

多巴胺 D3R 蛋白同源模建及其应用

马丽英¹,徐四川²

(1. 凯里学院环境与生命科学学院,贵州 凯里 556011;2. 云南大学化学科学与工程学院,昆明 650091)

摘要:以分辨率为 2.2 Å 的牛视紫红质蛋白的晶体结构为模板,采用同源模建方法,建立 D3R 模蛋白。对接 D3R 模蛋白与刺桐属配体分子,在对接的 D3R 蛋白的结合腔中选定一个以药物分子为质心,以半径为 6 Å 的空间范围,计算此空间范围内的所有氨基酸残基与配体分子的作用能量,即残基/配体的结合能或排斥能,据此得到配体分子与受体蛋白的活性结合位点。

关键词:同源模建;分子对接;多巴胺第三受体
中图分类号:O64

文献标识码:A

多巴胺(DA)是一种重要的神经递质,由于 DA 受体亚型的多样性、脑区分布的特异性及其所处突触环境的功能差异性,使得脑内 DA 系统成为复杂系统,协调地参与运动功能、认知活动和药物成瘾等生理、病理的调控过程。精神分裂症、帕金森病的防治和毒品成瘾机制都是神经科学中倍受关注的研究领域,它们都与 DA 系统密切相关;DA 受体则是神经药理研究中活跃领域之一。

多巴胺受体分为 D1、D2、D3、D4 和 D5 多种受体亚型。其中 D1 和 D2 受体亚型被统称为 D1 样受体,D2、D3、D4 受体亚型被统称为 D2 样受体^[1]。

脑内有两条主要多巴胺神经通路,而 D3 受体在两条 DA 通路中都有分布,并和其他 DA 受体亚型存在着复杂相互作用。因此,D3 受体在帕金森病、精神分裂症和戒毒中具有重要意义。

D3 受体蛋白是一个跨膜蛋白。人工结晶跨膜蛋白往往是比较困难的,D3 受体蛋白晶体三维结构还没有得到解析。因此,D3 受体蛋白分子的获取是一个重要的科学问题。

1 同源模建方法

牛视紫红质蛋白(rhodopsin)晶体结构数据(PDB 库)和 D3 受体蛋白氨基酸序列(基因数据库)见表 1。视紫红质蛋白一级序列与 D3 受体蛋白一级序列氨基酸残基比对,确定模建蛋白序列 D3 受体与模板蛋白 rho-

dopsin 之间的序列一致性和相似性。

用 Sybyl 7.2 技术^[2-3],去掉牛视紫红质蛋白(rhodopsin)中的 B 链,只留下 A 链及周围一些小分子。将牛视紫红质蛋白(rhodopsin)中的氨基酸残基由 D3 受体的氨基酸残基代替,即序列替换。

表 1 rhodopsin 与 D3 受体序列联配表

蛋白序列	受体	蛋白数据
TM1	R	W ³⁵ QFSMLAAYMFLMLGFPINFLTYVTVQ ⁶⁴
	D ₃	R ²⁷ PHAYYALSICALILAHFNGLVCAAVLR ⁵⁶
TM2	R	P ⁷¹ LNYILLNLAVADLFMVFGGFTTTLTYSLH ¹⁰⁰
	D ₃	T ⁵⁵ TNYLVVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVT ⁸⁴
TM3	R	P ¹⁰⁷ TGCNLEGGFFATLGGEIALWLSLVLAIERVYVV ¹³⁹
	D	R ⁹² ICCDVFTVTLDVMMCTASILNLCAISIDRYTAV ¹²⁴
TM4	R	N ¹⁵¹ HAIMGVAFTWVMALACAAPPLV ¹⁷³
	D	R ¹⁴⁰ RVALMITAVVWLAFAVSCPLLF ¹⁶²
TM5	R	N ²⁰⁰ ESFVIYMFVVFHFIPLIVIFFCYGQ ²²⁵
	D	N ¹⁷⁷ PDFVIYSSVVSFYVFPFVTVLVYAR ²⁰²
TM6	R	E ²⁴⁷ KEVTRMVHVMVIAFLICWLPYAGVAFYIFT ²⁷⁷
	D	E ³¹⁶ KKATQMVVIVLGAIVCWLPFFLTHVLNTH ³⁴⁶
TM7	R	I ²⁸⁶ FMTIPAFFAKTSAVYNPVIY ³⁰⁶
	D	E ³⁵⁵ LYRATTWLGIVNSALNPVIY ³⁷⁵
TM8	R	N ³¹⁰ KQFRNCMVTTL ³²¹
	D	N ³⁷⁹ VEFRKAFLKIL ³⁹⁰

采用同源模建蛋白技术建立 D3R 蛋白的三维结构。此过程用 Sybyl 7.2 技术。除去上述得到的 D3R 基本骨架结构中水分子。采用 Amber7 FF99 charge 补全 D3R 的电荷。采用 H-bonding type 补加缺失的氢原子。对

于新增加的氢原子,它们在蛋白分子上的几何位置是应当被优化的,氢原子位置的优化是通过 Sybyl 7.2 程序的 Minimize 模块中的 Powell method 模式进行, Simplex method, Gradient 中的参数设置为 0.01 调整 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 最大反应步数为 10 000 步,用 Tripos 力场环境和 Use Current 电荷设置,选定氢原子进行结构优化。

采用蛋白晶体优化提炼技术,运用 Gromacs 3.3.1 程序^[4],进行动力学优化 D3 受体蛋白的三维结构。删除蛋白中的孤对电子,并给蛋白加电荷。复合物被居中放置在长方形的周期性盒子中,盒子尺寸为 $21 \times 19 \times 17$ (nm),复合物中任一原子距盒边缘的距离都大于 1.2 nm。模拟中时间积分步长为 2 fs,在形成的拓扑文件中加两个 Cl^- ,减掉两个水分子,从而使整个系统电荷为 0。设最大反应步数为 150 万步。将优化得到的 D3 受体蛋白结构存为 pdb 格式的文件。

模建的 D3 受体蛋白优化好之后,从文献[5]中选出两个刺桐属配体分子采用对接方法(DOCK 6.0)^[6]进行对接。通过 Sybyl 7.2 和的 VMD 技术^[7],提取以配体分子为中心在半径 6 \AA 空间的氨基酸残基。此步通过 Sybyl 7.2 程序中的 Extract 模块可得。刺桐属植物对中枢神经系统有抑制作用,故我们选取了这两个化合物来进行对接,研究它们的作用机理。

刺桐属配体分子与氨基酸残基结合体的键结合能将通过 Gaussian 03 程序包^[8]中的三系数密度泛函理论 B3LYP^[9-10],和 6-31G(d,p)基组^[11-13]计算获得。

2 结果与讨论

2.1 D3 受体横跨膜序列联配

表 1 是 rhodopsin 与 D3 受体序列联配表。D3 受体与牛视紫红质受体(rhodopsin)在 7 次跨膜区的序列同源率为 30%。模建得到的 D3 受体与模板牛视紫红质受体(rhodopsin)有相似的结构特征,它们的 3D 结构都具有 7 次跨膜,外观上也很相似。计算其同源率为 30%。一般当序列一致性大于 30%时,模建蛋白的结果具有较高的可信度^[14-16]。

通过分子动力学进行较深的优化,将体系的模拟温度设为 300 K。静电相互作用的计算采用 PME (particle mesh Ewald) 算法,动力学构象每 100 步输出一次,最大反应步数为 150 万步。得到 D3 受体蛋白模型。共有 348 个氨基酸残基。

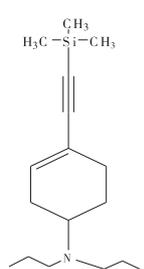
2.2 模建蛋白 D3 受体与配体分子对接

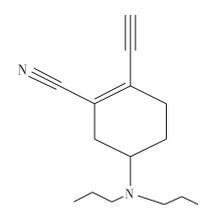
用模建好的 D3 受体蛋白与配体分子进行对接。各配体分子与 D3 受体蛋白的结合能量约在 $-160 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (表 2)。

表 2 配体分子结构及其与 D3R 对接的能量
(单位: $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

对比项	分子 1	分子 2
对接能量	-163.33	-161.59

配体分子的
平面结构





2.3 模建蛋白 D3 受体与配体分子作用位点分析

配体分子 1, 2 都位于 D3 受体蛋白的圆柱体空腔中。在空腔的内壁上分布着一些能和配体分子产生相互作用的氨基酸残基。在以配体分子 1 为质心,以半径为 6 \AA 的空间范围内,一共有 45 个氨基酸残基。我们近似的用配体分子 1 与这 45 个氨基酸残基的相互作用来代替配体分子 1 和 D3 受体蛋白的相互作用(虽然配体分子 1 也会和这个空间范围以外的氨基酸残基发生作用,但是这种处理是合理的,因为分子间作用力随分子间距离增大而迅速减小),这种研究方法的目的是找出配体/受体的活性结合位点(下同),即小分子和 D3 受体蛋白的相互作用被分解成配体分子 1 与这 45 个氨基酸残基的单独的相互作用。在分离单个氨基酸残基时,氨基酸残基末端都通过加氢原子进行了闭合(下同)。因此,氨基酸残基末端对结合能的影响是很小的,结合能主要是源于氨基酸残基分子其它部分与配体分子 1 的相互作用。

在以配体分子 2 为质心,以半径为 6 \AA 的空间范围内一共有 39 个氨基酸残基。配体分子 2 和 D3 受体蛋白的相互作用被分解成配体分子 2 与这 39 个氨基酸残基的单独的相互作用。

配体分子和氨基酸残基的结合能量见表 3, 表 4。配体分子和氨基酸残基的作用能量(E_b)被定义为:

$$E_b = \text{结合体的能量} - (\text{配体分子的能量} + \text{氨基酸残基分子的能量})$$

据此公式计算得到的能量为负值者是结合能(E_a 表示),为正值的是排斥能(E_c 表示)。

表 3, 表 4 中的数据显配体分子 1 和 2 都与 Asp117 残基分子的相互作用表现出最大的结合能,数值分别为 $-37.00 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $-16.67 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。表现出 Asp117 残基结合位点的特性。配体分子与 Asp117 残基分子相互作用示意图如图 1 所示。其次是 His272 残基。其结合能分别为 $-16.08 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $-12.95 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。其作用示意图如图 2(a)。配体分子 1 与残基 Lys296, Arg289,

表3 计算得到的能量(Hartree)及配体分子1和氨基酸残基的结合能(Ea)或排斥能(Ec)
(单位:kJ·mol⁻¹)

残基名称	配体分子1和氨基酸残基的结合能	氨基酸残基分子	Ea/Ec
Arg289	-1542.25607893	-531.689343808	-1.64
Asn200	-1427.76304167	-417.196979876	0.13
Asn275	-1427.76609005	-417.1999207	-0.15
Asp117	-1447.09454780	-436.514329923	-37.00
Asp190	-1447.05541971	-436.488624052	-1.80
Cys121	-1657.10743590	-646.541317802	-0.02
Cys187	-1657.13423219	-646.566947111	-3.08
Glu181	-1486.37088401	-475.803054736	-4.51
Glu98	-1486.39913354	-475.831818525	-3.16
Gly182	-1219.73839580	-209.172406319	0.32
Gly188	-1219.74178568	-209.179743903	10.67
His272	-1484.46270273	-473.890461371	-16.08
His277	-1484.07755021	-473.511396010	-0.11
Ile179	-1377.00322753	-366.436760905	-0.93
Ile189	-1376.99926339	-366.437197557	10.61
Leu171	-1377.00885701	-366.442702694	-0.11
Leu97	-1376.99099567	-366.424944195	0.16
Lys296	-1432.71575951	-422.144646613	-13.12
Met183	-1735.88173320	-725.315679692	0.15
Met91	-1735.87935416	-725.313223132	-0.05
Phe113	-1490.11589078	-479.552433741	6.96
Phe203	-1490.11503959	-479.5487781	-0.39
Phe268	-1490.11610232	-479.550022366	0.08
Phe269	-1490.11819266	-479.554266499	5.73
Ser176	-1334.28035452	-323.714203269	-0.10
Ser186	-1334.25496411	-323.688564024	-0.76
Ser207	-1334.27000249	-323.703626791	-0.69
Ser208	-1334.27750493	-323.711438810	0.12
Ser211	-1334.28029062	-323.713474077	-1.85
Thr122	-1373.60264191	-363.036560378	0.08
Thr276	-1373.59931793	-363.033363311	0.41
Thr291	-1373.58842958	-363.022438053	0.31
Thr292	-1373.59615246	-363.031968514	5.06
Trp293	-1621.67919286	-611.112984629	-0.25
Tyr191	-1565.34747366	-554.781397368	0.09
Tyr288	-1565.33095285	-554.765789539	2.49
Tyr40	-1565.34330008	-554.777385672	0.52
Tyr44	-1565.34232838	-554.775984676	-0.61
Val114	-1337.69077828	-327.124605662	-0.16
Val118	-1337.69391691	-327.127931357	0.33
Val167	-1337.69645587	-327.130366112	0.06
Val204	-1337.69419043	-327.129739729	4.36
Val273	-1337.69429149	-327.1280177	-0.16
Val190	-1337.70039183	-327.134436556	0.41
Val194	-1337.70015119	-327.134247974	0.55

注:配体分子1(-1010.56611130) B3LYP/6-31G(d,p)

Asp190, Cys187, Glu181, Glu98, Ser211 等都表现出释放能量的现象。而配体分子2与残基 Arg289, Lys296, Thr292 等都表现出释放能量的现象。

表4 计算得到的能量(Hartree)以及配体分子2和氨基酸残基的结合能(Ea)或排斥能(Ec)
(单位:kJ·mol⁻¹)

残基名称	配体分子2和氨基酸残基的结合能	氨基酸残基分子	Ea/Ec
Arg289	-1225.85460821	-531.689343808	-11.77
Asn200	-1111.35813340	-417.196998074	-0.94
Asn275	-1111.36134823	-417.199924428	-1.70
Asp117	-1130.68146452	-436.514332244	-16.67
Asp190	-1130.64999171	-436.488641461	-1.51
Cys121	-1340.70196778	-646.540876584	-0.83
Cys187	-1340.72763500	-646.566886687	0.07
Gln279	-1150.67316480	-456.512498538	0.29
Glu181	-1169.96011025	-475.803124493	9.94
Gly182	-903.333635328	-209.172545645	-0.82
Gly188	-903.340533300	-209.181801951	5.36
His272	-1168.05720858	-473.891496785	-12.95
His277	-1167.67225046	-473.511395567	-0.21
Ile179	-1060.59718752	-366.436762737	0.92
Ile189	-1060.59279493	-366.436886728	12.77
Leu171	-1060.60341871	-366.442698460	0.15
Lys296	-1116.31099065	-422.147742745	-6.48
Phe113	-1173.71337024	-479.552625715	0.08
Phe203	-1173.70944821	-479.548737858	0.17
Phe268	-1173.71143919	-479.550209450	-1.19
Phe269	-1173.71500753	-479.554604262	0.98
Ser186	-1017.84918756	-323.688430389	0.05
Ser207	-1017.86412580	-323.703647288	0.78
Ser208	-1017.87217932	-323.711442125	0.10
Ser211	-1017.87388403	-323.713481450	0.98
Thr271	-1057.19538822	-363.034728587	0.31
Thr276	-1057.19294547	-363.033887812	4.51
Thr292	-1057.19472954	-363.031972518	-5.20
Tyr178	-1248.92575812	-554.765044730	0.16
Tyr191	-1248.93993804	-554.781384855	5.83
Tyr288	-1248.92675667	-554.765752856	-0.60
Tyr44	-1248.93688924	-554.775961074	-0.40
Val114	-1021.28568094	-327.124601593	-0.80
Val118	-1021.28568094	-327.128185855	8.61
Val167	-1021.29125675	-327.130366461	-0.30
Val204	-1021.28989006	-327.130001977	2.33
Val273	-1021.28865504	-327.128012624	0.35
Val90	-1021.29509640	-327.134430144	0.29
Val94	-1021.29494361	-327.134256666	0.23

注:配体分子2(-694.160776074) B3LYP/6-31G(d,p)

Asp117 残基中碳氧双键上的氧原子能与配体分子1中距离最近的氢原子产生氢键,同时 Asp117 残基中与氧原子相连的碳原子的邻位分别是具有孤对电子的氮原子和离域 π 电子的苯环,这些孤对电子和 π 电子也加强了氢键的键强度。此外,配体分子1中氮原子具有吸电子作用,使得氮上所连的碳原子上的氢原子呈正电性,而 Asp117 残基带有一个电子,所以,配体分子1上氮原子所连的碳原子上的氢原子与 Asp117 残基产生静电引力,这也会加强氢键的键强度,这样在 Asp117 残基

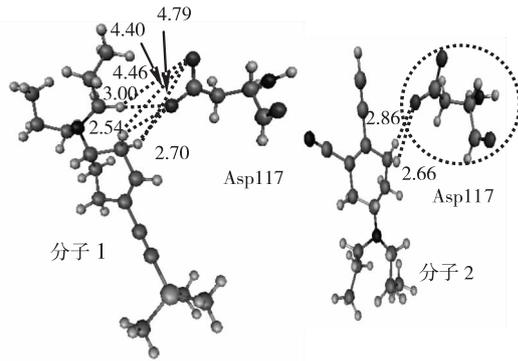
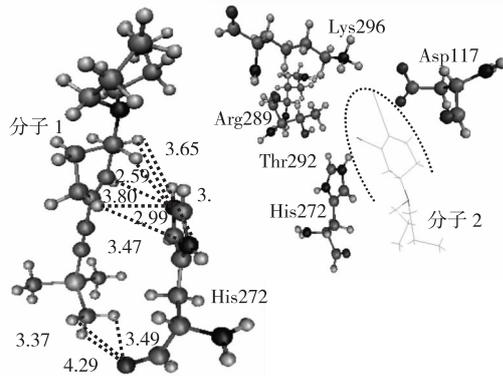


图 1 Asp117 残基与配体分子 1,2 作用示意图



(a) His272 残基与分子 1 作用示意图 (b) 残基 Asp117、

图 2 His272、Thr292、Arg289、Lys296 与分子 2 作用示意图

中就形成了以氧原子产生的氢键为核心,相邻的孤对电子和 π 电子以及分子其它部位协同作用的活性部位形成了配体分子 1 以氢键为核心,以及配体分子 1 其它部位协同作用的活性结合中心。配体分子 1 的活性部位和 Asp117 残基的活性中心相结合,实现了配体分子 1 对 D3 受体蛋白分子的活性抑制。

配体分子 2 与 Asp117 残基相互作用主要是通过氢键。配体分子 2 有离域 π 电子,苯环上的氢与 Asp117 残基上的氧形成氢键,由于苯环上连有氮原子及炔键,导致离域 π 电子密度降低,因而形成的氢键也较弱,所以其结合能不是很大。

从图 2(a) 可以看出,配体分子 1 与 His272 残基建立了多对氢键。配体分子 1 有离域 π 电子,苯环上的氢原子就与 His272 残基上的两个氮原子形成氢键。另外,His272 残基上的氧也与配体分子 1 形成氢键,形成如此多对的氢键,且键长都较小。因此,达到了配体分子 1 对 D3 受体蛋白的活性抑制。

图 2(b) 是配体分子 2 与残基 Asp117、His272、Thr292、Arg289、Lys296 相互作用的空间几何结构。这些氨基酸残基与配体分子 2 相互作用都表现为吸附现象,释放出能量。从图 2(b) 中可以看出这些残基将配体分子 2 包围在中间,形成一个半圆。这些残基形成

Asp117 - His272 - Thr292 - Arg289 - Lys296 五联体的一个活性结合体,将配体分子 2 包围在中间而发生作用,从而达到抑制 D3R 蛋白的功能。

残基 Ile189 和配体分子 1,2 都有较大的排斥能。Ile189 残基和配体分子 1 相互作用如图 3 所示。

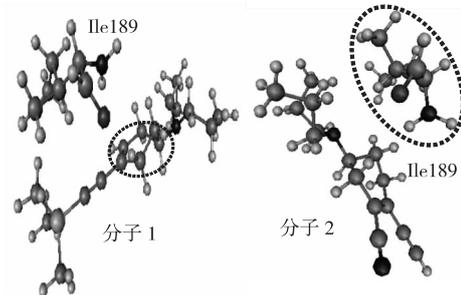


图 3 Ile189 残基与配体分子 1,2 作用示意图

由图 3 可知,配体分子 1,2 结合到 D3 受体蛋白分子上,都是以结合体形式稳定存在,都以 Asp117 残基为结合位点。形成三联体 Asp117 - His272 - Lys296 活性结合口袋与配体分子 1 相互作用,从而达到抑制 D3 受体蛋白活性的目的。而配体分子 2 形成五联体 Asp117 - His272 - Thr292 - Arg289 - Lys296 活性结合体中,抑制 D3 受体蛋白的活性。

3 结束语

用同源建模方法对 D3 受体三维结构进行了模建。为开发设计药物分子提供了一定信息。

选取两个刺桐属类药物小分子与模建的 D3 受体蛋白对接,得到的结合能都很大,约为 $-160 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。配体分子 1,2 与受体 D3 受体蛋白作用时,氢键是结合能的主要来源。都以 Asp117 残基为活性位点。配体分子 1 与三联体 Asp117 - His272 - Lys296 活性口袋相互作用。配体分子 2 被装进五联体 Asp117 - His272 - Thr292 - Arg289 - Lys296 活性结合体中。这可能是抑制 D3 受体蛋白活性的分子机理。

刺桐属植物有抑制中枢神经系统作用。从对接结果也可以看出,它对和中枢神经系统关系密切的 D3 受体蛋白确实有抑制作用,这从理论上分析其结合位点及作用情况得到暗示。

参考文献:

- [1] Grandy D K, Marchionni M A, Makam H, et al. Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(24):9762-9766.
- [2] SYBYL Molecular Modeling System, Version 7. 2 (CP), Tripos, Inc. St. Louis, MO.

- [3] Clark M, Cramer R D, Van Opdenbosch N. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field[J]. *J Comput Chem*, 1989, 10(8):982-1012.
- [4] Berendsen H J C, Postma J P M. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath[J]. *J Chem Phys*, 1984, 81(8):3684-3690.
- [5] Boeckler F, Gmeiner P. Dopamine D3 receptor ligands-Recent advances in the control of subtype selectivity and intrinsic activity[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1768(4):871-887.
- [6] Rarey M, Lengauer T. DOCK 4. 0 Manual Regents of the University of California[M]. New York: VCH Publishers, 1997.
- [7] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics[J]. *J Mol Graph*, 1996, 14(1):33-38.
- [8] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. Gaussian 03 (CP), Gaussian Inc., Wallingford CT, 2004.
- [9] Becke A D. Density-functional thermochemistry III The role of exact exchange[J]. *J Phys Chem*, 1993, 98(7):5648-5652.
- [10] Lee C, Yang W, Parr R G. Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density[J]. *Phys Rev B*, 1988, 37(2):785-792.
- [11] Hariharan P C, Pople J A. Effect of d-functions on molecular-orbital energies for hydrocarbons[J]. *Chem Phys Lett*, 1972, 16(2):217-219.
- [12] Binkley J S, Pople J A. Moller-plesset theory for atomic ground-state energies[J]. *Int J Quantum Chem*, 1975, 9(2):229-236.
- [13] Krishnan R, Frisch M J, Pople J A. Contribution of triple substitutions to the electron correlation-energy in 4th order perturbation-theory[J]. *J Chem Phys*, 1980, 72(7):4244-4245.
- [14] John M. Predicting protein three-dimensional structure [J]. *Curr Opin Biotech*, 1999, 10(6):583-588.
- [15] Marti-Renom M A, Stuart A C, Fiser A, et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29(1):291-325.
- [16] Al-Lazikani B, Jung J, Xiang Z, et al. Protein structure prediction[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5(1):51-56.

Dopamine 3 Receptor Homology Model and Its Application

MA Li-ying¹, XU Si-chuan²

(1. College of Environment and Life Science, Kaili University, Kaili 556011, China;

2. College of Chemistry Science and Engineering, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: With the crystal structure of Rhodopsin (resolution: 2.2 Å) as a template, D3R protein was modeled by homology modeling. Erythrina molecules were docked into the modeled protein D3R. With the ligand molecule selected as a centroid, a spatial dimension with a radius of 6 Å was selected in the docked D3R protein. Binding energy or repulsive energy was calculated between all amino acid residues and ligand molecules in the spatial dimension. Active sites for Erythrina molecules binding to the D3R protein have been found basing on the calculated binding energies.

Key words: Homology model; molecule docking; Dopamine 3 receptor