·实验研究·

胰高血糖素样肽-1 受体的分子动力学模拟研究

都宵晓[1,2],孟凡翠[2],刘　巍[2],汤立达[2]
(1 天津医科大学药学院,天津 300070; 2 天津药物研究院天津市新药设计与发现重点实验室,天津 300450)

[摘要] **目的**:采用分子动力学模拟方法研究胰高血糖素样肽-1 受体(GLP-1R)的激活机制。**方法**:分别构建激活态和失活态的 GLP-1R 结构,置于棕榈酰-油酰-卵磷脂(POPC)双层膜内,进行 50 ns 的分子动力学模拟,比较不同体系的构象并进行氢键、能量、主成分等性质分析。**结果**:结果表明失活态的胞外域整体倒向跨膜区,激活态和失活态的胞内第三 loop(ICL3)构象差异明显,可见 ICL3 在 GLP-1R 的激活中扮演着重要角色。氢键和能量分析结果均表明胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的 His7 *,Glu9 * 和 Asp15 * 在与 GLP-1R 的结合中起着较为重要的作用。**结论**:分子动力学模拟作为辅助手段可用于研究 GLP-1R 构象变化对其自身激活的影响以及 GLP-1 与受体结合时的激活机制,为以 GLP-1R 为靶点的药物研发提供一定的理论指导。

[关键词] 胰高血糖素样肽-1 受体;激活态;失活态;分子动力学;药物
[中图分类号] R965.1　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)08 - 0732 - 08

Molecular dynamics simulation study of glucagon-like peptide-1 receptor

DU Xiao-xiao[1,2], MENG Fan-cui[2], LIU Wei[2], TANG Li-da[2]
(1 *Pharmacy College*, *Tianjin Medical University*, *Tianjin* 300070, *China*; 2 *Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery*, *Tianjin Institute of Pharmaceutical Research*, *Tianjin* 300450, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the activation mechanism of glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) by molecular dynamics method. **Methods**: The active and inactive states of GLP-1R were constructed and embedded in a palmitoyl oleoyl phosphatidyl choline (POPC) bilayer. Molecular dynamics simulations were carried out on each system for 50 ns. Conformations of active and inactive states were compared, and hydrogen bond analysis, energy analysis and principal component analysis etc. were performed. **Results**: Conformation analysis showed that the N-terminal ectodomain of GLP-1R moved to the transmembrane domain in inactive state. The third intracellular loop (ICL3) was different between active and inactive states of GLP-1R, suggesting that ICL3 played a significant role in the activation of GLP-1R. The outcomes of hydrogen bond analysis and energy analysis indicated that His7 *, Glu9 * and Asp15 * of GLP-1 were important in the binding of GLP-1R. **Conclusion**: Molecular dynamics method can be used as a supplementary tool to study the effects of GLP-1R conformational changes on its own activation and the activation mechanism of GLP-1 binding to receptors, providing theoretical guidance for the development of drugs targeting GLP-1R.

[**Key words**] glucagon-like peptide-1 receptor; active state; inactive state; molecular dynamics; drugs

胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)是由肠道 L 细胞分泌的内源性肠促胰素,GLP-1 与受体结合后促进胰岛 β 细胞合成和分泌胰岛素,抑制胰岛 α 细胞分泌胰高血糖素,减缓胃排空,并通过中枢神经系统增强饱腹感来降低患者食欲[1-2]。因此,胰高血糖素样肽-1 受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)成为治疗 2 型糖尿病和肥胖症的药物靶点之一。但是,内源性 GLP-1 在血浆中易被二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4,

[基金项目] 天津市新药创制科技重大专项(18ZXXYSY00040)
[作者简介] 都宵晓,女,硕士研究生,主要从事药理学研究。联系电话:(022)23006858,E-mail: dxx021396@163.com。
[通讯作者] 汤立达,男,研究员,主要从事新药设计与评价研究。联系电话:(022)23006950,E-mail: tangld@tjipr.com。

DPP-4)降解而失去活性,导致体内半衰期较短,仅有1~2 min[3]。为了使 GLP-1 在临床上广泛应用,许多 GLP-1R 激动剂应运而生。此外,以 GLP-1R 为靶点的多靶点单分子药物成为目前的研究热点。所以,研究 GLP-1R 的结构和激活机制成为开发 GLP-1R 靶点药物的重要前提。

GLP-1R 是 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor,GPCR)B 类分泌素家族成员,B 家族受体具有共同的结构特征,由 1 个 N 端胞外结构域(*N*-terminal ectodomain,ECD)连接 7 个跨膜结构域(7 transmembrane domains,7TM)组成[4]。多肽配体与受体的结合机制是肽激素的 C 端与 ECD 区域形成初始复合物,使配体的 N 端与 7TM 结构域相互作用。N 端相互作用最终导致受体的激活和刺激下游与 G 蛋白和其他介导细胞内信号传递过程的效应物耦合[5]。

尽管已上市的 GLP-1R 激动剂有显著的药理作用,但以注射方式给药、无法长期控制血糖、产生胃肠道不良反应等仍然是该类药物存在的缺陷[6],因此,为了弥补上述不足,继续研发新型高效的 GLP-1R 激动剂或以 GLP-1R 为靶点的药物具有重要意义。理解 GLP-1 与 GLP-1R 的结合模式及激活机制可能会给药物设计提供依据,所以本研究利用分子动力学方法研究 GLP-1R 的结构特点和激活机制,为以 GLP-1R 为靶点的药物研发提供一定理论指导。

材料和方法

1 GLP-1R 结构构建

1.1 GLP-1R 失活构象 从晶体结构数据库(www.rcsb.org)下载 GLP-1R 失活态的结构(PDB code 6LN2),该结构为 GLP-1R 与 Fab7F38 的复合物[7],并含有一个负变构调节物 97Y(PF-06372222)。采用同源模建方法将突变残基更正,得到包含序列 Thr29-Arg421 的 GLP-1R 结构,作为 GLP-1R 的失活构象。为了考察 97Y 对构象的作用,分别构建含 97Y 分子和不含 97Y 分子的 2 个 GLP-1R 体系进行后续研究。为了简便,将 2 个体系分别称为 IGLP1 和 IGLP2。

1.2 GLP-1R 激活构象 从晶体结构数据库下载 GLP-1R 激活态的结构(PDB code 5VAI 和 5NX2),其中 5VAI[5] 为 GLP-1R 与其内源性配体 GLP-1 和 G 蛋白的复合物,5NX2[8] 为 GLP-1R 与部分激动剂的复合物。将 5VAI 和 5NX2 进行叠合,5NX2 仅保留残基 Glu139-Lys197 和 Glu373-Phe393,5VAI 保留除上述残基的所有残基,然后以此结构为模板采用同源模建方法补全残基,最终得到包含序列 Thr29-Arg421 的 GLP-1R 与 GLP-1 的复合物结构,作为 GLP-1R 的激活构象。为了理解激动剂如何激活 GLP-1R,构建了含 GLP-1 和不含 GLP-1 的 2 个体系,分别称为 AGLP1 和 AGLP2。

2 分子动力学模拟

对上步得到的结构在 GROMACS 软件中采用 pdb2gmx 工具生成坐标文件和力场参数文件,保留 GLP-1R 的 4 个二硫键(CYS46-CYS71,CYS62-CYS104,CYS85-CYS126 和 CYS226-CYS296),其中前 3 个二硫键处于 ECD 区域,起到稳定 ECD 结构的作用[9]。所用力场 GROMOS53a6,水分子选择 SPC 水模型。采用 g_membed 工具[10]将 GLP-1R 结构放入平衡好的由 256 个棕榈酰-油酰-卵磷脂(palmitoyl oleoyl phosphatidyl choline,POPC)分子组成的双层膜中,加入反离子使体系电荷中性。4 个体系的命名及最终组成见表 1。

表 1 各体系命名及组成

体系	GLP-1R	GLP-1	97Y	POPC	SOL	CL^-
AGLP1	1	1	0	224	25120	1
AGLP2	1	0	0	224	24350	2
IGLP1	1	0	1	244	16436	1
IGLP2	1	0	0	244	16435	2

分子动力学计算在 GROMACS 5.1 软件[11-12]中进行。POPC 的力场参数取自文献[13],该力场参数采用 GROMOS96 力场且能很好重现脂质分子的结构和水合情况。首先对体系采用最速下降法进行能量最小化,然后依次进行 100 ps NVT 和 100 ps NPT 的限制性分子动力学模拟对体系进行松弛,最后进行 50 ns 的分子动力学模拟并保存轨迹。温度和压力耦合方法分别选择 V-rescale 和 Parrinello-Rahman 方法。参考温度设为 310 K,步长设为 2 fs。长程静电作用采用 Particle Mesh Ewald(PME)方法考虑,短程静电作用采用 cut-off 方法考虑,截断半径设为 1.2 nm。

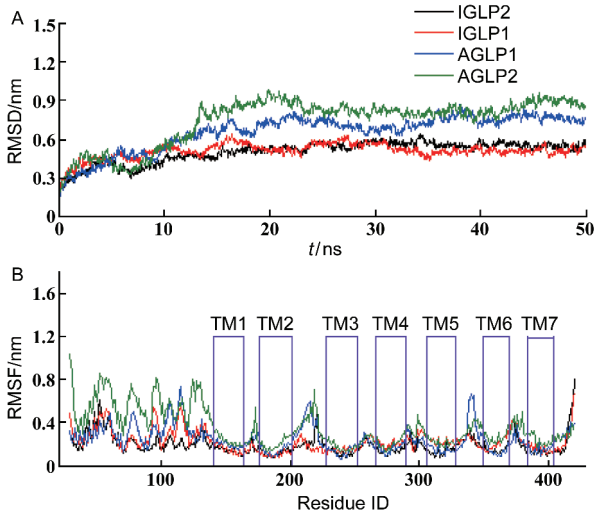
结 果

在本研究中为了区分 GLP-1 和 GLP-1R 的残

基,所有 GLP-1 中的残基名后面均加星号(*)以与 GLP-1R 的残基进行区分。

1 体系稳定性

为了考察体系的稳定性,计算了各体系模拟时间内骨架原子的均方根位移(root mean square displacement,RMSD)值,结果见图 1A。由图可见,2 个失活态体系 IGLP1 和 IGLP2 的 RMSD 值变化情况相似,在 5 ns 内急速都上升 0.4 nm,然后在 0.5 nm 附近震荡,震荡幅度较大,随着模拟时间的延长,RMSD 值均趋向稳定。激活态体系的 RMSD 值变化情况则与失活态完全不同,RMSD 值在前 10 ns 内的浮动范围在 0.5 nm 左右,但 10 ns 后,RMSD 值急剧上升,特别是 AGLP2 体系,甚至高达 0.9 nm,说明体系构象变化较大。另一个值得注意的是,在模拟时间后期,其 RMSD 值的浮动范围明显大于失活体系。即激活体系不论是 RMSD 值大小,还是涨落范围均大于失活体系。由图 1B 可以看出,均方根涨落(root mean square fluctuation,RMSF)值较大的区域出现在 ECD 区域和连接 7TM 的 loop 区。7TM 的 RMSF 值较小,基本都在 0.3 nm 以下,而连接跨膜螺旋的 loop 区 RMSF 值则相对较大。N 端 ECD 区域的 RMSF 相对于跨膜区域浮动较大,特别是 AGLP2 体系,有的残基 RMSF 达到了约 0.8 nm。

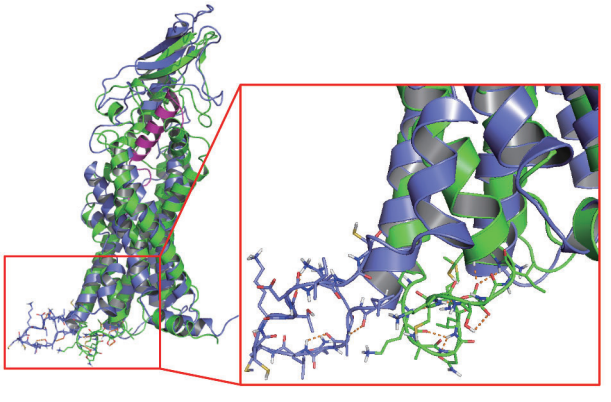


TM1 ~ TM7 分别对应 GLP-1R 的 7 个跨膜螺旋

图 1 GLP-1R 骨架原子的 RMSD 值(A)与各残基的 RMSF 值(B)

2 构象

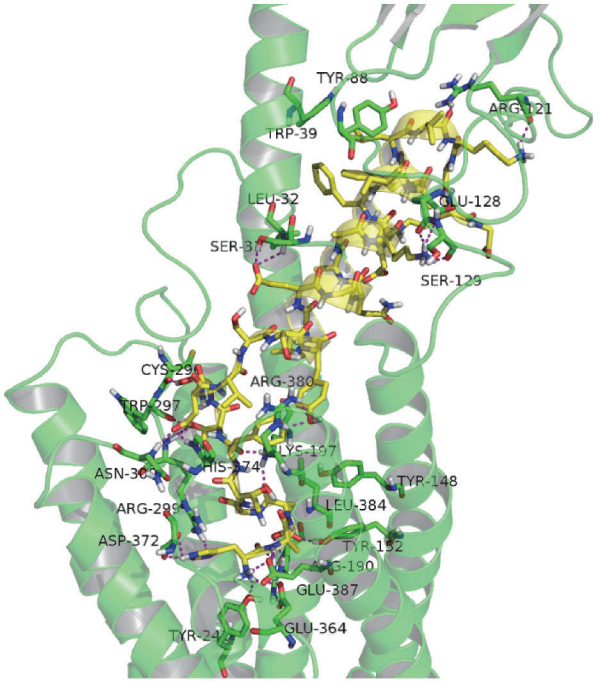
图 2 为分子动力学模拟结束后 IGLP1 和 AGLP1 体系的叠合图。当 GLP-1 与 GLP-1R 的 N 端 ECD 区结合后,会出现结构调整,但从 Thr13-Val33 仍保持连续的 α 螺旋结构,说明 GLP-1 的 α 螺旋结构在模拟时间内保持稳定。由于 IGLP1 体系的正构位点没有配体结合,ECD 区域整体移向跨膜区,最为明显的是 α 螺旋,该螺旋向跨膜区移动并倾斜至 GLP-1 所处位置,与跨膜区的胞外第二 loop(second extracellular loop,ECL2)和 ECL3 发生作用。除了配体结合区,个体系的跨膜区构象差异也较大。TM2 和 TM3 在靠近胞内区的一侧构象基本一致,但另一侧(胞外区)朝向完全不同:IGLP1 的 TM2 朝外倾斜,TM3 的 α 螺旋增长且朝 TM2 弯曲,导致 TM2 与 TM3 之间的 ECL1 的朝向与 AGLP1 体系相反。另一个较为明显的差异是 TM5 和 TM6 之间的胞内第三 loop(third intracellular loop,ICL3)。由图可见,AGLP1 的 ICL3 较长,构型舒展,残基间仅相邻残基间形成的 3 个氢键。而 IGLP1 的 ICL3 则形成了多个残基构成的氢键网络,如 Lys334 的羰基氧原子分别与 Lys336 和 Met340 的 NH 形成氢键,Asp344 的羧基与 Cys341 和 Lys342 的骨架原子形成氢键,Lys336,Asn338 也参与了氢键的形成,可见 ICL3 处的氢键网络起到了稳定结构的作用。通过对比激活态和失活态的 ICL3 可以看出 ICL3 可能在 GLP-1R 活化中起重要作用。Wessel 等[14]研究发现 GLP-1R 的 A316T 突变破坏了 Asn320(TM5)和 Glu364(TM6)之间的氢键,导致 TM5 和 TM6 分别朝胞内和胞外轻微移动,从而改变了连接 TM5 和 TM6 的 ICL3 的构象,进而通过改变与效应因子如 G 蛋白的作用影响下游信号传导。



AGLP1 和 IGLP1 体系的 GLP-1R 分别用蓝色和绿色 cartoon 显示;激动剂 GLP-1 显示为紫色 cartoon;POPC 水分子等均不显示;氢键显示为褐色点线

图 2 AGLP1 与 IGLP1 体系的叠合图

由图 3 可见,GLP-1 与 GLP-1R 的关键作用区域发生在 N 端,特别是 His7 * ~ Asp15 *,这些残基与 GLP-1R 形成了多个极性作用。GLP-1 的 His7 * 的 N 端 NH_3^+ 与 Glu364,Glu387 和 Tyr241 形成 3 个氢键,其侧链与 Asp372 形成氢键,且与 Arg299 形成 cation-π 相互作用;Glu9 的羧基与 Arg190 和 Tyr152 形成 3 个氢键,其骨架羰基与 Lys197 形成 1 个氢键;Thr13 * 和 Ser14 * 的羟基分别与 Trp297 和 Cys297 的羰基形成 1 个氢键;Asp15 * 与 Arg299 和 Asn300 的 NH 及 His374 形成 3 个氢键;Glu21 * 的羧基与 Ser31 的羟基和 Leu32 的骨架 NH 形成氢键;Lys26 * 与 Glu128 的羧基和 Ser129 的羰基氧原子形成 3 个氢键;Lys34 * 与 Arg121 的羰基形成 1 个氢键。除了氢键作用,GLP-1 与 GLP-1R 之间还存在疏水作用:如 Phe12 * 处于一个由 Leu384,Tyr148 和 His374 组成的疏水空腔,并与自身的 Val16 * 和 Tyr19 * 形成疏水作用;Phe28 *,Ile29 * 和 Leu32 * 与周围的 Trp39 和 Tyr88 形成疏水作用。另外,GLP-1 的 Tyr19 * 与 Arg380 形成极 cation-π 相互作用,其羟基氧与 Arg380 的胍基形成 2 个氢键。由以上分析可见,GLP-1 的 N 端在与 GLP-1R 的直接结合中起着重要作用,特别是残基 His7 *,Glu9 * 和 Asp15 *。

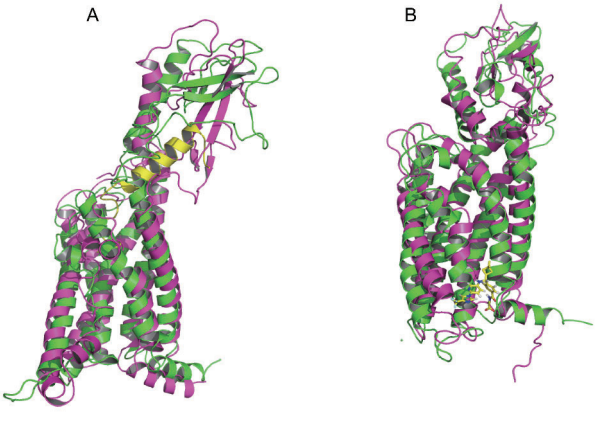


GLP-1 和 GLP-1R 的残基分别显示为黄色和绿色棍状模型

图 3 AGLP1 体系中 GLP-1 与 GLP-1R 的结合模式图

Gallwitz 等[15]的实验表明,GLP-1 的 N 端在与受体的结合中比较重要,而 C 端则在受体识别中起到关键作用。Adelhorst 等[16]的突变实验表明 Phe28 * 和 Ile29 * 残基则起到维持多肽二级结构的作用。Wilmen 等[17]对 ECD 域 6 个色氨酸进行研究,发现 4 个色氨酸(包括 Trp39)直接参与和配体的结合。

由图 4A 可见,去掉 GLP-1 后,GLP-1R 的构象发生了变化。由于少了 GLP-1 的占位,ECD 区域向跨膜域移动,特别是 2 个长的 β 折叠(Gly78 ~ Cys85 和 Gly98 ~ Cys104),由倾斜于膜平面变为近似垂直,同时 2 个较短的 β 折叠更接近跨膜域。跨膜域构象变化不大,较为明显的是 TM5 和 TM6 之间的 ICL3,由激活状态的 loop 结构形成一个较短的螺旋,这可能与 GLP-1R 的失活有关。GLP-1 结合是激活 GLP-1R 的重要条件,而 ICL3 在 GLP-1R 的激活中起重要作用,因此无 GLP-1 结合后 ICL3 的构象变化是关键因素。



A:AGLP1 和 AGLP2 分别显示为绿色和紫色 cartoon;B:IGLP1 和 IGLP2 分别显示为绿色和紫色 cartoon;GLP-1 显示为黄色 cartoon;97Y 分子显示为黄色棍状模型

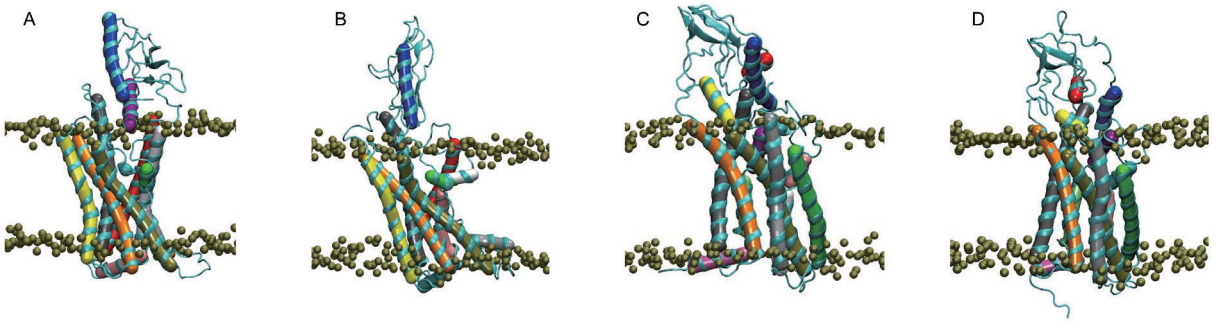
图 4 AGLP1 和 AGLP2 的叠合图(A)与 IGLP1 和 IGLP2 的叠合图(B)

由图 4B 可见,2 个体系构象差异最为明显的也是 ECD 区域,特别是该区域的 α 螺旋,该螺旋在 IGLP1 体系中长度为 Leu32 ~ Glu52,而在 IGLP2 体系中仅包括 Leu32 ~ Tyr42,其他残基为 loop 结构。97Y 分子嵌在 TM5 和 TM7 之间,当没有 97Y 后,TM5 靠近胞内区的一端以该 z 螺旋中部为铰轴向上旋转,向 97Y 占据的位置移动。TM2 和 TM3 之间的 ECL1 构象存在不同,其中残基 His212 ~ Leu224 在 IGLP1 体系为 α 螺旋,而在 IGLP2 体系则仅中间几

个残基形成 α 螺旋。TM6 和 TM7 之间的 ECL3 构象差异也较大,主要是靠近 TM7 端的残基二级结构不同。所有这些构象变化都说明,97Y 在稳定失活态 GLP-1R 构象中起着重要的作用。

3 Bendix 分析

α 螺旋的柔性在 GPCR 体系功能中扮演着重要角色。在膜蛋白中常见的特征弯曲或扭折螺旋、诸如此类的非理想螺旋的动态对蛋白功能非常关键。然而非直线螺旋用当前可视化方法无法达到目的,而 Bendix 方法可以解决这些问题。图 5 为对各体系的 α 螺旋进行 Bendix 绘制得到的图形。由图 5 可以看出,ECD 区域的 α 螺旋(深蓝色)在激活状态和失活状态下构象存在明显差异:激活状态下(图 5A 和 5B),该螺旋几乎与膜结构垂直;而在失活状态下(图 5C 和 5D),该螺旋则倾斜于膜表面。化合物 97Y 作为负变构调节物,起到维持 GLP-1R 失活态结构的功能,可见在无 97Y 分子的情况下,ECD 区域的 α 螺旋变短。



A:AGLP1;B:AGLP2;C:IGLP1;D:IGLP2;采用 VMD 插件 Bendix[18]绘制,
POPC 的磷原子显示为球状,其他原子和水分子均隐去

图 5 各体系的 Bendix 图

4 氢键

IGLP1 和 AGLP1 体系分别含有 97Y 和 GLP-1,因此对这 2 个体系进行了配体与受体间氢键情况分析,结果见表 2。

表 2 配体与 GLP-1R 形成氢键情况

体系	配体	氢键供体	氢键受体	出现概率[a]/%
IGLP1	97Y	NH@ Asn407	O6@ 97Y	71.3
		NH@ Asn407	O5@ 97Y	43.0
		HD21@ Asn406	O6@ 97Y	37.5
		HD21@ Asn406	O5@ 97Y	31.1
		N8-H8@ 97Y	OG1@ Thr355	16.7
		N8-H8@ 97Y	O@ Lys351	10.4
AGLP1	GLP-1	OH-HH@ Tyr152	OE1@ Glu9 *	100
		OH-HG@ Ser14 *	O@ Cys296	97.2
		OG1-HG1@ Thr13 *	O@ Trp297	97.6
		N-H@ Ala8 *	OE1@ Glu387	98.4
		NE-HE@ Arg380	OH@ Tyr19 *	89.2
		NE2-HE2@ His7 *	OD1@ Asp372	87.6
		NE-HE@ Arg190	OE2@ Glu9 *	76.1
		N-H1@ His7 *	OE1@ Glu387	70.5
		NH2-H21@ Arg190	OE2@ Glu9 *	62.5
		N-H1@ His7 *	OE1@ Glu364	61.0
		NE-HE@ Arg190	OE1@ Glu9 *	57.4
		N-H1@ His7 *	OE2@ Glu387	54.2
		N-H@ Asn300	OD2@ Asp15 *	53.8
		N-H@ Arg299	OD1@ Asp15 *	51.4
		NE2-HE2@ His374	OD2@ Asp15 *	49.4
		OH-HH@ Tyr205	OE2@ Glu27 *	45.4
		NZ-HZ1@ Lys197	O@ Glu9 *	45.0
		NH2-H21@ Arg299	ND1@ His7 *	44.2
		N-H@ Arg299	OD2@ Asp15 *	43.4
		N-H@ Asn300	OD2@ Asp15 *	42.6

a:采用 readHBmap.py 对 40 ~ 50 ns 的轨迹计算得到;AGLP1 体系仅列出出现概率 >40% 的氢键

由表 2 可见 97Y 主要与 GLP-1R 的 Asn406 和 Asn407 形成氢键,这几个氢键的出现频率较高。97Y 与 Thr355 和 Lys351 之间在模拟时间内也存在氢键生成,但出现概率均低于 20%。97Y 的羧基氧原子(O5 和 O6)作为氢键受体参与了与 Asn406 和 Asn407 氢键的形成,而其氨基(N8-H8)则作为氢键供体与 Thr355 和 Lys351 形成氢键。Asn406 和 Asn407 处于 TM7,而 Thr355 和 Lys351 则处于 TM6

上,即 97Y 通过与 TM6 和 TM7 上的残基形成氢键,起到稳定 GLP-1R 失活构象的作用,阻止其被激活。而对 AGLP1 体系来说,GLP-1 中参与氢键形成的残基主要有 His7 *,Glu9 *,Asp15 *,这 3 个残基形成的氢键在所有氢键中占比较大,在与 GLP-1R 的作用中起关键作用[19]。Glu9 * 的羧基氧原子与 Tyr152 的羟基形成的氢键频率为 100%,即该氢键在 40 ~ 50 ns 的模拟时间内一直存在。His7 * 在模拟过程中可与 Asp372,Glu387,Glu364 和 Arg299 形成氢键,其中与 Asp372 形成的氢键高达 87.6%。对 GLP-1R 来说,Arg190,Glu387 和 Arg299 这几个残基则较重要,参与了多个氢键的形成。

5 主成分分析(principal component analysis, PCA)

PCA 分析结果表明,4 个体系的 ECD 区域构象变化都较大。由图 6 可见 AGLP1 和 AGLP2 的跨膜区域均有变化,而失活态体系的跨膜区域变化则较小。对于 C 端 α 螺旋来说,4 个体系都有明显移动,但方向、大小各有不同。当 GLP-1R 与 GLP-1 结合时(AGLP1 体系),ICL3 及 C 端 α 螺旋都有较大位移,且朝向胞内区,并引起 TM1 和 TM7 也朝向胞内方向运动,说明 GLP-1R 激活后会引起胞内构象发生变化进而引起胞内信号传导。而当无 GLP-1 结合后,GLP-1R 的 ICL3 和 C 端 α 螺旋的运动方向与 AGLP1 体系相反,向膜内方向运动,同时 TM1 和 TM7 也朝向上运动。对比 IGLP1 和 IGLP2 体系可以发现,含有负变构调节分子 97Y 时,跨膜螺旋几乎没有较大运动,而去掉 97Y 分子后 GLP-1R 的 TM5 和 TM6 发生了明显位移,可见 97Y 分子与 GLP-1R 结合后通过限制 TM5 和 TM6 的运动,起到稳定 GLP-1R 的作用。据文献[7]报道,负变构调节物 97Y 分子是通过嵌入到 GLP-1R 的 TM5,TM6 和 TM7 之间的凹陷处来阻止其被激活的,这与我们的 PCA 分析结果相吻合。

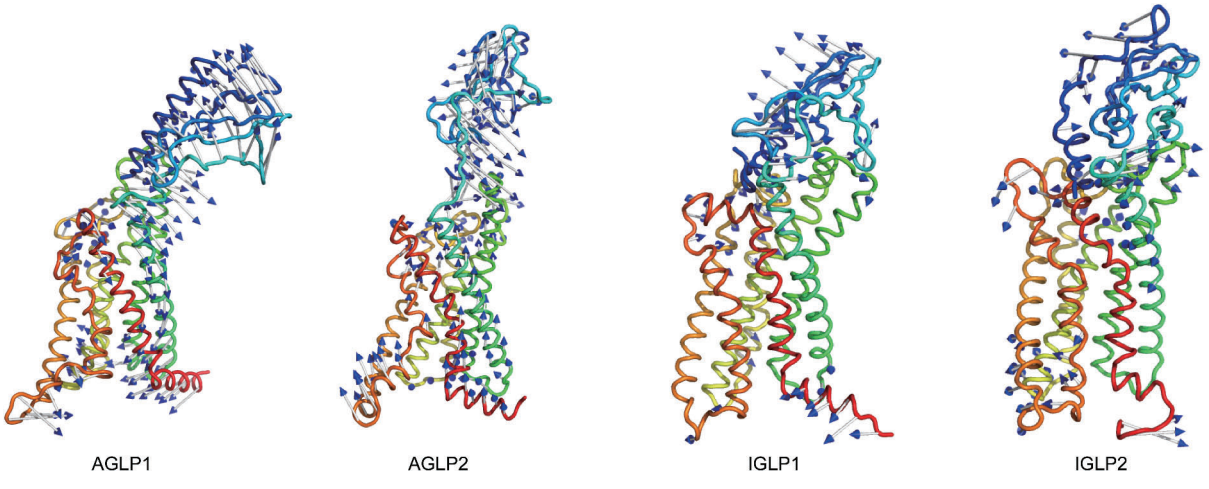


图 6 GLP-1R 的主要运动模式(modevectors. py 绘制)

6 能量

表 3 是以 40 ~ 50 ns 的轨迹计算所得的结合自由能信息。由表 3 可见,对这 2 个体系而言,静电作用、范德华作用和 SASA 利于配体与 GLP-1R 的结合,而极性溶剂化能则不利于配体与 GLP-1R 的结合。从数值上看,AGLP1 体系的各能量分项的绝对值都明显大于 IGLP1 体系,但由于其极性溶剂化能和静电作用能相互抵消,最终导致其总结合自由能反而高于 IGLP1 体系,即 GLP-1 与 GLP-1R 的结合弱于 97Y 与 GLP-1R 的结合。

表 3 AGLP1 和 IGLP1 体系中配体的结合自由能

$\bar{x} \pm s$, kJ·mol^{-1}

项目	能量	GLP-1	97Y
非极性能量项	范德华作用	−676.11 ± 35.59	−122.77 ± 10.38
	SASA	−90.19 ± 2.99	−15.54 ± 0.98
极性能量项	静电作用	−1261.59 ± 73.25	−355.34 ± 27.07
	极性溶剂化能	1830.36 ± 82.99	257.52 ± 27.99
	结合自由能	−197.52 ± 52.94	−236.13 ± 16.02

为了考察 GLP-1 各残基在与 GLP-1R 结合中的贡献,将能量按照残基进行分解,结果见图 7。由图

7 可见,排前 5 位的残基分别为 Glu9 *,Asp15 *,Lys26 *,His7 * 和 Glu21 *,这与前面的氢键分析结果一致。这些残基特别是 His7 *,Glu9 * 和 Asp15 * 参与了多个氢键的形成,即极性作用对于这些残基在与 GLP-1R 的作用中占主导。另一些残基如 Phe12 *,Phe28 *,Ile29 * 和 Leu32 * 等对结合能也有一定贡献,但其与 GLP-1R 的作用主要是靠疏水作用,如 Phe12 * 处于 Leu384,Tyr148 和 His374 形成的疏水空腔;Phe28 *,Ile29 * 和 Leu32 * 与周围的 Tyr88 和 Trp39 形成疏水作用。而其他残基特别是 Ser17 *,Ser18 *,Gly22 *,Ala30 *,Gly35 *,Arg36 * 和 Gly37 * 等的贡献则较小,说明这些残基与 GLP-1R 无特殊作用,仅是维持 GLP-1 的结构。

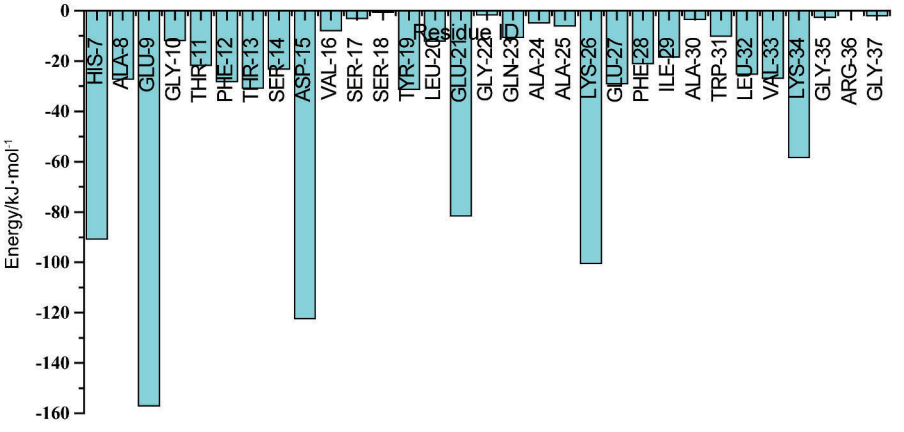


图 7 GLP-1 各残基对结合能的贡献

讨　论

已上市的 GLP-1R 激动剂虽然具有较好的药理作用,但仍存在不足。如大部分为需注射的肽类激动剂,易产生胃肠道不适,患者依从性低。研究人员仍致力于口服小分子药物的寻找[20],目前有 3 个处于临床研究阶段的口服小分子药物(PF 06882961,TTP-273 和 OWL-833)。理解 GLP-1R 的结构特点及其与配体的结合模式和激活机制是研制 GLP-1R 靶点药物的基础。最近,Zhang 等[21]通过冷冻电镜方法得到了 GLP-1,PF 06882961 与 GLP-1R 的复合物结构,结果发现 PF 06882961 和 GLP-1 的结合位点重合较好,揭示 PF 06882961 具有与 GLP-1 类似的信号传导和调控作用。TT-OAD2(TTP-273 类似物)与 GLP-1R 的复合物晶体结构[22]则显示 TT-OAD2 结合在 GLP-1R 跨膜区顶部,作为 GLP-1R 的偏向激动剂其结合位置与 GLP-1 重叠较为有限。结构分析表明所有激活结构在胞内一侧显示出类似的移动(TM6 朝外移动较大和 TM5 移动较小)。本文研究同样发现 GLP-1 结合后,连接 TM5 和 TM6 的 ICL3 构象发生较大变化,TM6 明显向外移动(见图 2),说明 ICL3 在 GLP-1R 激活过程中起重要作用。

激动剂结合后,GLP-1R 的 ECD 区域会发生较大构象变化,但变化程度取决于结合的激动剂,如 PF 06882961 引起的 N 端 α 螺旋的移动明显小于 GLP-1。不同激动剂会导致 TM7 和 ECL3 发生不同的移动,TM6 靠近胞外的一端在激动剂存在时发生解旋[21]。本文 PCA 分析结果表明在激动剂存在时 TM1 和 TM7 朝向胞内运动。晶体结构表明 GLP-1 的 Glu9 * 位于 GLP-1R 的结合空腔底部,与 Arg190 和 Tyr152 形成氢键,同时与 Arg190 和 Leu388 形成疏水作用。这与本文研究结果一致,由图 3 可见 Glu9 * 的羧基与 Arg190 和 Tyr152 形成 3 个氢键。GLP-1R 的结合空腔较大,且研究发现不同激动剂会导致不同构象变化,因此实验表征所得的晶体结构由于缺少动态信息而应用受限,分子动力学模拟可弥补其不足。Zhang 等[23]通过分子动力学模拟发现 GLP-1 与 GLP-1R 的 ECD 区域紧密结合进而限制了 ECD 区域的运动。本文研究结果也发现当 GLP-1 从 GLP-1R 解离后,N 端 ECD 区域的 RMSF 值明显较大,说明该部分残基的构象变化较大。

本文采用分子动力学方法对 GLP-1R 进行了研究,通过比较不同体系的构象并进行氢键、能量、主成分等性质分析,结果发现 ICL3 在 GLP-1R 的激活

中扮演着重要角色,GLP-1 的某些残基(如 His7 *, Glu9 * 和 Asp15 * 等)参与了多个氢键的形成并对结合能贡献较大,而有些残基则仅起到维持 GLP-1 结构的作用。从分子层面阐明 GLP-1 与 GLP-1R 的作用模式和结合特征,可为 GLP-1R 靶点药物的设计提供参考信息,促进新型 GLP-1R 靶点药物的研发。

[参 考 文 献]

[1] DRUCKER DJ. The cardiovascular biology of glucagon-like peptide-1[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1): 15 – 30.

[2] MEIER JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(12): 728 – 742.

[3] 朱延华, 翁建平. 胰高血糖素样肽-1 受体激动剂类药物的临床应用[J]. 中国实用内科杂志, 2014,34(10): 34: 942 – 946.

[4] WOOTTEN D, SIMMS J, MILLER LJ, *et al*. Polar transmembrane interactions drive formation of ligand-specific and signal pathway-biased family B G protein-coupled receptor conformations [J]. *PNAS*, 2013, 110(13): 5211 – 5216.

[5] ZHANG Y, SUN BF, FENG D, *et al*. Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein[J]. *Nature*, 2017, 546(7657): 248 – 253.

[6] DRAB SR. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists for type 2 diabetes: a clinical update of safety and efficacy[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2016, 12(4): 403 – 413.

[7] WU F, YANG L, HANG K, *et al*. Full-length human GLP-1 receptor structure without orthosteric ligands[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1272.

[8] JAZAYERI A, RAPPAS M, BROWN AJH, *et al*. Crystal structure of the GLP-1 receptor bound to a peptide agonist[J]. *Nature*, 2017, 546(7657): 254 – 258.

[9] BAZARSUREN A,GRAUSCHOPF U,WOZNY M,*et al*. *In vitro* folding, functional characterization, and disulfide pattern of the extracellular domain of human GLP-1 receptor[J]. *Biophys Chem*, 2002, 96(2 – 3): 305 – 318.

[10] WOLF MG, HOEFLING M, APONTE-SANTAMARÍA C, *et al*. Corrigendum: g_membed: Efficient insertion of a membrane protein into an equilibrated lipid bilayer with minimal perturbation [J]. *J Comput Chem*, 2016, 37(21): 2038.

[11] HESS B, KUTZNER C, VAN DER SPOEL D, *et al*. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation[J]. *J Chem Theory Comput*, 2008, 4(3): 435 – 447.

[12] ABRAHAM MJ, MURTOLA T, SCHULZ R, *et al*. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers[J]. *SoftwareX*, 2015, 1 – 2: 19 – 25.

[13] POGER D, MARK AE. On the validation of molecular dynamics simulations of saturated and Cis-monounsaturated phosphatidylcholine lipid bilayers: a comparison with experiment[J]. *J Chem Theory Comput*, 2010, 6(1): 325 – 336.

[14] WESSEL J, CHU AY, WILLEMS SM, *et al*. Low-frequency and rare exome chip variants associate with fasting glucose and type 2 diabetes susceptibility[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 5897.

[15] GALLWITZ B, WITT M, PAETZOLD G, *et al*. Structure/activity characterization of glucagon-like peptide-1[J]. *Eur J Biochem*, 1994, 225(3): 1151 – 1156.

[16] ADELHORST K, HEDEGAARD BB, KNUDSEN LB, *et al*. Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(9): 6275 – 6278.

[17] WILMEN A, VAN EYLL B, GÖKE B, *et al*. Five out of six tryptophan residues in the N-terminal extracellular domain of the rat GLP-1 receptor are essential for its ability to bind GLP-1[J]. *Peptides*, 1997, 18(2): 301 – 305.

[18] DAHL AC, CHAVENT M, SANSOM MS. Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(16): 2193 – 2194.

[19] GÓMEZ SANTIAGO C, PACI E, DONNELLY D. A mechanism for agonist activation of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor through modelling & molecular dynamics[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(2): 359 – 365.

[20] MÉNDEZ M, MATTER H, DEFOSSA E, *et al*. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of potent positive allosteric modulators of the glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(5): 2292 – 2307.

[21] ZHANG X, BELOUSOFF MJ, ZHAO P, *et al*. Differential GLP-1R binding and activation by peptide and non-peptide agonists [J]. *Mol Cell*, 2020, 80(3): 485 – 500.

[22] ZHAO P, LIANG YL, BELOUSOFF MJ, *et al*. Activation of the GLP-1 receptor by a non-peptidic agonist[J]. *Nature*, 2020, 577(7790): 432 – 436.

[23] ZHANG J, BAI Q, PÉREZ-SÁNCHEZ H, *et al*. Investigation of ECD conformational transition mechanism of GLP-1R by molecular dynamics simulations and Markov state model[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2019, 21(16): 8470 – 8481.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 – 11 – 30