

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2013.04.02

Hsp70 核苷酸结合域突变体 影响酶活的分子动力学模拟研究

周小红¹, 徐利楠¹, 薛友林³, 宋有涛^{1,2*}
(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:分子伴侣蛋白 Hsp70 氮端核苷酸结合域(NBD, nucleotide-binding domain)的 ATP 酶活性变化对其行使分子伴侣功能具有重要作用。本文采用分子动力学模拟方法研究酵母分子伴侣 Hsp70 氮端 NBD 内残基 A17, R23, G32 和 R167 点突变对其 ATP 酶活性区域构象影响及功能关系。结果表明,突变体 A17V, T23H, G32S 的 ATP 结合口袋袋口的 loop1(第一个转角,连接 $\beta 1$ 与 $\beta 2$)结构柔性增强,活性残基 T11 侧链明显向内移动,从而更加接近 ATP 的 γ -磷酸基团,更容易使 ATP 水解。这可能最终导致 ATP 酶活性增强,从而引起分子伴侣功能的变化。
关键词:Hsp70; 分子动力学模拟; 突变体; ATP 酶活
中图分类号:R978.1+6 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-5565(2013)-04-250-05

**Molecular dynamics simulation for the effect of
ATP enzyme activity of Hsp70 NBD mutations**
ZHOU Xiao-hong¹, XU Li-nan¹, XUE You-lin³, SONG You-tao^{1,2*}
(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 Hsp70 N-terminal NBD (nucleotide-binding domain) ATP enzyme activity plays a significant role in its molecular chaperone function. In this study, we performed molecular dynamics (MD) simulation to investigate the connection of molecular chaperone function and conformation change in Hsp70 N-terminal NBD ATP enzyme activity domain after point mutation in A17, R23, G32 and R167. Our data indicates that the point mutations, A17V, R23H and G32S enhanced the flexibility of loop1. loop1 (at the first corner of NBD structure, combine $\beta 1$ with $\beta 2$), which is located at the arch structure in ATP binding pocket. The side chain of T11 moved closer to the ATP γ -Pi, which is easy to hydrolyse ATP. These structural alterations might enhance the ATP enzyme activity and change the molecular chaperone function.
Keywords:Hsp70; Molecular Dynamics Simulation; Mutants; ATP Enzyme Activity

Hsp70 家族是细胞内一类高度保守的分子伴侣蛋白,可以与其它分子伴侣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^[1]。所有的 Hsp70 家族都由一个氮端 44 kDa 的核苷酸结合域(NBD,包括 NBD-I, NBD-II)和一个碳端 25 kDa 的底物结合域(SBD, Substrate-binding domain,包括 SBD- α , SBD- β)组成^[2]。

此前, McKay 等人的研究发现牛 Hsc70 (Heat shock cognate 70 protein) 的 ATP 酶活性与金属离子及活性位点 T13、T204 的自身磷酸化有重要关系^[3],其中,T13 侧链的羟基对 ATP 酶活性具有重

收稿日期:2013-06-03;修回日期:2013-07-19。
基金项目:国家自然科学基金(30970152)和辽宁省教育厅优秀人才项目(2009R26)资助。
作者简介:周小红,男,在读研究生。研究方向:生物信息学;E-mail:382209530@qq.com。
* 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。

要作用^[4]。此外,Chiappori 等人研究指出,loop1 的柔性对 ATP 酶活性具有重要作用,柔性越强 ATP 酶活性越高^[5]。这些结果暗示着 loop1 的构象改变可能引起 Hsp70 氮端 ATP 酶活的变化。随后,Jones 等人的研究指出酵母 Hsp70 氮端 NBD 存在大量影响 ATP 酶活性的位点^[6-7],Chang 等人在 DnaK(大肠杆菌 Hsp70)中得出相同结果^[8]。但是,Jones 和 Chang 等人没有从分子水平去探讨 loop1 的构象改变和 ATP 酶活的关系。

为了从分子水平上探讨 loop1 构象的改变与 ATP 酶活的关系,在已有研究表明同源的突变体功能相似的基础上^[9],我们选用同源性很高的 DnaK 进行动力学模拟(酵母 Hsp70 晶体结构未知),研究了点突变可能通过 loop1 的构象改变而引起 ATP 酶活变化——酵母 Hsp70 氮端 NBD 中 A17V(DnaK^{A17V})、R23H(DnaK^{T23H})、G32S(DnaK^{G32S})增强 ATP 酶活、R167H(DnaK^{R167H})对 ATP 酶活无影响^[6]。该研究不仅是对 Jones 等人生化试验数据的分子解释,而且对后续 Hsp70 氮端 NBD 的点突变研究具有重要的借鉴意义。

1 实验过程

1.1 蛋白质的来源及模型构建

酵母 Hsp70 氮端 NBD 初始三维结构模型来自同源蛋白 E.coli DnaK(RCSB 数据库,PDB 编号 1DKG:D)^[10]。将已知的野生型 DnaK NBD 晶体结构模型与对应的 17 位、23 位、32 位、167 位突变体一级序列提交至 Swiss Model 服务器上(<http://swissmodel.expasy.org>)^[11],根据同源建模算法得到所有突变型蛋白的三维结构,将该模型作为后续动力学模拟突变型 A17V、R23H、G32S、R167H NBD 的初始模型。

1.2 动力学模拟过程

本模拟利用由动力学模拟软件 Gromacs 4.5.5^[12]和三维结构分析软件 PyMOL 进行。各模型的模拟步骤及参数设定均相同。具体步骤及参数如下:

(1)力场选择:根据不同力场偏向于不同的结构状态模拟,该模拟各体系均采用 NPT 系综,计算力场选用 GROMOS96 43a1。

(2)溶解蛋白:将结构模型放进一个立方体的周期性边界盒子中并置于该盒子的中心,设定模型中任一原子距盒子边缘的距离大于 1.0 nm,以保证其不会和另一个盒子中的镜像相互作用。水溶液环境采用 SPC 模型水分子(约含 25 169 个水分子)。

(3)平衡电荷:正常的生理条件下,体系的 pH 值应接近中性,总电荷为 0。向各溶液体系中加入不同数量的 Na⁺或 Cl⁻,保持体系 pH = 7,总电荷为 0。

(4)能量最小化:为了消除可能的原子碰撞,根据蛋白质折叠的热力学,先将各模型在真空中以最陡下降法(steepest descent)优化 2 000 步的能量使其达到结构稳定状态。

(5)限制性模拟:根据固定主链,优化侧链的原则,为了使侧链找到一个较稳定的状态避免出现溶剂分子分布不均的问题,进行了 80 ps 的限制性模拟。

(6)最终的动力学模拟:达到上述平衡之后,各体系在恒定的温度和压力下进行 10 ns 的分子动力学模拟。分子的运动轨迹每 4 ps 收集一次,以便用于后续的数据分析。

此外,为了保持整个模拟过程中体系温度稳定在 300 K、压力稳定在 1.0×10^5 Pa,分别采用“V-rescale”和“Parrinello-Rahman”方法对体系温度和压力进行控制,耦合常数分别为 0.1 ps 和 0.5 ps。模拟的时间积分步长为 2 fs,整个体系使用周期性边界条件,采用 LINCS(linear constraint solver)算法对体系中所有键的键长进行约束,静电相互作用采用 PME(particle mesh Ewald)算法进行估算,截断半径为 1.0 nm。范德华力通过“cut-off”方法进行估算,截断半径为 1.0 nm。

2 结果与讨论

2.1 结构稳定性

RMSD(Root mean square deviation,均方根偏差)可用来测量进行比对的两个蛋白质相同位点的氨基酸残基碳原子之间的距离,是衡量模拟过程中蛋白质稳定程度的重要参数,间接反应蛋白质灵活性。通过比较整体 RMSD 曲线的变化趋势得出在 7 ns 时各模型均达到平衡状态(见图 1a),结构稳定。对 loop1 稳定性分析发现,各模型在 7 ns 时达到平衡(见图 1b),平均值分别为:WT(0.51 nm)、R167H(0.69 nm)、G32S(0.81 nm)、A17V(0.84 nm)、T23H(0.75 nm)。从这些数据可以明显看出突变模型 A17V、T23H、G32S 中 loop1 的 RMSD 平均值均比 WT、R167H 高。表明突变模型 A17V、T23H、G32S 的柔性比 WT、R167H 强,暗示 A17、T23、G32 三个位点可能通过 loop1 构象变化,引起酵母 Hsp70 氮端 NBD 的 ATP 酶活性变化。

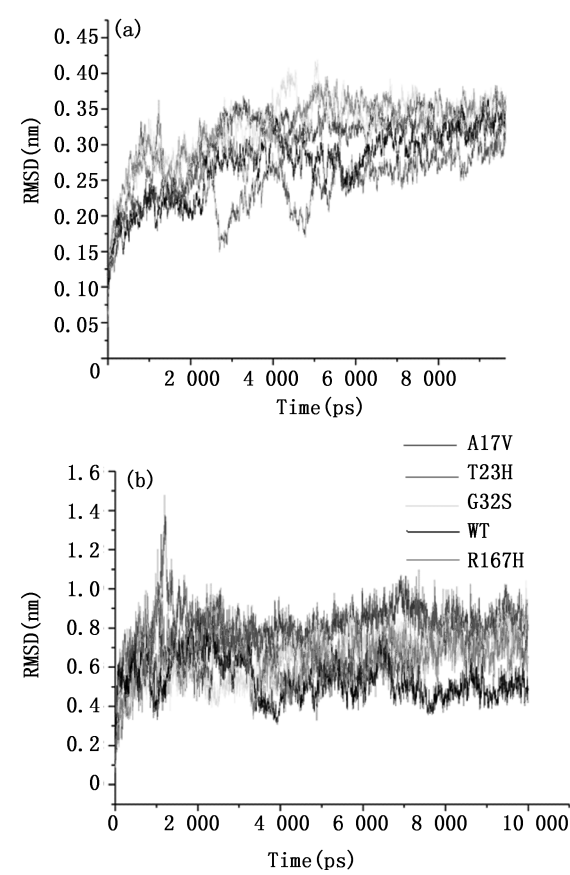


图 1 (a) 蛋白 RMSD 随时间变化 (b) loop1RMSD 随时间变化
Fig. 1 (a) The protein RMSD as a function of simulation time (b) The loop1 RMSD as a function of simulation time

2.2 Hsp70 氮端 ATP 酶活性区域结构对比

通过三维可视软件 PyMOL, 标示出 loop1 和重要残基 T11 在 E.coli DnaK 氮端 NBD 的位置 (见图 2)。

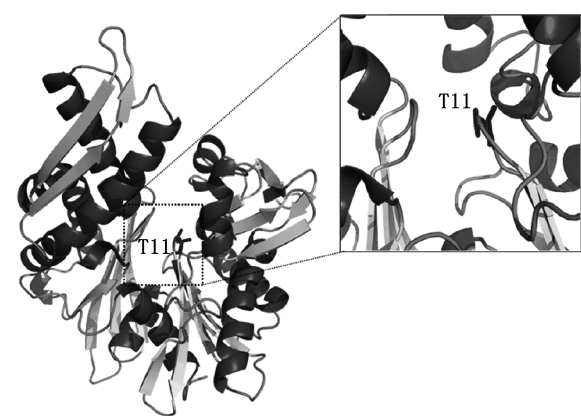


图 2 DnaK NBD 三维结构
Fig. 2 DnaK NBD three-dimensional structural

为进一步分析 loop1 怎样的构象改变而引起 Hsp70 氮端 NBD 的 ATP 酶活性变化, 我们对 A17V、T23H、G32S、R167H、WT 进行了 10 ns 时整体蛋白三维结构对比分析。结果显示, 突变模型

R167H 与 WT 在 loop1 处具有相似的构象, 重要残基 T11 侧链未向内发生移动 (见图 3a)。突变模型 A17V、T23H、G32S 与 WT 结构对比发现, T11 的侧链均向内发生不同程度移动 (见图 3b, 图 c, 图 d), 预示着在酵母 Hsp70 ATP 水解过程中, A17V、T23H、G32S 三个突变模型与 WT 和 R167H 相比能够更快速的通过 T11 侧链的羟基与 ATP 进行相互作用, 攻击 ATP γ -磷酸基团, 引起 ATP 快速水解, 从而增强 ATP 酶活性。

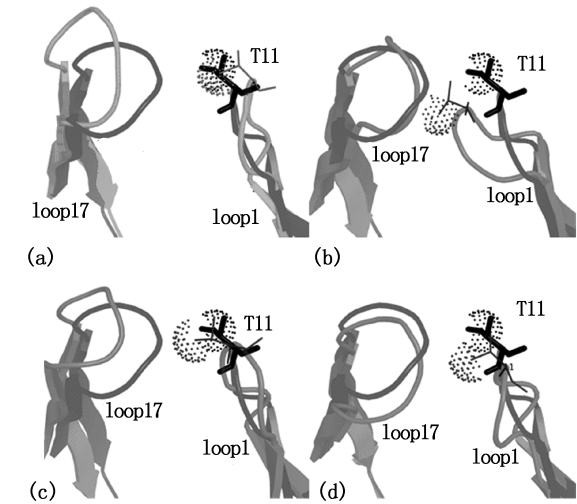


图 3 模拟后 loop1 结构对比: WT (T11; Sticks) (a) R167H (T11; lines) (b) A17V (T11; lines) (c) T23H (T11; lines) (d) G32S (T11; lines)
Fig.3 loop1 structural alignment after MD simulation: WT (T11; Sticks) (a) R167H (T11; lines) (b) A17V (T11; lines) (c) T23H (T11; lines) (d) G32S (T11; lines)

2.3 Hsp70 ATP 酶活性区域距离分析

为了深入探讨前面提到的构象改变与功能变化关系, 我们引入了一个 ATP 分子 (RCSB 数据库, PDB 编号: 3LDL) 进行距离分析。McKay 等人研究指出, Hsc70 T13 (DnaK^{T11}) 残基对 ATP 水解的重要作用, 是通过 T13 侧链的羟基对 ATP γ -磷酸基团作用, 引起 ATP 酶水解速率变化^[5]。数据显示, 10 ns 时 T11 侧链的羟基与 γ -磷酸基团距离 (见图 4a, b, c, d, e) WT (5.5 Å), R167H (6.0 Å) 均大于突变模型 A17V (1.3 Å)、T23H (4.9 Å) 和 G32S (4.6 Å)。数据表明, T11 侧链的羟基与 γ -磷酸基团距离变近, 其相互作用增强, 可能引起 ATP 酶活性增强, 与前面结论相一致。从分子水平初步解释了生化试验酵母 Hsp70 A17V, R23H, G32S 点突变增强 ATP 酶活结论。

2.4 loop1 氢键分析

为了探讨引起 loop1 发生向内移动的原因, 我们对 loop1 与周围氨基酸的氢键交互作用进行了分析, 通过计算得到各突变体模型 10ns 模拟过程中氢

键数量的平均值分别为:WT(1.2 个)、R167H(1.2 个)、A17V(2.6 个)、T23H(2.4 个)、G32S(0.4 个)。结果表明,A17V、T23H 突变体模型在 10ns 模拟过程中的氢键数量显著高于 WT、R167H,然而有趣的是 G32S 突变体模型在 10ns 模拟过程中的氢键数量低于 WT、R167H(见图 5a)。随后氢键存活时间分析发现(见图 5b),在 10ns 模拟过程中稳定氢键数量分别为 WT(1 个)、R167H(1 个)、A17V(3 个)、T23H(3 个)、G32S(1 个)。以上数据表明

A17V、T23H 点突变后,引起 loop1 中与 T12 相互作用的氢键数量显著增加,增强了 loop1 附近的氢键网络,从而间接调控 loop1 中 T11 侧链向内移动,引起 ATP 酶活性的增强;值得注意的是,G32S 点突变后尽管减少了 loop1 氢键数量,但是氢键存活时间表明,在没有与 T12 相互作用的氢键存在时,每隔一段时间会重复出现 T11-S38 氢键,有规律的影响 T11 残基的状态,可能直接引起 T11 侧链向内移动,从而增强 ATP 酶活性。

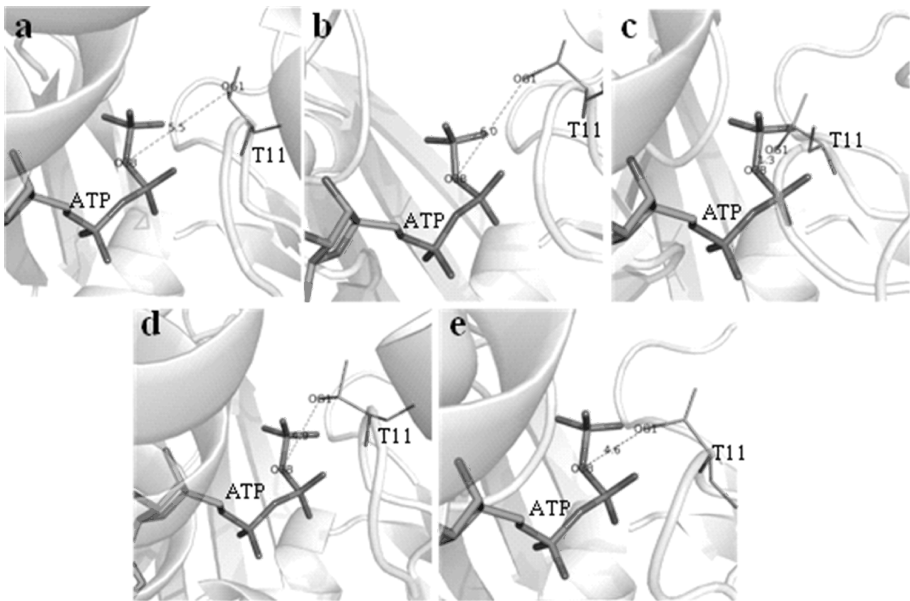


图 4 模拟后 T11 残基与 γ Pi 距离(单位:Å)
(a) WT(b) R167H(c) A17V (d) T23H (e) G32S
Fig.4 the distance of T11 and γ Pi after MD simulation(Å)
(a) WT(b) R167H(c) A17V (d) T23H (e) G32S

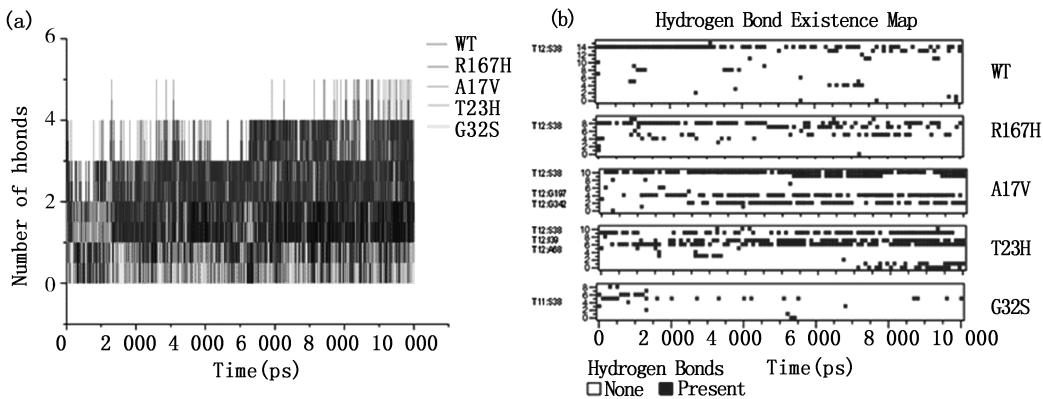


图 5 (a) 模拟过程中 loop1 氢键数量(b) 模拟过程中 loop1 氢键存活时间
Fig. 5 (a) the number of hydrogen bond during the MD simulation(b) Hydrogen bond existence map of loop1 during the MD simulation

3 结论

Hsp70 分子伴侣 SBD 和 NBD 的功能既相互联系又相互独立,分析其中一个结构域的构象功能变

化,能够间接反应出整个 Hsp70 分子伴侣的功能变化。在本研究中,A17V、T23H、G32S 点突变引起 Hsp70 氮端 NBD ATP 酶活性区域的 ATP 结合口袋袋口 Loop1 柔性增强,重要残基 T11 侧链向内移动,接近 ATP γ -磷酸基团,增强其与 ATP 的作用,提高

ATP 水解速率,从而增强 ATP 酶活性,引起 Hsp70 分子伴侣功能变化。

本研究为我们从分子水平上解释 Jones 等人的生化试验结果(A17V,R23H 和 G32S 点增强 ATP 酶活,R167H 与 WT 对 ATP 酶活没有影响^[6])提供了数据支持。同时也从分子水平对 Hsc70 T13 (DnaK^{T11})侧链的羟基对 ATP 酶具有重要作用^[4]进行了一定验证,对后续 Hsp70 氮端 NBD 的突变研究具有重要的借鉴意义。

参考文献(References)

[1] Sharma D, Masison DC. Hsp70 Structure, Function, Regulation and Influence on Yeast Prions[J].Protein Peptide Letters,2009, 16(6):571-581.

[2] Gołaś Ewa, Maisuradze Gia G, Senet Patrick, Ołdziej Stanisław, Czaplewski Cezary, Scheraga Harold A, Liwo Adam. Simulation of the opening and closing of Hsp70 chaperones by coarse-grained molecular dynamics [J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2012, 8(5): 1750-1764.

[3] Johnson ER, McKay DB. Mapping the role of active site residues for transducing an ATP-induced conformational change in the bovine 70-kDa heat shock cognate protein [J]. Biochemistry, 1999, 38(33): 10823-10830.

[4] Sousa MC, McKay DB. The hydroxyl of threonine 13 of the bovine 70-kDa heat shock cognate protein is essential for transducing the ATP-induced conformational change[J]. Biochemistry, 1998, 37(44): 15392-15399.

[5] Chiappori F, Merelli I, Colombo G, et al. Molecular Mechanism of

Allosteric Communication in Hsp70 Revealed by Molecular Dynamics Simulations [J]. PLoS computational biology, 2012, 8(12): e1002844.

[6] Jones GW, Masison DC. Saccharomyces cerevisiae Hsp70 Mutations Affect [PSI⁺] Prion Propagation and Cell Growth Differently and Implicate Hsp40 and Tetrapeptide Repeat Chaperones in Impairment of [PSI⁺] [J]. Genetics, 2003, 163(2): 495-506.

[7] Loovers HM, Guinan E, Jones GW. Importance of the Hsp70 ATPase Domain in Yeast Prion Propagation [J]. Genetics, 2007, 175(2): 621-630.

[8] Chang L, Thompson AD, Ung P, et al. Mutagenesis reveals the complex relationships between ATPase rate and the chaperone activities of Escherichia coli heat shock protein 70 (Hsp70/DnaK) [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(28): 21282-21291.

[9] 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.

[10] Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto M, et al. Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK [J]. Science, 1997, 276(5311): 431-435.

[11] Kiefer F, Arnold K, Künzli M, et al. The SWISS-MODEL Repository and associated resources [J]. Nucleic acids research, 2009, 37(suppl 1): D387-D392.

[12] Pronk S, Páll 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.