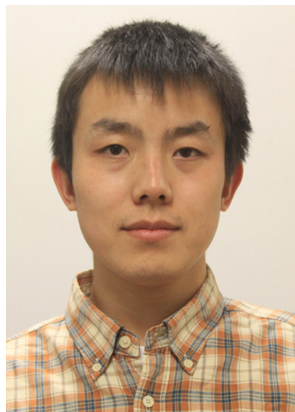


领域前沿 · 中国



赵强, 2002年加入清华大学饶子和院士的研究组, 并于2007年初获得清华大学博士学位。之后加入美国Scripps研究所Ray Stevens研究组做博士后, 开始从事膜蛋白结构尤其是G蛋白偶联受体的结构研究。2011年入选中国科学院“百人计划”, 进入上海药物研究所成立课题组, 开展G蛋白偶联受体(G-protein coupled peceptor, GPCR)的高分辨率结构解析以及基于结构的新药发现等研究, 主要集中在以下几个方向: GPCR结构解析新技术的开发与应用; 心血管疾病、自身免疫病、代谢性疾病中关键GPCR的结构解析及其作用机制研究, 以及基于结构的新药开发; GPCR与下游分子的复合物结构研究。2014年, 赵强研究员带领团队相继解析出嘌呤能受体P2Y₁₂分别结合拮抗剂类抗血栓药物和激动剂的三维晶体结构(Zhang K *et al.* Nature, 2014; Zhang J *et al.* Nature, 2014), 这些结构为深入理解P2Y₁₂受体介导血栓形成的分子机制以及受体分别结合不同类型配体的相互作用模式提供了新的线索, 有助于新型抗血栓药物的研发。

抗血栓靶点P2Y₁₂受体的结构学研究

张凯华 赵强*

(中国科学院上海药物研究所, 中国科学院受体结构与功能重点实验室, 上海 201203)

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndromes, ACS)是一种常见的心血管疾病, 临床表现主要为不稳定心绞痛、非Q波心肌梗死、Q波心肌梗死和心脏缺血性猝死等^[1]。即使得到最大限度的治疗, 仍然有5%~10%的ACS患者在初次发病后的一个月内出现心脏功能反复性失常, 甚至是死亡。我们知道, ACS属于冠心病的一种, 当冠脉内粥样斑块发生松动、裂纹或破裂时, 斑块内高度致血栓形成的物质暴露于血流中, 而这些物质将引起血小板在受损表面黏附、活化、聚集, 导致血栓的形成, 最终造成心肌血流灌注受损。因此, 血小板是ACS病理生理学上的关键因子。市场上也出现了诸多抗血小板药物, 它们有效缓解了这类患者的病情。血小板上有两种G蛋白偶联受体(P2Y₁和P2Y₁₂)与血小板聚集相关, 其中P2Y₁受体开启微弱的小血小板活化, 而由P2Y₁₂受体缓慢渐进地将信号放大。再加上P2Y₁₂受体在血小板膜上的表达占优势, 这使得P2Y₁₂受体成为理想

的抗血栓靶点。

氯吡格雷是继噻氯匹定的第二代P2Y₁₂受体拮抗剂, 需要在体内代谢成活性物质才能起到抗血小板效应。相似地, 随后出现的普拉格雷也是一种前体药物, 同样需代谢转变成活性成分。而替卡格雷是一种新型P2Y₁₂抑制剂, 它并不直接抑制激动剂ADP结合到P2Y₁₂受体上, 取而代之的是通过改变受体构象以阻止血小板活化^[2]。其他的P2Y₁₂受体拮抗剂包括坎格雷洛、依诺格雷等, 它们直接对P2Y₁₂受体产生抑制作用。然而, 目前多数P2Y₁₂受体抑制剂存在抗血栓疗效不足及治疗风险过高等缺陷, 同时, 个体受药差异性也比较严重。如何设计发展出抗血栓效果显著并有效降低自发性或手术后出血风险的P2Y₁₂抑制剂, 仍然面临各种困难, P2Y₁₂受体的三维结构以及受体配体识别方式等信息的缺失阻碍了我们对药物分子在受体上作用机理的理解, 进而制约了新的抗血栓药物的研发。

*通讯作者。Tel: 021-20231000-1785, E-mail: zhaogq@simm.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-20231000-1785, E-mail: zhaogq@simm.ac.cn

网络出版时间: 2014-07-25 17:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.9001.html>

人类基因组编码800多种G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs), 它们是规模最大、种类最多的膜蛋白家族之一^[3]。近年来, 关于GPCRs的结构生物学发展迅速, 这得益于蛋白质组学技术和结晶学方法的突飞猛进^[4]。通常蛋白序列中的灵活区域需要被改造, 高亲和力的配体被用来稳定受体性质, 然后选择合适的去污剂在脂立方相(lipidic cubic phase)方法下进行结晶实验, 这使高分辨率晶体结构解析变得更有可能是。

从2000年至今, 陆续有21种GPCRs的晶体结构和1种GPCR(CXCR1)的NMR结构被发表, 这些结构主要集中在class A家族, 但也覆盖了class B、class C和class F家族。除视紫红质受体(rhodopsin)本身存在天然配体外^[5], 其他解析的GPCR结构中其配体都是再结合。这些晶体结构中结合拮抗剂的受体有: 人源趋化因子受体4(human chemokine receptor type 4, hCXCR4)^[6]、人源多巴胺受体3(human dopamine receptor 3, hD3R)^[7]、人源组胺受体1(human histamine receptor 1, hH₁R)^[8]、人源κ型阿片受体(human kappa opioid receptor, hκ-OR)^[9]、小鼠μ型阿片受体(mouse mu opioid receptor, mμ-OR)^[10]、小鼠δ型阿片受体(mouse delta opioid receptor, mδ-OR)^[11]、人源孤啡肽受体(human nociceptin/orphanin FQ receptor, hNOP)^[12]、人源蛋白酶激活受体1(human protease-activated receptor 1, hPAR1)^[13]、人源鞘氨醇受体(human sphingosine 1-phosphate receptor, hS1PR1)^[14]、人源促肾上腺皮质激素释放因子受体1(human corticotropin-releasing factor receptor type 1, hCRF1)^[15]、人源胰高血糖素受体(human glucagon receptor, hGCGR)^[16]和人源SMO受体(human smoothed receptor, hSMOR)^[17]; 结合激动剂的受体有: 大鼠神经降压素受体1(rat neurotensin receptor 1, rNTSR1)^[18]、人源5-羟色胺受体2B(human 5-hydroxytryptamine receptor 2B, h5-HT_{2B})^[19]和人源5-羟色胺受体1B(human 5-hydroxytryptamine receptor 1B, h5-HT_{1B})^[20]; 既有结合拮抗剂也有结合激动剂的受体: 人源β₂肾上腺素能受体(human beta2 adrenergic receptor, hβ₂AR)^[21-22]、火鸡β₁肾上腺素能受体(turkey beta1 adrenergic receptor, tβ₁AR)^[23-24]、人源A₂腺苷受体(human alpha2 adenosine receptor, hA_{2A}R)^[25-26]、人源M₂乙酰胆碱受体(human M₂ muscarinic acetylcholine receptor, hM₂mAChR)^[27-28]。而大鼠M₃乙酰胆碱受体(rat M₃ muscarinic acetylcholine receptor, rM₃mAChR)^[29]、

人源趋化因子受体CCR5(human CCR5 chemokine receptor, hCCR5)^[30]和人源代谢型谷氨酸受体1(human metabotropic glutamate receptor 1, hmGlu₁)^[31]结构中配体为变构调节, 并且人源M₂乙酰胆碱受体(human M₂ muscarinic acetylcholine receptor, hM₂mAChR)^[28]也有变构调节剂结合的晶体结构被发表。

这里, 我们首次报道P2Y₁₂受体与一种抗血栓药物的复合物晶体结构, 分辨率在2.6埃。从系统进化来看, P2Y₁₂受体属于class A家族中的delta分支。为了达到顺利结晶的目的, 我们基于P2Y₁₂野生型序列, 在第三个胞内环区插入了热稳定性脱辅基细胞色素b₅₆₂ RIL(BRIL), 在位于第七个跨膜区的N[D]P^{7.50}xxY基序中引入提高蛋白产量的D294^{7.49}N(上标采用Ballesteros-Weinstein命名法)突变。并使用来自阿斯利康公司的抗血栓候选药物AZD1283(ethyl 6-(4-((benzylsulfonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-5-cyano-2-methylnicotinate)作为配体, 其本质是P2Y₁₂受体的一种非核苷酸类可逆性拮抗剂。这些措施显著提高了蛋白质性质, 并且生物功能实验证明对蛋白序列进行的改造并没有破坏P2Y₁₂受体的天然构象。

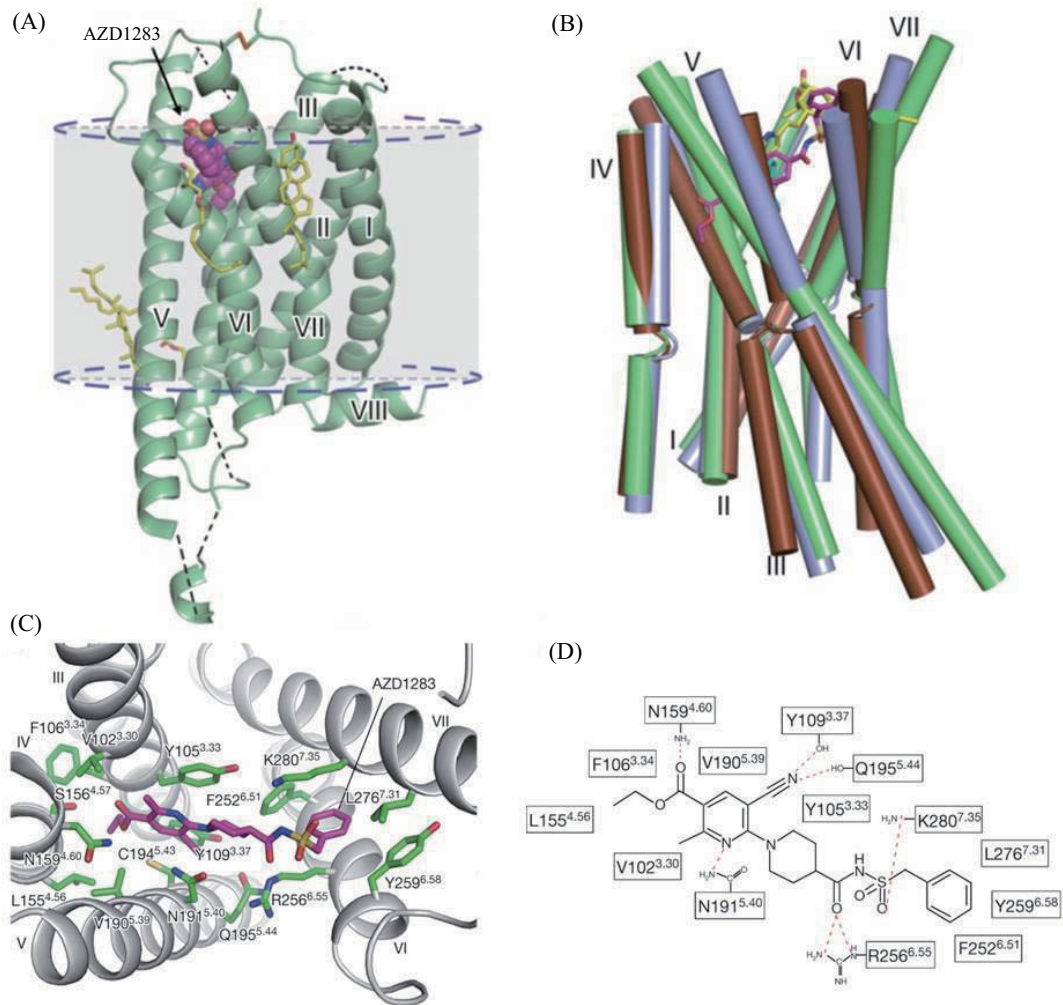
P2Y₁₂受体的晶体结构包含典型的七次跨膜螺旋, 螺旋之间存在相互作用, 形成稳定的堆叠。而这种保守的三维空间结构正是GPCR发挥重要生物功能的基础。因为第三个跨膜螺旋处于结构的中心位置, 并与剩余其他跨膜螺旋(除第一个距离较远外)形成保守的相互作用, 所以第三个跨膜螺旋构成了P2Y₁₂结构骨架的核心。与其他已知结构的GPCR进行跨膜区域比较, 可以发现P2Y₁₂的第五个以及第六个跨膜螺旋发生很大的变化, 尤其是第五个跨膜区域非常突出, 表现得直且长。结构中明显可见由N末端上C17与第七个跨膜螺旋上C270^{7.25}形成的一对二硫键, 但是另一对被认为保守的二硫键(C97-C175)并未观察到, 这可能与第二个胞外环区(C175位于此区域)的柔性有关。P2Y₁₂受体结构中结合有两个胆固醇分子, 揭示了胆固醇分子在受体信号传导中的作用机理(图1A和图1B)。

AZD1283在P2Y₁₂受体上的结合口袋由第三个到第七个跨膜螺旋形成。在此前解析的GPCR结构中, 只有PAR1以类似的方式与配体相互作用。而这也可能是delta家族受体的共有特征。结合口袋中的一系列氨基酸侧链参与了多对与配体间的极性和疏水作用。可以观察到Y105^{3.33}的苯环与AZD1283的

烟酸基团、哌啶基团分别形成了 π - π 、疏水相互作用, 而F252^{6,51}、R256^{6,55}、Y259^{6,58}、L276^{7,31}和K280^{7,35}形成的疏水口袋容纳着AZD1283的苯基(图1C和图1D)。

有功能实验显示, 在P2Y₁₂受体结构中未形成二硫键的C97与某些药物(比如普拉格雷)活性代谢产物可发生共价结合。而C97所在的位点却不包含于AZD1283的结合口袋, 这也暗示着P2Y₁₂受体可能

存在其他的配体结合口袋, 容纳与AZD1283不同的配体。建立分子对接模型后, 我们发现R-138727(普拉格雷的活性代谢产物)的结合位置与AZD1283所在的结合位置并无直接重叠。其他报道又提示核苷酸类配体(如2MeSADP等)与药物活性代谢产物(如R-138727等)的结合位置一致, 并且配体结合实验也支持这种可能性, 即P2Y₁₂受体潜在的非单一配体结合口袋是嘌呤能受体与配体结合的特色机制。



A: P2Y₁₂受体的卡通图。P2Y₁₂结构、AZD1283分别用浅绿色带和紫红色球表示。另外黄色碳骨架表示胆固醇和脂类, 黄色棒条表示二硫键, 而黑色虚线和紫色虚线分别表示结构信息丢失的序列和胞膜边界; B: P2Y₁₂(浅绿色圆柱)受体与 β 2肾上腺素受体(PDB ID: 2RH1, 棕色)、凝血酶受体PAR1(PDB: 3VW7, 浅蓝色)比较的侧面图。配体颜色: AZD1283: 紫红色; carazolol: 蓝绿色; Vorapaxar: 黄色; C: P2Y₁₂受体中结合AZD1283(紫红色碳骨架)的关键氨基酸(绿色碳骨架); D: P2Y₁₂与AZD1283结合的示意图。虚线表示极性相互作用。其他元素: 氧: 红色; 氮: 深黑色; 硫: 黄色。

A: cartoon representation of P2Y₁₂R. P2Y₁₂R is coloured green. AZD1283 is shown as magenta spheres. Cholesterol and lipids have yellow carbons. The disulphide bridge is shown as lime sticks. Missing loops and membrane boundaries are indicated as black and blue dashed lines, respectively; B: side views of P2Y₁₂R (green cylinders) compared with β 2AR (PDB accession 2RH1, brown) and PAR1 (PDB accession 3VW7, blue). The ligands AZD1283, carazolol and vorapaxar are shown as sticks with magenta, cyan and yellow carbons, respectively; C: key residues (green carbons) in P2Y₁₂R for AZD1283 (magenta carbons) binding; D: schematic representation of interactions between P2Y₁₂R and AZD1283. Polar interactions are shown as red dashed lines. Other elements are coloured as follows: oxygen: red; nitrogen: dark blue; sulphur: yellow.

图1 P2Y₁₂受体结合拮抗剂AZD1283的晶体结构(根据参考文献[32]修改)

Fig.1 The crystal structure of P2Y₁₂ receptor in complex with an antagonist AZD1283 (modified from reference [32])

参考文献 (References)

- 1 Oprea AD, Popescu WM. P2Y₁₂ receptor inhibitors in acute coronary syndromes: What is new on the Horizon? *Cardiol Res Pract* 2013; 2013: 195456.
- 2 Nawarskas JJ, Clark SM. Ticagrelor: A novel reversible oral antiplatelet agent. *Cardiol Rev* 2011; 19(2): 95-100.
- 3 Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG & Schiöth HB. The G-protein coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1256-72.
- 4 Tate CG, Schertler GF. Engineering G protein-coupled receptors to facilitate their structure determination. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19(4): 386-95.
- 5 Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000; 289(5480): 739-45.
- 6 Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, *et al.* Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 2010; 330(6007): 1066-71.
- 7 Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, *et al.* Structure of the human dopamine D₃ Receptor in Complex with a D₂/D₃ selective antagonist. *Science* 2010; 330(6007): 1091-5.
- 8 Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, *et al.* Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin. *Nature* 2011; 475(7354): 65-70.
- 9 Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, *et al.* Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JD₁Tic. *Nature* 2012; 485(7398): 327-332.
- 10 Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, *et al.* Crystal structure of the mu-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 2012; 485(7398): 321-6.
- 11 Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, *et al.* Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 2012; 485(7398): 400-4.
- 12 Thompson AA, Liu W, Chun E, Katritch V, Wu H, Vardy E, *et al.* Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 2012; 485(7398): 395-9.
- 13 Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, *et al.* High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* 2012; 492(7429): 387-92.
- 14 Hanson MA, Roth CB, Jo E, Griffith MT, Scott FL, Reinhart G, *et al.* Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* 2012; 335(6070): 851-5.
- 15 Hollenstein K, Kean J, Bortolato A, Cheng RK, Dore AS, Jazayeri A, *et al.* Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* 2013; 499(7459): 438-43.
- 16 Siu FY, He M, de Graaf C, Han GW, Yang D, Zhang Z, *et al.* Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* 2013; 499(7459): 444-9.
- 17 Wang C, Wu H, Katritch V, Han GW, Huang XP, Liu W, *et al.* Structure of the human smoothened receptor bound to an anti-tumour agent. *Nature* 2013; 497(7449): 338-43.
- 18 White JF, Noinaj N, Shibata Y, Love J, Kloss B, Xu F, *et al.* Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* 2012; 490(7421): 508-13.
- 19 Wacker D, Wang C, Katritch V, Han GW, Huang XP, Vardy E, *et al.* Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* 2013; 340(6132): 615-9.
- 20 Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V, *et al.* Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science*; 340(6132): 610-4.
- 21 Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta₂-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007; 318(5854): 1258-65.
- 22 Wacker D, Fenalti G, Brown MA, Katritch V, Abagyan R, Cherezov V, *et al.* Conserved binding mode of human beta₂ adrenergic receptor inverse agonists and antagonist revealed by X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* 2010; 132(33): 11443-5.
- 23 Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, *et al.* Structure of a beta₁-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2008; 454(7203): 486-91.
- 24 Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehme R, Edwards PC, Leslie AG, *et al.* The structural basis for agonist and partial agonist action on a β₁-adrenergic receptor. *Nature* 2011; 469(7329): 241-4.
- 25 Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 2008; 322(5905): 1211-7.
- 26 Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG, *et al.* Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science* 2011; 332(6027): 322-7.
- 27 Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, *et al.* Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 2012; 482(7386): 547-51.
- 28 Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, *et al.* Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 2013; 504(7478): 101-6.
- 29 Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, *et al.* Structure and dynamics of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 2012; 482(7386): 552-6.
- 30 Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, *et al.* Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 2013; 341(6152): 1387-90.
- 31 Wu H, Wang C, Gregory KJ, Han GW, Cho HP, Xia Y, *et al.* Human class C G protein-coupled metabotropic glutamate receptor 1 in complex with a negative allosteric modulator. *Science* 2014; 344(6179): 58-64.
- 32 Zhang K, Zhang J, Gao ZG, Zhang D, Zhu L, Han GW, *et al.* Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an anti-thrombotic drug. *Nature* 2014; 509(7498): 115-8.