
- [16] Keov P, Lopez L, Devine S M, et al. Molecular Mechanisms of Bitopic Ligand Engagement with the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(34): 23817-23837
- [17] Lebois E P, Bridges T M, Lewis L M, et al. Discovery and characterization of novel subtype-selective allosteric agonists for the investigation of M1 receptor function in the central nervous system [J]. ACS Chemical Neuroscience, 2009, 1(2): 104-121
- [18] Xu J, Xu J, Chen H. Interpreting the structural mechanism of action for MT7 and human muscarinic acetylcholine receptor 1 complex by modeling protein-protein interaction [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2012, 30(1): 30-44
- [19] Katkova E V, Onufriev A V, Aguilar B, et al. Accuracy comparison of several common implicit solvent models and their implementations in the context of protein-ligand binding [J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2017, 72: 70-80
- [20] Nishizawa H, Okumura H. Rapid QM/MM approach for biomolecular systems under periodic boundary conditions: Combination of the density-functional tight-binding theory and particle mesh Ewald method[J]. Journal of Computational Chemistry, 2016, 37(31): 2701-2711
- [21] Thal D M, Sun B, Feng D, et al. Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors [J]. Nature, 2016, 531 (7594): 335-340
- [22] Chen V B, Arendall W B, Headd J J, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010, 66(Pt 1): 12-21
- [23] Abdul-Ridha A, López L, Keov P, et al. Molecular Determinants of Allosteric Modulation at the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(9): 6067-6079
- [24] Benredjem B, Girard M, Rhainds D, et al. Mutational Analysis of Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3/CXCR7) Interaction with Its Chemokine Ligands CXCL11 and CXCL12[J]. J Biol Chem, 2017, 292(1): 31-42
- [25] Xu J, Wang H, Chen H. Muscarinic acetylcholine receptor modulators derived from natural toxins and diverse interaction modes [J]. Science China Chemistry, 2013, 56(10): 1333-1343
- [26] Lebon G, Langmead C J, Tehan B G, et al. Mutagenic mapping suggests a novel binding mode for selective agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors [J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(2): 331-341

(上接第 6388 页)

- [23] van der Klaauw AA, Kars M, Biermasz NR, et al. Disease-specific impairments in quality of life during long-term follow-up of patients with different pituitary adenomas[J]. Clinical endocrinology, 2008, 69 (5): 775-784
- [24] Nielsen EH, Lindholm J, Laurberg P, et al. Nonfunctioning pituitary adenoma: incidence, causes of death and quality of life in relation to pituitary function[J]. Pituitary, 2007, 10(1): 67-73
- [25] Tanemura E, Nagatani T, Aimi Y, et al. Quality of life in nonfunctioning pituitary macroadenoma patients before and after surgical treatment [J]. Acta neurochirurgica, 2012, 154 (10): 1895-1902
- [26] Webb SM. How good is perceived health-related quality of life in patients treated for non-functioning pituitary adenomas [J]. Clinical endocrinology, 2013, 78(1): 21-22