

doi: 10.3969/j.issn.1672-5565.2014.02.06

Hsc70-Auxilin 复合物的拉伸分子动力学模拟

周雷¹, 徐利楠², 周小红², 薛友林³, 李辉², 宋有涛^{1,2*}

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

摘要: Hsc70 与 auxilin 蛋白组成的系统是 Hsp70/Hsp40 分子伴侣系统家族的一员, 在热休克反应中发挥重要作用。本文为得出 auxilin 蛋白 J 结构域的关键氨基酸, 首先采用由二硫键交联的 Hsc70 R171C 与 auxilin D876C 的复合物结晶结构作为初始模型, 进行分子动力学模拟, 通过比较平衡后的结合部位发现, 将形成二硫键的氨基酸突变为原来的氨基酸结构在结合位点上与生化结果较为相近, 之后利用此结构通过拉伸动力学模拟分析了 auxilin 蛋白 J 结构域与 Hsc70 的 ATPase 功能域的解离过程, 并探讨了 Hsc70 与 auxilin 蛋白之间的相互作用力。结果表明位于 HPD loop 上的 His874, Asp876, Thr879, 螺旋 III 上的 Glu884, Asn895, Asp896, Ser899, Glu902, Asn903 为关键氨基酸, 这些数据符合之前核磁共振实验验证的 T 抗原 J 结构域的 HPD 基序和螺旋 III 与 Hsc70 的 ATPase 功能域之间的相互作用。

关键词: Auxilin; J-domain; Hsc70; 蛋白相互作用; 拉伸分子动力学

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2014)-02-110-07

Steered molecular dynamics simulations of Hsc70-Auxilin interactions

ZHOU Lei¹, XU Linan², ZHOU Xiaohong², XUE Youlin³, LI Hui², SONG Youtao^{1,2*}

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

Abstract: The Hsc70 and auxilin complex belongs to the Hsp70 and Hsp40 family, a chaperone system best known for its role in the heat shock response. The model of the Hsc70/auxilin complex molecule used in our study had the crystal structure of disulfide-bond-crosslinked complex of bovine Hsc70 R171C and bovine auxilin D876C. In order to confirm the important residues, we first analyzed the stable model after the molecular dynamics simulation (MD). The binding site of the mutated (original) model was more aligned with previous biochemical results. After that, steered molecular dynamics simulations (SMD) were applied to this stable model to investigate the dissociation of the bovine auxilin J-domain and the Hsc70 ATPase domain, and the Hsc70-auxilin interactions were also investigated. Our data indicated that His874, Asp876, and Thr879 from the HPD loop, Glu884, Asn895, Asp896, Ser899, Glu902 and Asn903 from helix III are important residues. These data agreed with a previous NMR evidence that helix III and HPD motif of large T antigen J-domain interacted with Hsc70 ATPase domain.

Keywords: Auxilin; J-domain; Hsc70; Protein-protein interactions; Steered molecular dynamics

Hsc70 与 auxilin 蛋白组成的系统是 Hsp70/Hsp40 分子伴侣系统家族的一员。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

收稿日期: 2014-01-02; 修回日期: 2014-02-21.

资助项目: 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: 周雷, 男, 在读研究生。研究方向: 环境生物技术、生物信息学; E-mail: 1032854191@qq.com.

* 通信作者: 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.

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^[1-2]。许多疾病尤其是神经系统变性疾病,包括阿尔茨海默氏症、帕金森、亨廷顿病,都是因蛋白错误折叠而积累,形成不同的淀粉样聚集体从而引起组织病变^[3]。

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。J结构域被认为是Hsp40与同伴蛋白Hsp70相互作用所需要的主要位点和最小区域^[4-5]。之前已经通过多种方式研究J结构域与ATPase功能域间的相互作用,如通过突变体实验发现DanJ的J结构域螺旋II上的正电表面与DanK的ATPase功能域上的负电表面发生识别作用^[6-8]。在牛的auxilin蛋白J结构域中,位于HPD loop附近的Arg867, Lys868, Lys877的侧链组成一个相似的正电荷表面, Extra loop(auxilin J结构域特有)上的Lys847在与Hsc70相互作用时也发挥重要作用^[9]。用核磁共振(NMR)方法发现在ADP状态下, DanJ螺旋II上的保守残基与DanK环(Glu206至Thr221)之间存在重要的静电相互作用,并形成一个动态的相互连接界面^[10]。运用分子对接的方式,得到了Hsc70/auxilin结合物的理论模型并发现结构域间的静电相互作用对刺激ATPase功能域活性有着重要作用^[11]。此外通过结晶的方法分析,得出当核苷酸和J蛋白(J-domain protein)都调节Hsp70与linker、ATPase功能域与底物结合域的相互作用时,这些相互作用在不同Hsp70里有着不同的内在作用时间,这可以优化他们在不同的细胞作用下的活动^[12],但是更为具体的分子内相互作用及其动力学过程并没有被阐述清楚。

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,与常规分子动力学相比,拉伸分子动力学的优点在于把原来无法模拟的生物化学进程在纳秒时间尺度进行了模拟,不但大大减少了计算时间,而且可以动态研究两个生物分子之间相互作用以及蛋白质的力学性质^[13]。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用来研究蛋白与蛋白的分离过程,对该过程中能量、氢键、疏水、盐桥等的分析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与蛋白的结合过程提供理论依据。因此,本文采用拉伸分子动力学模拟的方法详细探讨auxilin蛋白与Hsc70结合物的解离过程。

1 计算方法与条件

1.1 分子动力学模拟

本研究在Gromacs 4.5.5^[14]软件中完成,所用模型为牛的auxilin蛋白与Hsc70由二硫键交联的复合物晶体结构(PDB编号2QWN)^[12],使用SwissPDB Viewer对形成二硫键的氨基酸分别突变成原来的氨基酸。所有模拟在GROMOS96 43a1力场中完成,由于 PO_4^{3-} 离子和ADP的拓扑结构没有包含在GROMOS 43a1的力场中,使用PRODRG服务器基于相似的力场产生一组键和键角的参数。蛋白任一原子距盒子边缘的距离大于10 Å。蛋白溶于约含48 750个SPC水分子的溶液中,溶液体系加2个 Cl^- 离子使电荷达到平衡。整个体系在水溶液中进行2 000步的能量最小化和80 ps的位置限制性模拟。然后整个体系在300 K、pH7的条件下进行了10 ns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auxilin蛋白的J结构域(残基812-905)及参照组Hsc70的ATPase功能域(残基3-385)的选取以晶体结构中相互作用的区域为基础,J结构域的质心被施加速度恒定的拉力使其沿着远离ATPase功能域的方向解离。轨迹坐标每0.2 ps收集一次,模拟时间为2 ns。

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^[13]。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,且速度选择得越小,得到的结果越接近真实情况。因此进行了10组不同速度下的拉伸实验(0.001~0.03 nm/ps),最终选取0.001 nm/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,因此进行了6个不同弹簧系数的测定(50~2 000 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}/\text{nm}^2$),最终选取300 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}/\text{nm}^2$ 为最适弹簧系数。

2 结果与讨论

2.1 拉伸模拟初始模型的确定

为了得到合理的拉伸初始结构,首先对Hsc70与auxilin蛋白复合物存在二硫键结构及将形成二硫键的氨基酸突变为原本氨基酸的结构分别进行了10 ns的分子动力学模拟。由RMSD(见图1)可以看出,由二硫键交联形成的复合物结构在3 ns就达

到了平衡,突变为原本氨基酸的结构蛋白质的结构在约 6 ns 达到平衡,说明二硫键有稳定其复合物的作用。之前其他 NMR 实验已经发现 T 抗原的 J 结构域上 HPD 基序和螺旋 III 与 Hsc70 相互作用^[15],从 10 ns 后的平衡结构来看(见图 2),初始含有二硫键的结构主要通过螺旋 0 及 HPD loop 附近的氨基酸与 ATPase 功能域发生相互作用,这与生化结果差别较大,而突变为原本氨基酸的结构在结合位点上与此生化实验结果较为相符,所以采用突变为原本氨基酸的平衡结构作为拉伸动力学模拟的初始模型。

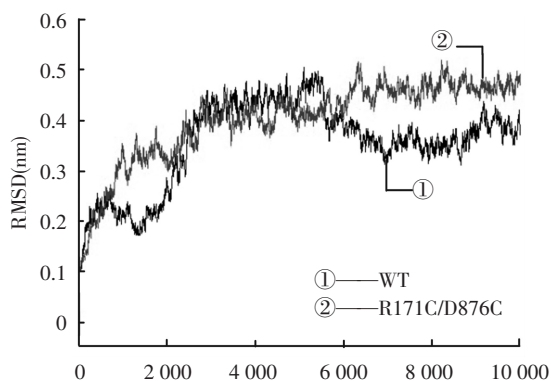


图 1 RMSD 值随时间的变化

Fig.1 The RMSD values as a function of simulation time



图 2 含有二硫键及突变为原始氨基酸的平衡结构模型对比

Fig.2 Superimposition of disulfide-bond-crosslinked model and the mutated model at the end of the MD simulation

注:图中浅色为含二硫键的结构模型,深色为突变成原始氨基酸的结构模型。

Notes: The disulfide-bond-crosslinked model is shown in light and the mutated model is shown in dark.

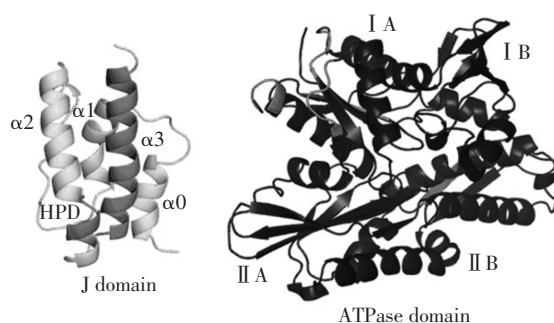


图 3 Auxilin 和 Hsc70 的模型图

Fig.3 Ribbon models of auxilin and Hsc70

2.2 分离过程中能量分析与结构改变

拉伸动力学中 auxilin 蛋白与 Hsc70 结合物的分离过程实质上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所消耗的能量来体现,因此,体系的能量分析将直接反映非平衡运动过程中相互作用力的变化。如图 4 所示,开始阶段是稳定的有着很低的自由能,在拐点以后由于力的作用系统进入不平衡状态,相互作用减少,说明 J 结构域与 ATPase 功能域之间有很强的相互作用。总能量在 266 ps 时最低,暗示着这时两个结构域的相互作用最大。明显看出,静电相互作用在模拟初期占据优势,然而到后期阶段,范德华(VDW)相互作用和静电相互作用大体一致。在最后阶段,能量曲线快速到零,暗示着 J 结构域已经从 ATPase 功能域上完全分离。同时由拉伸后的结构可以看出经过 2 ns 的拉伸(见图 5)这两个结构域的质心距离从 3.49 nm 变化到 5.30 nm,表明 J 结构域已经完全从 ATPase 功能域上拉开,两个结构域的相互作用在这个过程中也明显的被破坏。

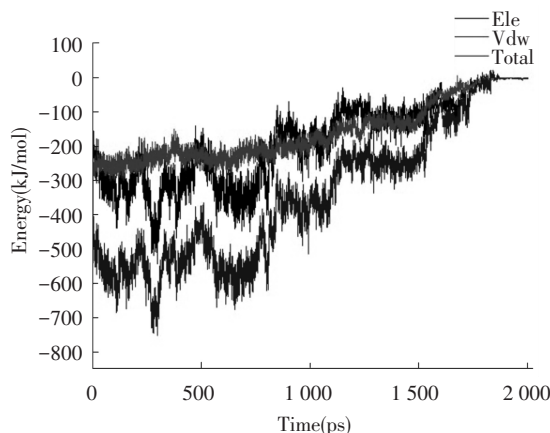


图 4 Auxilin 蛋白与 Hsc70 解离过程中能量随时间的变化
Fig.4 Time dependence of the interaction energy between the auxilin J-domain and ATPase domain of Hsc70 during the SMD simulation

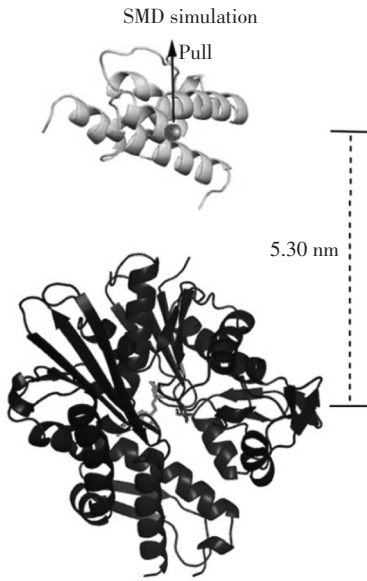


图 5 Hsc70/auxilin 系统拉伸后的结构模型

Fig.5 The model structure of Hsc70/auxilin system after the SMD simulation

注:PO₄³⁻和 ADP 以棍棒模型表示。

Notes:The PO₄³⁻ ions and ADP are shown in stick representation.

2.3 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(266 ps)相对应的是相互作用力最强的点,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 6 所示,在拉伸过程中位于 HPD loop 上的残基 His874, Asp876, Thr879,螺旋 III 上的残基 Glu884, Asn895, Asp896, Ser899, Glu902, Asn903 的静电能量曲线出现了明显的波谷,而 HPD loop 上的残基 Lys877, Gln881,螺旋 III 上的残基 Phe891, Met892 的静电能量曲线则无明显波谷,始终趋于低能量状态,其中残基 Asp876, Glu902 的变化最为明显。氨基酸的范德华能量如图 7 所示,HPD loop 上的残基 His874, Asp876,螺旋 III 上的残基 Phe891, Met892, Asn895, Asp896, Glu902, Asn903 的范德华能量变化明显,其中残基 Asp876, Met892 的变化最为明显。Extra loop 以及 Helix II 上的氨基酸与 ATPase 功能域不存在相互作用力。

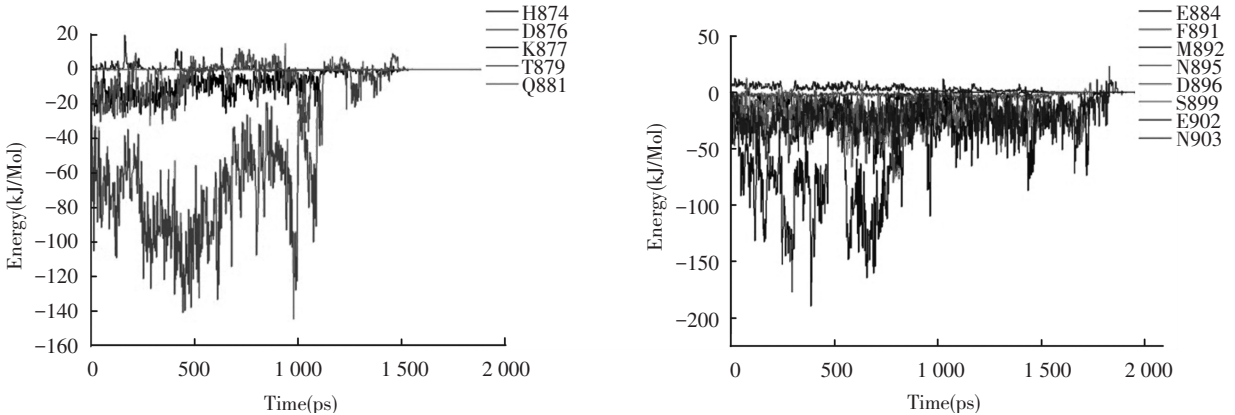


图 6 解离过程中 J 结构域残基静电能量随时间的变化

Fig.6 Time dependence of electrostatic interaction energy for the related residues of J-domain during the SMD simulation

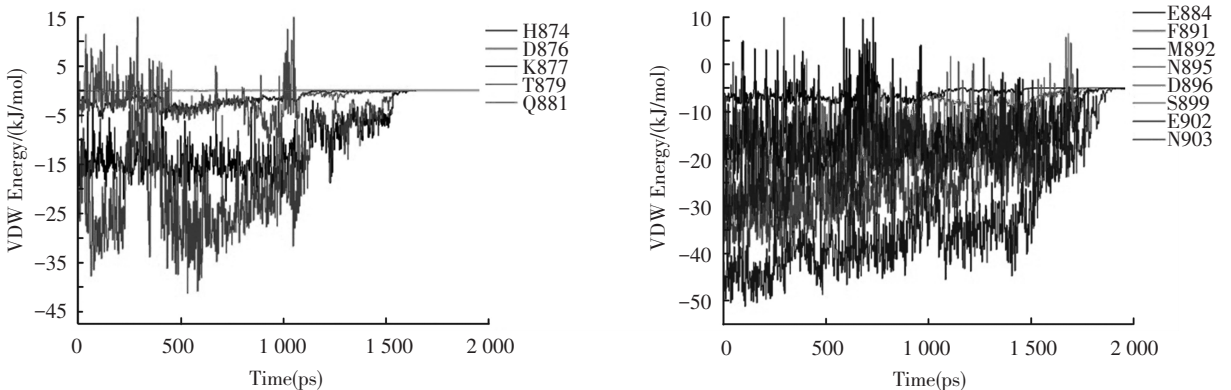


图 7 解离过程中 J 结构域残基范德华能量随时间的变化

Fig.7 Time dependence of VDW interaction energy for the related residues of J-domain during the SMD simulation

2.4 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,并且之前的实验发现大多数的 Hsp70 与 Hsp40 之间通过静电相互作用识别^[7,11]。因此,我们对 J 结构域与 ATPase 功能域作用时所形成的的氢键和盐桥进行了深入分析。表 1 所示的解离过程中,J 结构域与 ATPase 功能域之间形成的氢键。由此可以发现:Extra loop 以及 Helix II 与 ATP 结构域不存在氢键相互作用,HPD loop 上的 His874, Asp876, Thr879, Helix III 上的 Glu884, Asn895, Asp896, Ser899, Glu902, Asn903 与 ATPase 功能域存在重要的氢键相互作用。另外,通

过盐桥分析发现, Asp876, Glu884, 除了形成氢键外,在分离过程中还形成了稳定的盐桥,(见图 8A) 残基 Asp876 与 Lys159 之间的盐桥,(见图 8B) 残基 Asp876 与 Arg171 之间的盐桥,(见图 8C) 残基 Glu884 与 Arg171 之间的盐桥,其中 Asp876, Glu884 来自 J 结构域, Lys159, Arg171 来自 ATPase 功能域。基于先前实验的数据,如果两个带相反电荷的残基距离在 0.4 nm 被定义为一个较强的盐桥,如果距离在 0.6 nm 以内被认为是一种较弱盐桥^[16],由此可以看出这 3 个盐桥在 J 结构域与 ATPase 功能域发生相互作用时起着重要的作用。

表 1 由拉伸模拟确定的残基间氢键相互作用

Table 1 Residue pairs involved in hydrogen bonding identified in SMD simulations

J-domain		氢键相互作用
Extra loop	-	-
Helix II	-	-
	His874 (H33Q) ^[17] *	His874(N); Val169(O)
HPD loop	Asp876 (D35N) ^[17] *	Asp876(N); Leu170(O) Asp876(O); Arg171(N) Asp876(O); Ile172(N)
	Thr879	Thr879(O); Arg171(N)
	Glu884	Glu884(O); Arg171(N)
Helix III	Asn895 (N56T) ^[18] *	Asn895(O); Asn168(N) Asn895(O); Asn141(N) Asn895(N); Leu380(O) Asn895(N); Ser381(O)
	Asp896	Asp896(O); Asp383(N) Asp896(O); His23(N) Asp896(N); Ser381(O)
	Ser899	Ser899(O); Gly4(N)
	Glu902 (K63A) ^[15] *	Glu902(O); Lys3(N) Glu902(O); Thr138(N) Glu902(O); Thr141(N)
	Asn903 (T64A) ^[15] *	Asn903(O); Gly4(N) Asn903(O); Gly137(N)

注: * 在其他 J 蛋白的 J 结构域上已证实的关键氨基酸 (H33Q, D35N 为 DanJ J 结构域的突变体, N56T, K63A, T64A 为 T 抗原 J 结构域的突变体), 表中除所列的来自 J 结构域的氨基酸, 其余氨基酸均来自 ATPase 功能域。

Notes: * The important residues which have been confirmed in other J-domain proteins (H33Q and D35N are the mutations of DanJ J-domain, N56T, K63A and T64A are the mutations of T antigen J-domain). All residues except J-domain residues are from the ATPase domain.

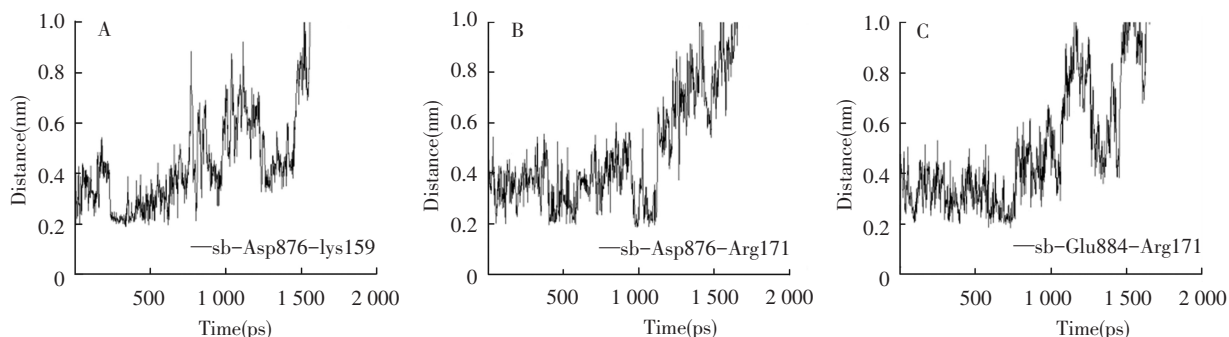


图 8 解离过程中盐桥的距离随时间的变化

Fig.8 The distance of salt-bridge as a function of SMD simulation time

注: (A) Asp876-Lys159 (B) Asp876-Arg171 (C) Glu884-Arg171, 其中 Asp876, Glu884 来自 J 结构域, Lys159, Arg171 来自 ATPase 功能域。

Notes: (A) Asp876-Lys159 (B) Asp876-Arg171 (C) Glu884-Arg171, as a function of SMD simulation time. Asp876 and Glu884 are from the J-domain, Lys 159 and Arg171 are from the ATPase domain.

以上研究结果表明,静电相互作用在模拟的初期占据优势,然而到后期阶段,范德华(VDW)相互作用和静电相互作用大体一致。鉴于 Hsc70-auxilin 的分离是其形成的逆过程,这个结果暗示着在 Hsc70-auxilin 复合的过程中,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,auxilin 蛋白 J 结构域上的残基 His874, Asp876, Thr879, Glu884, Asn895, Asp896, Ser899, Glu902, Asn903 为关键氨基酸(见图 9):其中 HPD loop 上的 His874, Asp876, Thr879, Helix III 上的 Glu884, Asn895, Asp896, Ser899, Glu902, Asn903 与 ATPase 功能域存在重要的氢键相互作用。Asp876, Glu884 除了形成氢键外,还分别与残基 Lys159、Arg171 形成了稳定的盐桥。所以 auxilin 蛋白的 J 结构域上 HPD 基序和螺旋 III 与 Hsc70 的 ATPase 功能域相互作用时发挥重要作用,这与关于 T 抗原 J 结构域与 Hsc70 复合物的 NMR 实验所得的理论相符合^[15]。另外,相关生化试验证实 J 结构域 Extra loop 上的 Lys847 在与 Hsc70 相互作用时也发挥重要作用^[9],然而本实验并未发现 Extra loop 与 Hsc70 的相互作用,暗示着 J 结构域与 ATPase 功能域的相互作用有着复杂的作用机制或者结晶时人为二硫键的加入干扰了结合位点,还需要大量的分子生物学和生物化学实验进行验证,从而解释其中所存在的争议^[19-20]。

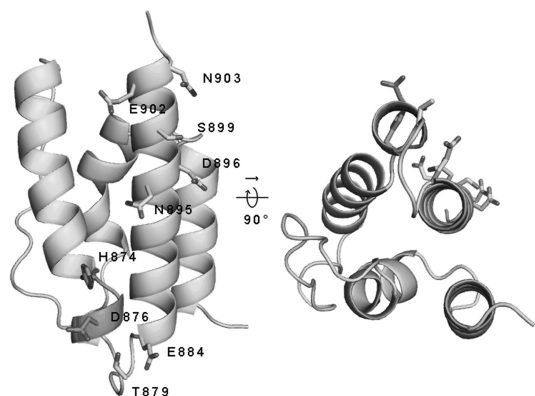


图 9 Auxilin 蛋白 J 结构域上的关键氨基酸模型图

Fig.9 Ribbon projection of auxilin J-domain important residues

3 结 论

本研究结果不仅有助于在理论上解释影响 Hsc70 与 auxilin 蛋白复合物稳定性的因素,对于深入研究 auxilin 蛋白与 Hsc70 结合过程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分子生物学和生物化学实验的证据支持。

参考文献(References)

- [1] VJESTICA A, ZHANG D, LIU J, et al. Hsp70-Hsp40 chaperone complex functions in controlling polarized growth by repressing Hsf1-Driven heat stress-associated transcription [J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9 (10): e1003886.
- [2] HARTL F U, HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. *Science*, 2002, 295(5561): 1852-1858.
- [3] CHAARI A, HOARAU-VÉCHOT J, LADJIMI M. Applying chaperones to protein-misfolding disorders: Molecular chaperones against α -synuclein in Parkinson's disease [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 60:196-205.
- [4] HORNE B E, LI T, GENEVAUX P, et al. The Hsp40 J-domain stimulates Hsp70 when tethered by the client to the ATPase domain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(28): 21679-21688.
- [5] WITTUNG-STAFSHED P, GUIDRY J, HORNE B E, et al. The J-domain of Hsp40 couples ATP hydrolysis to substrate capture in Hsp70[J]. *Biochemistry*, 2003, 42 (17): 4937-4944.
- [6] PELLECCIA M, SZYPERSKI T, WALL D, et al. NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the escherichia coli DnaJ chaperone [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 260(2): 236-250.
- [7] GREENE M K, MASKOS K, LANDRY S J. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(11): 6108-6113.
- [8] GENEVAUX P, SCHWAGER F, GEORGOPOULOS C, et al. Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the Escherichia coli DnaJ (Hsp40) J-domain[J]. *Genetics*, 2002, 162(3): 1045-1053.
- [9] JIANG J, TAYLOR A B, PRASAD K, et al. Structure-function analysis of the auxilin J-domain reveals an extended Hsc70 interaction interface [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(19): 5748-5753.
- [10] AHMAD A, BHATTACHARYA A, MCDONALD R A, et al. Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(47): 18966-18971.
- [11] GRUSCHUS J M, GREENE L E, EISENBERG E, et al. Experimentally biased model structure of the Hsc70/auxilin complex: Substrate transfer and interdomain structural change [J]. *Protein Science*, 2004, 13 (8): 2029-2044.

- [12] JIANG J, MAES E G, TAYLOR A B, et al. Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70 [J]. *Molecular Cell*, 2007, 28(3): 422–433.
- [13] XU L, HASIN N, SHEN M, et al. Using steered molecular dynamics to predict and assess Hsp70 substrate-binding domain mutants that alter prion propagation[J]. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(1): e1002896.
- [14] PRONK S, PÁLI S, SCHULZ R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(7): 845–854.
- [15] GARIMELLA R, LIU X, QIAO W, et al. Hsc70 contacts helix III of the J-domain from polyomavirus T antigens: addressing a dilemma in the chaperone hypothesis of how they release E2F from pRb[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(22): 6917–6929.
- [16] TIBERTI M, PAPALEO E. Dynamic properties of extremophilic subtilisin-like serine-proteases[J]. *Journal of Structural Biology*, 2011, 174(1): 69–83.
- [17] SUH W C, BURKHOLDER W F, LU C Z, et al. Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ [J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 1998, 95(26): 15223–15228.
- [18] WHALEN K A, DEJESUS R, KEAN J A, et al. Genetic analysis of the polyomavirus DnaJ-domain[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(15): 9982–9990.
- [19] SOUSA R, JIANG J, LAFER E M, et al. Evaluation of competing J-domain: Hsp70 complex models in light of existing mutational and NMR data[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(13): E734–E734.
- [20] ZUIDERWEG E R P, AHMAD A. Reply to sousa et al. Evaluation of competing J-domain: Hsp70 complex models in light of methods used[J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2012, 109(13): E735.