

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2013.03.02

# Ydj1p 二聚体中 $\beta 14 \sim \beta 15$ 与 domain-III 分离的 拉伸分子动力学模拟研究

王浩<sup>1</sup>, 徐利楠<sup>1</sup>, 孙玉娜<sup>1</sup>, 沈曼莉<sup>2</sup>, 薛友林<sup>3</sup>, 李辉<sup>1</sup>, 宋有涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 辽宁大学环境学院, 辽宁 沈阳 110036; 3. 辽宁大学轻型产业学院, 辽宁 沈阳 110036)

**摘要:** 分子伴侣 Hsp40 是一种以二聚体的形式调控非天然多肽折叠的热激蛋白。本文通过拉伸分子动力学研究了酵母 Hsp40 家族成员 Ydj1p 二聚体中  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 的分离过程, 深入探讨了影响 Ydj1p 二聚体稳定性的重要残基和相互作用力。研究表明, 残基 Thr366、Asp368、Cys370、Leu372 和 Phe375 在 Ydj1p 二聚体的形成过程中发挥着重要的作用。其中,  $\beta 14 \sim \beta 15$  中的残基 Thr366 和 Asp368 分别通过与 domain-III 内的残基 Asp291、Trp292 和 Trp292、Lys294 之间形成的氢键, Asp368 通过与 domain-III 内的残基 Lys314 形成盐桥, Cys370、Leu372 和 Phe375 则是通过与 domain-III 形成疏水作用力来稳定 Ydj1p 二聚体结构。

**关键词:** 分子伴侣; Hsp40; Ydj1p; 二聚体; 拉伸分子动力学

**中图分类号:** R978.1+6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-5565(2013)-03-167-05

## Steered molecular dynamics simulation of the binding of $\beta 14 \sim \beta 15$ and domain-III in Ydj1p dimer

WANG Hao<sup>1</sup>, XU Li-nan<sup>1</sup>, SUN Yu-na<sup>1</sup>, SHEN Man-li<sup>2</sup>,  
XUE You-lin<sup>3</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, SONG You-tao<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. School of Environmental

Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 3. College of Light Industry, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

**Abstract:** The molecular chaperone Hsp40 functions as a dimer to regulate non-native polypeptides folding. In this study, we have performed steered molecular dynamics (SMD) simulation to investigate the dissociation process between the  $\beta 14 \sim \beta 15$  and domain III in yeast Hsp40 homologue Ydj1p C-terminal dimer, and further investigate the important residues and intermolecular interactions that influencing Ydj1p dimer stability. Our data indicate that residues Thr366、Asp368、Cys370、Leu372 and Phe375 is critical for Ydj1p dimer formation; Residues Thr366 and Asp368 form hydrogen bond with residues Asp291, Trp292 and Trp292, Lys294 respectively. Residue Asp368 forms salt bridge with residue Lys314, and residues Cys370, Leu37 and Residue Cys370、Leu372 and Phe375 form hydrophobic interaction with certain residues in domain-III to stabilize Ydj1p dimer structure.

**Keywords:** Molecular Chaperone; Hsp40; Ydj1p; Dimer; Steered Molecular Dynamics

Hsp40 在原核细胞和真核细胞中广泛存在, 它作为 Hsp70 的辅助伴侣可以与 Hsp70 共同参与多种重要的生命活动, 如非天然多肽的折叠、多聚体的组装、细胞器蛋白的转运及错误折叠蛋白的降解

等<sup>[1-3]</sup>。Hsp40 可分为 I、II、III 三个亚型, 每个亚型都含有一个氨基酸序列高度保守的 J 结构域。

Ydj1p 是酵母的细胞质中 Hsp40 的 I 型同族物, 它不仅对 Hsp70 家族 Ssa1p 的 ATP 酶活性具有调节作用, 而且对高温下酵母的生长是必需的, 并能

收稿日期: 2013-02-27; 修回日期: 2013-04-07.

基金项目: 国家自然科学基金 (30970152), 辽宁省教育厅优秀人才项目 (2009R26) 资助。

作者简介: 王浩, 男, 在读研究生。研究方向: 生物信息学。

\* 通讯作者: 宋有涛, 男, 教授; 研究方向: 淀粉样蛋白聚集的分子机制; E-mail: ysong@lnu.edu.cn.

够帮助蛋白跨越内质网和线粒体膜<sup>[4]</sup>。细胞中 Ydj1p 以二聚体的形式存在,当二聚化遭到破坏后会引引起功能上的严重缺陷<sup>[5-7]</sup>。Ydj1p 晶体结构显示,二聚化相互作用区域主要集中在其 domain-II (258 ~ 335) 和二聚化基序(336 ~ 378)内<sup>[8]</sup>。其中,二聚化基序由一个  $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha 3$ )、两个  $\beta$  折叠 ( $\beta 14$ 、 $\beta 15$ ) 及  $\alpha 3$  和  $\beta 14$  之间的 loop 组成; domain-III 则包含一个主要的  $\beta$  折叠域 ( $\beta 8$ 、 $\beta 9$ 、 $\beta 12$ 、 $\beta 13$ ) 和一个次要的  $\beta$  折叠域 ( $\beta 10$ 、 $\beta 11$ ) 及连接主次  $\beta$  折叠域的  $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha 2$ )。目前,研究者推测 Ydj1p 单体可能通过两种机制形成二聚体:第一,通过  $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  及  $\alpha 3$  前面的 loop 内的疏水性残基之间的疏水相互作用;第二,二聚化基序内的  $\beta$  折叠 ( $\beta 14$ 、 $\beta 15$ ) 与 domain-III 的主次  $\beta$  折叠域之间形成的  $\beta$  折叠网。除此之外, $\beta 14$  与  $\beta 15$  间的残基 L372 的疏水性侧链与 domain-III 内  $\beta$  折叠上残基形成的疏水性口袋也是 Ydj1p 形成二聚体的诱因之一<sup>[8]</sup>。但是,Ydj1p 二聚化时具体相互作用的残基及其动力学过程仍然没有被阐述清楚。

拉伸分子动力学模拟 (SMD, Steered molecular dynamics simulation) 是一种模拟原子力显微镜单分子操作过程的方法,可以用来评估两个生物分子之间相互作用<sup>[9-10]</sup>。通过沿着给定方向施加一外力 (或简谐势) 于配体或蛋白的某一部分可以用来研究蛋白二聚体的分离过程,对该过程中能量、氢键、疏水、盐桥等的分析可以找出关键的残基位点及主要的相互作用力,这将其逆过程即蛋白单体如何进行二聚化提供理论依据。因此,本文采用拉伸分子动力学模拟的方法详细的探讨了 Ydj1p 二聚体的  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 的解离过程。

## 1 计算方法和条件

### 1.1 分子动力学模拟

本研究在 Gromacs 4.0 软件中完成<sup>[11]</sup>,模型为酵母 Hsp40 Ydj1p C 端二聚体片段晶体结构 (PDB 编号 1XAO)<sup>[8]</sup>。所有模拟在 GROMOS96 43a1 力场中完成,蛋白任一原子距盒子边缘的距离大于  $10 \text{ \AA}$ 。蛋白溶于约含 19 186 个 SPC 水分子的溶液中,溶液体系加入 14 个  $\text{Na}^+$  使电荷达到平衡。然后整个体系在水溶液中进行 2 000 步的能量最小化和 80ps 的位置限制性模拟。之后整个体系在 300K、pH7 的条件下进行 10ns 的平衡动力学模拟,所得平衡结构在同样条件下用于拉伸动力学研究。拉伸组  $\beta 14 \sim \beta 15$  (残基 366 ~ 375) 及参照组 domain-III (258 ~ 335) 的选取以晶体结构中相互作用的区域为基础,

$\beta 14 \sim \beta 15$  的质心被施加一个速度恒定的拉力使其沿着远离 domain-III 的方向解离。轨迹坐标每 0.2ps 收集一次,模拟时间为 1.2ns。

### 1.2 拉伸速度和弹簧系数的确定

在恒速拉伸动力学模拟中,速度和弹簧系数是影响实验结果准确性的重要因素。通常要找到速度和所需最大力之间的变化曲线的拐点,该点以下的速度为可接受的合理速度,且速度选择的越小,得到的结果越接近真实情况<sup>[9,12]</sup>。因此进行了 10 组不同速度下的拉伸实验 (0.003 nm/ps ~ 0.06 nm/ps),最终选取 0.003nm/ps 为最适速度。另外,弹簧系数必须选取得足够高,以保证在拉伸过程中所拉伸区域的正常分离和取样,但弹簧系数选取得太高也会给拉力带来显著的误差<sup>[9]</sup>。因此进行了 6 个不同弹簧系数的测定 ( $50 \sim 2\,000 \text{ kJ/mol} \cdot \text{nm}^{-2}$ ),最终选取  $500 \text{ kJ/mol} \cdot \text{nm}^{-2}$  为最适弹簧系数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Ydj1p 二聚体的结构稳定性分析

为了得到稳定的拉伸初始结构,首先对 Ydj1p 的二聚体结构进行了 10ns 的分子动力学模拟。由图 1A 中 RMSD 值的变化可以初步判定,Ydj1p 二聚体体系在 6ns 后基本达到平衡,其 RMSD 值稳定在 0.33nm 左右。这表明,Ydj1p 二聚体在经过 10ns 的平衡模拟后,其最终的蛋白结构可以作为拉伸动力学模拟的起始模型。图 1B 中显示了 10ns 时刻二聚化基序内能与 domain-III 产生相互作用的残基。由该图可以清晰看出当 Ydj1p 二聚体达到平衡后二聚化基序内相互作用的残基主要分布在  $\alpha 3$ 、 $\alpha 3$  前的 loop 及  $\beta 14$ 、 $\beta 15$ ,这与先前的研究是一致的<sup>[8]</sup>。本文选取  $\beta 14$ 、 $\beta 15$  作为拉伸组, domain-III 作为参照组 (见图 1B),对  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 的分离过程进行了详细分析。

### 2.2 $\beta 14 \sim \beta 15$ 与 domain-III 分离过程的能量分析

拉伸动力学中  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 的分离过程实质是一个全原子的热力学运动过程。这种热力学运动程度主要是通过拉伸区域之间相互作用力的破坏消耗的能量来体现,因此,体系的能量分析直接反映非平衡运动过程中相互作用力的变化。如图 2 所示,由总能量的曲线可以看出,在 0 ~ 524ps 时随着体系拉力的增加,体系逐渐进入非平衡状态,拉伸区域间相互作用的能量随着非平衡动力学模拟的进行略有降低,表明在这个时期  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 中存在着较强的分子间作用力;524ps 之后  $\beta 14 \sim \beta 15$  在外力的作用下开始与 domain-III 逐渐

分离,1ns时这两个区域完全分开,能量衰减到零。此外,静电能量和范德华能量曲线与总能量曲线的趋势相似,然而在拉伸前期(0~524ps)与拉伸后期(524~1200ps)静电能量和范德华能量的主导地位却有所不同,即拉伸前期范德华能量略大于静电能

量,而拉伸后期静电能量明显大于范德华能量。这表明拉伸前期范德华相互作用对Ydj1p二聚体的稳定贡献较大,而在拉伸后期静电作用力更加处于主导地位。

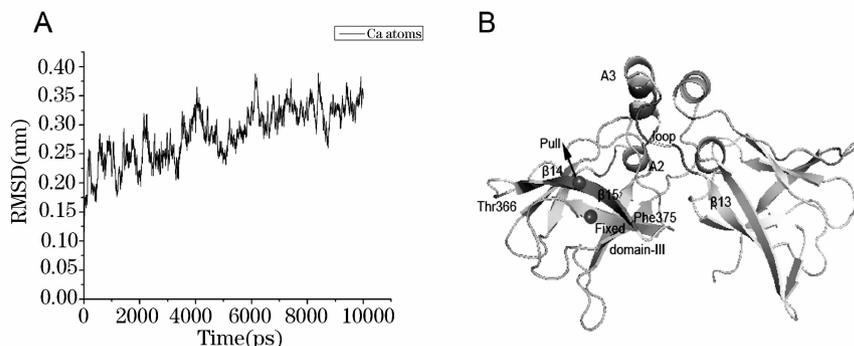


图1 (A) RMSD 值随时间的变化 (B)  $\beta$  折叠与 domain-III 区域的拉伸模型图

Fig. 1 (A) The RMSD as a function of simulation time (B)  $\beta$ -folding and stretching area Model diagram

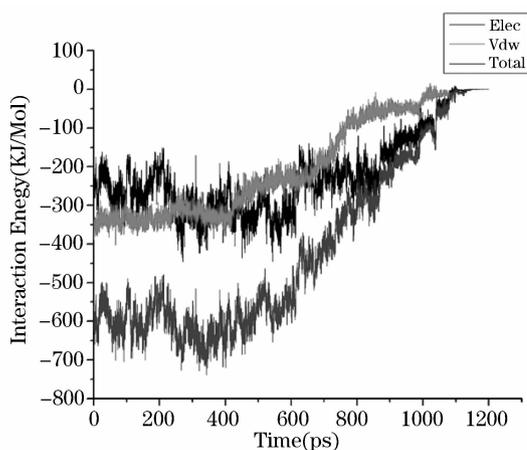


图2  $\beta$  折叠与 domain-III 解离过程中能量随时间的变化

Fig. 2 Time dependence of the interaction energy between the  $\beta$ -folding and domain-III regions during the SMD simulation

### 2.3 $\beta 14 \sim \beta 15$ 与 domain-III 分离过程中重要残基的能量分析

拉伸模拟过程中,能量最低点(346ps)相对应的是相互作用力最强的点,在此刻,区域中分子间相对较强的作用力均会存在。因此,我们分析了该时刻下存在相互作用力的所有氨基酸的静电能量及范德华能量。氨基酸的静电能量变化如图3A所示,在拉伸过程中残基 Thr366 和 Asp368 的静电能量曲线出现了明显的波谷,而 Cys370、Val371、Leu372、Ala373 和 Asp374 的静电能量曲线则无明显波谷,始终趋于低能量状态。氨基酸的范德华能量如图3B所示,残基 Cys370、Leu372 和 Phe375 的范德华能量变化明显,其中残基 Leu372 的变化最为明显的。以上结果表明  $\beta 14 \sim \beta 15$  内的残基 Thr366 和 Asp368 主要通

过与 domain-III 形成较强的静电作用力来维持二聚体的稳定性;而残基 Cys370、Leu372 和 Phe375 主要通过 domain-III 形成的疏水作用力来稳定 Ydj1p 二聚体结构,其中残基 Leu372 的疏水作用与晶体结构的研究结果一致<sup>[8]</sup>。

### 2.4 $\beta 14 \sim \beta 15$ 与 domain-III 分离过程中氢键与盐桥的分析

氢键和盐桥作为主要的静电作用力,对于维持蛋白结构的稳定性起着重要的作用,因此我们对上文中提到的静电能量显著的残基(Thr366 和 Asp368)进行了深入的分析。图4A所示为解离过程中,残基 Thr366、Asp368 与 domain-III 之间形成的氢键及其存活时间。由此可以发现氢键 T366(N)-D291(OD2)、T366(HG1)-D291(OD2)、T366(O)-W292(N)、D368(N)-W292(O)和 D368(O)-K294(N)在解离过程中的存活时间较长(>50%)。该结果表明残基 Thr366、Asp368 与 domain-III 之间形成的这5个氢键对于维持  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 间的稳定性起了重要的作用。另外,盐桥分析发现,Asp368 除了形成氢键外还与 Lys314 形成了一个稳定的盐桥(图4B)。在  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 分离过程中,残基 Asp368 与 Lys314 之间形成的盐桥在 0ps-950ps 内距离始终保持在 0.4nm 以内,这表明该盐桥也是维持 Ydj1p 二聚体稳定的一个重要因素。

### 2.5 $\beta 14 \sim \beta 15$ 与 domain-III 分离过程中疏水口袋的分析

疏水作用力对维持蛋白结构的稳定性也起着重要的作用,为了进一步探讨  $\beta$  折叠与 domain-III 之间

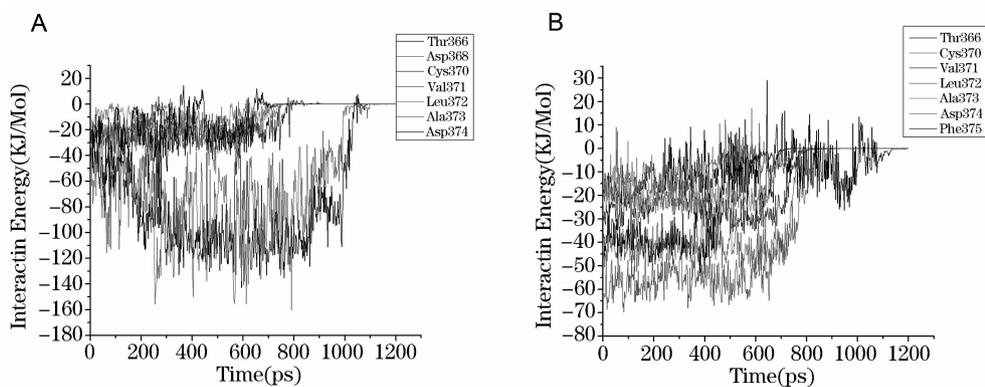


图 3 (A)解离过程中残基静电能量随时间的变化 (B)解离过程中残基范德华能量随时间的变化

Fig. 3 (A)Time dependence of electrostatic interaction energy for the related residues during the SMD simulation  
(B)Time dependence of VDW interaction energy for the related residues during the SMD simulation

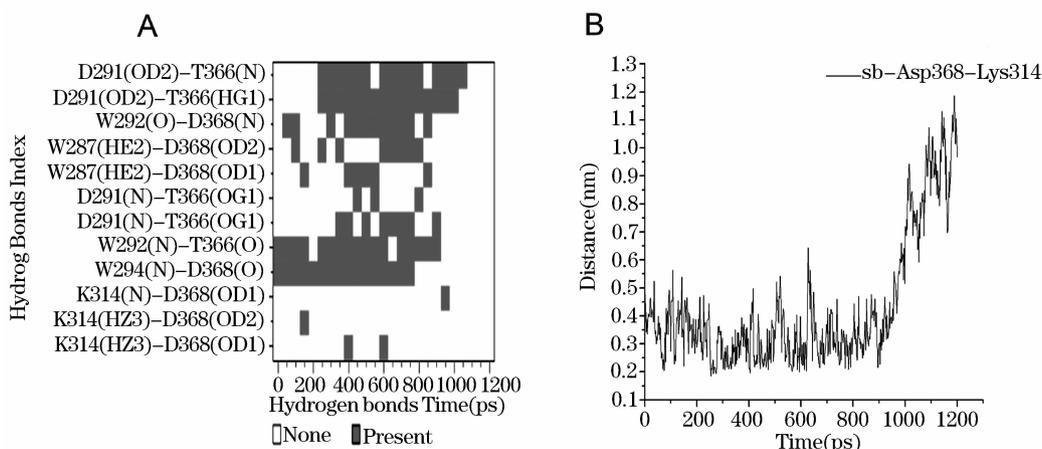


图 4 (A)解离过程中 366 位和 368 位残基的氢键存活时间 (B)解离过程中盐桥 Asp368 ~ Lys314 的距离随时间的变化

Fig. 4 (A) Hydrogen bond existence map of residues 366 and 368 during SMD simulation

(B)The salt bridge distance between Asp368 and Lys314 as a function of SMD simulation time

形成的疏水作用,我们对上文中提到的范德华能量变化显著的残基 Cys370、Leu372 和 Phe375 进行深入分析。图 5A 为能量最低点时, Cys370、Leu372、Phe375 与 domain-III 之间形成的疏水相互作用。其中与 Cys370 存在疏水相互作用的残基有 Leu293、Val295、Glu312 和 Gly313,它们之间可以形成一个疏水口袋;与 Leu372 存在相互作用的残基有 Ile297、Val310、Cys309 和 Phe331,它们之间也可以形成一个疏水口袋;与 Phe375 存在疏水相互作用的有 Val310 和 Ile328(见图 5B)。从这些残基范德华能量的平均值来看, domain-III 内的残基 Leu293、Val295、Lys309、Val310 和 Glu312 是与  $\beta 14 \sim \beta 15$  存在疏水相互作用的主要残基,它们对维持 Ydj1p 二聚体的稳定性起到重要作用。

### 3 结论

研究表明, Ydj1p 二聚体中  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 分离的初始阶段范德华作用首先占主导

地位,随着静电作用的不断加强,到后期阶段静电作用显得更为重要。鉴于二聚体的分离是其形成的逆过程,这个结果暗示着在 Ydj1p 二聚体的形成过程中,这两种相互作用可能呈现与分离过程相反的贡献。由此推测,在 Ydj1p 二聚体的形成过程中,单体间紧密的联系主要是通过  $\beta 14 \sim \beta 15$  内的残基 Thr366、Asp368、Cys370、Leu372、Phe375 与 domain-III 内的残基 Asp291、Trp292、Leu293、Lys294、Val295、Arg308、Lys309、Val310 和 Glu312 之间形成的相互作用来实现的:其中残基 Thr366 和 Asp368 分别通过与残基 Asp291、Trp292 和 Trp292、Lys294 之间形成的氢键促使  $\beta$  折叠与 domain-III 的紧密联系;而 Cys370 和 Leu372 则是分别通过与残基 Leu293、Val295、Glu312、Gly313 和残基 Ile297、Val310、Cys309、Phe331 形成的两个疏水口袋来进一步加强  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 的结合;此外,残基 Asp368 与残基 Lys314 形成的盐桥及残基 Phe375 与残基 Val310 和 Ile328 形成的弱疏水相互作用也是增进  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 紧密联系的重要因素

之一。

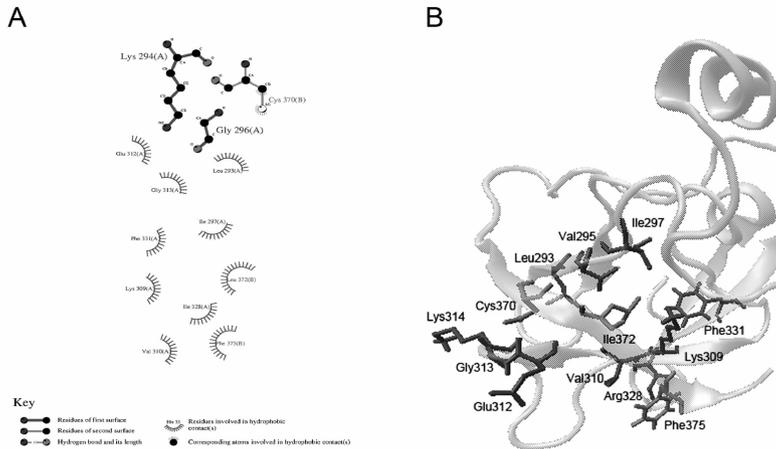


图5 (A) 残基 370、372 和 375 与 domain-III 之间的疏水相互作用 (B)  $\beta 14 \sim \beta 15$  与 domain-III 之间的疏水口袋

Fig. 5 (A) The hydrophobic interaction between residues 370, 372 and 375 and domain-III

(B) The hydrophobic pocket between  $\beta 14 \sim \beta 15$  and domain-III

本研究结果不仅有助于在理论上解释影响 Ydj1p 二聚体稳定性的因素,对于深入研究 Ydj1p 二聚体形成的分子机制也具有重要的促进意义,但是这些分子动力学模拟的结论还有待我们分子生物学和生物化学实验的证据支持。另外,研究者推测的 Ydj1p 二聚体形成的另外一种机制,即通过  $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  及  $\alpha 3$  前面的 loop 内的疏水性残基之间的疏水相互作用,也有待我们在本文基础上进一步利用拉伸分子动力学模拟和生物学实验的方法进行研究。此外,本研究结果对 Hsp40 家族的其他成员(如 Sis1p 等)二聚体形成的分子机制研究也具有参考价值。

#### 参考文献(References)

[1] Hartl, F. Ulrich. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. Nature, 1996, 381, 571-580.

[2] Bukau Bernd. & Horwich Arthur L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines [J]. Cell, 1998, 92, 351-366.

[3] Hartl, F. Ulrich. & Hayer-Hartl Manajit. Molecular chaperones in the cytosol: from nas cent chain to folded protein [J]. Science, 2002, 295, 1852-1858.

[4] Summers Daniel W, Douglas Peter M, Cyr Douglas M. Prion propagation by Hsp40 molecular chaperones [J]. Prion, 2009, 3: 59-64.

[5] Langer Thomas, Lu Chi, Echols Harrison, Flanagan Jhon. Hayer, Manajit K. & Hartl, F. Ulrich. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding [J]. Nature, 1992, 356, 683-689.

[6] Sha Bingdong, Lee Soojin. & Cyr Douglas M. The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1 [J]. Structure, 2000, 8, 799-807.

[7] Li Jingzhi, Qian, Xinguo. & Sha Bingdong. The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate [J]. Structure, 2003, 11, 1475-1483.

[8] Wu Yunkun, Li Jingzhi, Jin Zhongmin, Fu Zhengqing and Sha Bingdong. The Crystal Structure of the C-terminal Fragment of Yeast Hsp40 Ydj1 Reveals Novel Dimerization Motif for Hsp40 [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 346, 1005-1011.

[9] Zhang Ji-long, Zheng Qing-chuan. & Zhang Hong-xing. Unbinding of glucose from human pulmonary surfactant protein D studied by steered molecular dynamics simulations [J]. Chemical Physics Letters, 2010b, 484, 338-343.

[10] Shen Manli, Guan Jing, Xu Linan, Yu Yuan He Jianwei, Jones Gary W and Song Youtao. Steered molecular dynamics simulations on the binding of the appendant structure and helix-b2 in domain-swapped human cystatin C dimer [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2012, 30(6): 652-661.

[11] Hess, Berk., Kutzner, Carsten., & Lindahl, Erik. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation [J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2008, 4, 435-447.

[12] Heymann Berthold, Grubmuller Heymann. AN02/DNP-hapten unbinding forces studied by molecular dynamics atomic force microscopy simulations [J]. Chemical Physics Letters, 1999, 303(1-2): 1-9.