

УДК 577.322.5

Моделирование полноразмерной структуры шаперона Hsp70 человека и изучение его междоменных взаимодействий

К. А. Черноризов¹, В. К. Швядас^{1,2*}¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 73²Государственное учреждение Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 73

*E-mail: vyfas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 02.11.2010 г.

РЕФЕРАТ Hsp70 – белок из класса шаперонов, принимающий участие в сворачивании *de novo* синтезированных белковых молекул, в защите гидрофобных участков денатурировавшихся белков, а также в регуляции апоптоза, иммунного ответа и ряда других клеточных процессов. Несмотря на большое количество работ, посвященных функционированию и структуре Hsp70, достоверная полноразмерная структура этого белка неизвестна. На основании структуры отдельных доменов Hsp70 различных организмов и их элементов при помощи методов молекулярного моделирования сконструированы несколько возможных вариантов полноразмерного Hsp70 человека. Стабильность этих структур изучена с помощью метода молекулярной динамики. В результате проведенного анализа отобрана наиболее адекватная модель, построенная на основании элементов Hsp70 быка (*Bos taurus*) и нематоды (*Caenorhabditis elegans*). С помощью метода управляемой молекулярной динамики выявлены ключевые солевые мостики, связывающие домены друг с другом: Arg171 : Glu516 и Arg416 : Glu218. Предложена схема механизма, запускающего гидролиз АТФ и приводящего к расхождению АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов Hsp70.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА шаперон, Hsp70, модель, третичная структура, АТФ-азный домен, субстратсвязывающий домен, молекулярная динамика.

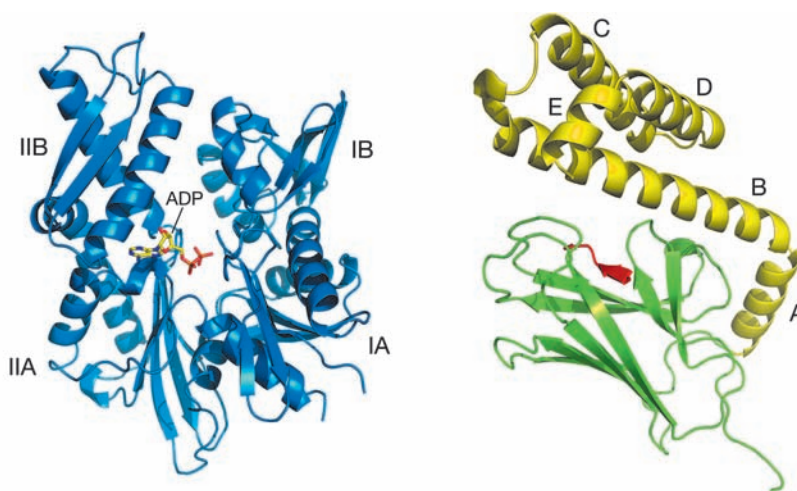
ВВЕДЕНИЕ

Hsp70 (Heat shock 70 kDa protein 1A/1B) – двудоменный АТФ-зависимый белок из класса шаперонов, защищающий гидрофобные поверхности денатурируемых в стрессовых условиях белков от агрегации и обеспечивающий их дальнейшее правильное сворачивание или же отправку на деградацию. Белки этого класса принимают участие в транспорте пептидных структур через митохондриальные и клеточные мембраны, эндоцитозе. В зависимости от внеклеточной или внутриклеточной локализации такие белки участвуют соответственно в аутоиммунном маркировании опухолевых клеток или в их защите от стрессов и апоптоза [1, 2]. Глобула Hsp70 состоит из двух функционально различных элементов: N-концевой АТФ-азный домен гидролизует АТФ до АДФ с образованием неорганического фосфата; С-концевой домен присоединения субстрата связывает гидрофобные пептиды. АТФ-азный домен образован двумя круп-

ными субдоменами I и II, каждый из которых условно разделен на участки А и В (см. рис. 1). Между субдоменами I и II располагается щель, на дне которой связывается АТФ. АТФ-азный домен содержит также участок присоединения фактора обмена нуклеотида, который, раздвигая субдомены I и II, способствует «перезарядке» АДФ на АТФ [3, 4].

Домен присоединения субстрата (SBD, Substrate Binding Domain) состоит из β-листового субдомена (βSBD), связывающего субстратный пептид, и α-спиральной «крышки» (αSBD), образованной пятью α-спиралями А, В, С, D и Е (см. рис. 1). За счет конформационных изменений, опосредованных гидролизом АТФ и действием кошаперона Hsp40, субстратсвязывающий домен способен переходить из закрытого в открытое состояние, при этом «крышка» регулирует доступность субстратсвязывающего домена для гидрофобных участков пептидов-мишеней [5].

Рис. 1. АТФ-азный домен Hsp70 человека в комплексе с ADP (слева; pdb ID 1HJO [6]) и субстрат-связывающий домен шаперона DnaK *E. coli*, прокариотического гомолога Hsp70 (справа; желтым отмечен α SBD, зеленым – β SBD, красным – субстратный пептид; pdb ID 1DKZ) [7].



Опосредуемые кошапероном Hsp40 гидролиз АТФ и присоединение субстрата приводят к отделению субстратсвязывающего домена Hsp70 от АТФ-азного домена, в результате чего они остаются связанными гидрофобным линкером. Известно, что Hsp70 способен образовывать в растворе олигомеры. Скорее всего, это происходит за счет того, что субстратсвязывающий домен Hsp70 способен связывать гидрофобный линкер другой молекулы Hsp70 в момент, когда ее домены разобщены [8, 9].

Гидролиз АТФ индуцируется J-доменом кошаперона Hsp40. Изучение связывания Hsp70 и Hsp40 показало, что остаток аспарагиновой кислоты (Asp35) J-домена Hsp40 дрожжей взаимодействует с остатком Arg171 Hsp70, что влечет за собой гидролиз АТФ и последующее отделение доменов Hsp70 друг от друга. Предполагается, что сигнал к гидролизу АТФ идет по цепочке J-домен Hsp40 → Arg171 (линкер Hsp70) → Tyr371 (АТФ-азный домен Hsp70) → Ile181 (АТФ-азный домен Hsp70) [10–12], после чего происходит связывание субстратного пептида и расхождение доменов. Точный механизм этого процесса еще не известен.

Предполагается, что структура пептидсвязывающего домена Hsp70 млекопитающих аналогична структуре подобного домена у их прокариотического гомолога DnaK (рис. 1) [7]. Хотя установлена структура отдельных элементов субстратсвязывающего домена Hsp70 [11, 13], однако полноразмерная трехмерная структура Hsp70 млекопитающих на данный момент неизвестна. В настоящей работе предпринята попытка построения трехмерной структуры полноразмерного Hsp70 при помощи методов молекулярного моделирования. Структура представляет интерес не только при изучении взаимодействия АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов шаперона, но и как перспективная мишень при поиске противоопухолевых препаратов. В силу своих иммуногенных свойств шапероны служат объектом

успешных фармакологических исследований [5, 14]. Получение достоверной структуры шаперона Hsp70 человека и продвижение в понимании механизма его функционирования поможет ускорить и удешевить исследования в области шаперон-ассоциированных стратегий терапии онкологических заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Моделирование по гомологии проводили с помощью сервиса Swiss Model [15, 16]. Подготовку системы для расчетов молекулярной динамики осуществляли в программе tleap (пакет программ AmberTools 1.2). Молекулярную динамику проводили в пакете программ Amber10 [17]. Молекулу белка помещали в ячейку кубической формы таким образом, чтобы расстояние от белка до ее стенок было не менее 12 Å. В качестве растворителя использовали воду TIP3P. Шаг интегрирования на всех этапах принимали равным 2 фс. Минимизация энергии ограничивалась 5000 шагов, алгоритм steepest descent сменялся на conjugated gradient после 2500 шагов. Радиус обрезки электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий (cutoff distance) составлял 10 Å.

Исследуемые структуры приводили в равновесие в четыре этапа: минимизация энергии с силовыми ограничениями на все атомы белка, минимизация энергии без силовых ограничений, разогрев и молекулярная динамика. Разогрев от 0 до 300 К производили при постоянном объеме в течение 50 пс. Молекулярную динамику проводили при постоянном давлении. Для контроля температуры использовали термостат Ланжевена. Эти же параметры использовали для запуска управляемой молекулярной динамики. При симуляциях разрыва солевых мостиков силовую константу принимали равной 20 ккал/моль·Å².

Для визуального анализа трехмерных структур использовали программу VMD 1.8.6 [18].

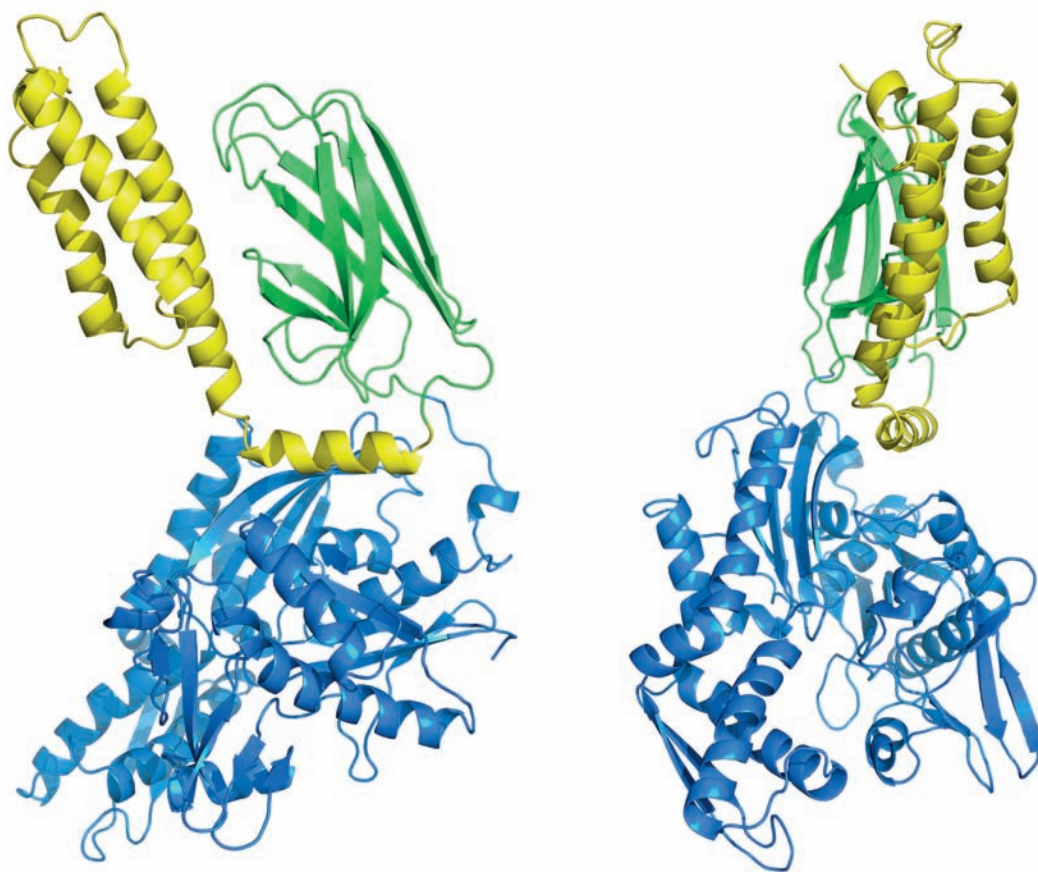


Рис. 2. Модель hHsp70_2p32 после уравнивания. АТФ-азный домен обозначен синим цветом, α SBD – желтым, β SBD – зеленым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование полноразмерной структуры Hsp70

При моделировании использовали следующие элементы банка данных структур белков (PDB): субстратсвязывающий домен DnaK *Escherichia coli* (1DKZ; *pus. 1*); α -субдомен субстратсвязывающего домена нематоды *Caenorhabditis elegans* (2P32 [19]); АТФ-азный домен, β SBD и α -спираль 'А' α SBD Hsc70 быка *Bos taurus* (1YUW). Последняя структура описывает контакт АТФ-азного домена с субстратсвязывающим доменом в момент, когда домены жестко сцеплены друг с другом.

Модель hHsp70_1dkz

Моделирование проводили в три стадии:

1. По аминокислотной последовательности Hsp70 человека (human Hsp70, hHsp70) (PID: P08107) и третичной структуре его близкого гомолога из *B. taurus* – Hsc70 (1YUW), построена модель, описывающая АТФ-азный домен, β SBD и спираль 'А' α SBD. Идентичность сконструированной структуры и шаблона составляла 88.6%. Для получения полноразмерной структуры требовалось достроить оставшуюся часть α SBD.
2. В качестве шаблона для построения α SBD ис-

пользовали структуру DnaK (прокариотического гомолога Hsp70) 1DKZ, где α -субдомен в комплексе с β -субдоменом образовывали полноразмерный субстратсвязывающий домен. Идентичность сконструированной структуры и шаблона составляла 44.7%.

3. Полученные структуры накладывали друг на друга по β SBD. После наложения в результирующей структуре оставили β SBD из модели, построенной по гомологии с 1YUW.

Таким образом была создана конструкция, АТФ-азный домен и β -субдомен SBD которой построены по гомологии с близким эукариотическим родственником Hsp70, а α SBD – по гомологии с прокариотическим шапероном DnaK из *E. coli*. Модель уравнивали с помощью симуляции молекулярной динамики в течение 6.5 нс.

Анализ молекулярно-динамической траектории показал, что пространственные структуры АТФ-азного домена и β SBD стабильны, в то время как сегмент α SBD, образованный α -спиралями 'В'-'Е', склонен к разворачиванию.

Модель hHsp70_2p32

В качестве альтернативного гомологического шаблона для моделирования нестабильного участка α SBD использовали соответствующую структуру из орга-

низма нематоды (*C. elegans*; PDB ID: 2P32). С помощью сервиса SwissModel проведено моделирование элементов α SBD hHsp70, которые совпадали по выравниванию с аминокислотной последовательностью структуры 2P32 (аминокислотные остатки 533–614). Идентичность полученной структуры и шаблона составляла 63%. Созданные конструкции накладывали на модель hHsp70_1dkz по α -спирали 'B', после чего часть α -спирали 'B', а также спирали 'C', 'D' и 'E' заменяли на соответствующие элементы, построенные по гомологи с 2P32. Полученную модель уравнивали в течение 8.5 нс.

Структура hHsp70_2p32 после уравнивания изображена на рис. 2. Спиральи 'B', 'C' и 'D' образуют пучок, похожий по третичной структуре на 1DKZ, однако, в отличие от него, в hHsp70_2p32 α -спираль 'E' редуцировалась. По данным анализа молекулярно-динамической траектории построенная структура проявила высокую стабильность и была принята в качестве рабочей для дальнейших исследований.

Изучение междоменных взаимодействий hHsp70

В процессе функционирования исследуемого шаперона образующие его домены расходятся с разрывом всех нековалентных взаимодействий между ними, в результате чего остаются связанными лишь междоменным линкером.

С помощью метода управляемой молекулярной динамики (Steered Molecular Dynamics) изучен процесс расхождения доменов. Выявлены ключевые для этого процесса солевые мостики и показано, что обратное сближение доменов не зависит от изменения конформации АТФ-азного домена. В качестве модели использовали hHsp70_2p32 (в дальнейшем просто hHsp70).

Разрыв солевого мостика Arg171 : Glu516

По данным работы [12], расхождение доменов начинается с опосредованного кошапероном Hsp40 разрыва солевого мостика Arg171 : Glu516, соединяющего α -спираль 'A' субстратсвязывающего домена с субдоменом IA АТФ-азного домена. Моделирование этого процесса проведено с помощью метода управляемой молекулярной динамики путем имитации раздвижения C_{α} -атомов указанных аминокислотных остатков на 10 Å. Исходное расстояние между атомами составляло 12 Å (расстояние между взаимодействующими участками – 4 Å).

Общая работа, затраченная на раздвижение указанных атомов, составила 34.3 ккал/моль. Примечательно, что после фактического разрыва солевого мостика Arg171 : Glu516 среднее расстояние между петлями АТФ-азного домена, фиксирующими β - и γ -фосфаты АТФ, сократилось на 2 Å (с 8 до 6 Å; рис. 3). Теоретически подобное движение в нативном

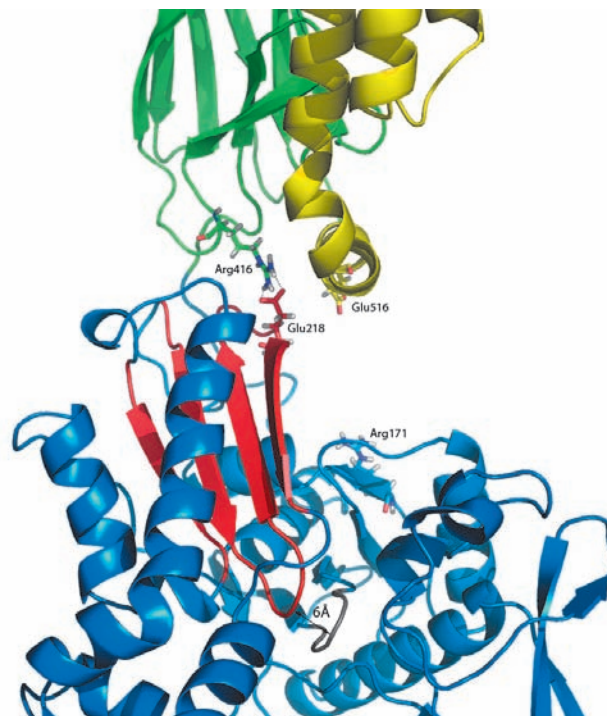


Рис. 3. Перестройка солевых мостиков при расхождении доменов hHsp70: справа разорванный солевой мостик Arg171 : Glu516, слева второй мостик Arg416 : Glu218 до симуляции его разрыва. Красным отмечен β -лист, включающий Glu218 и петлю, фиксирующую АТФ. Вторая петля, принимающая участие в фиксации, отмечена серым цветом.

ферменте может вызывать гидролиз АТФ. В таком случае солевой мостик Arg171 : Glu516 сдерживает АТФ-азный домен hHsp70 от спонтанного гидролиза АТФ, а кошаперон, разрывая эту связь, тем самым инициирует этот процесс.

Полученная структура уравнивалась в течение 1 нс. Тенденций к восстановлению разорванной связи Arg171 : Glu516, как и к дальнейшему расхождению доменов, при этом не выявлено.

Разрыв солевого мостика Arg416 : Glu218

Разрыв мостика Arg171 : Glu516 привел лишь к частичному отделению доменов друг от друга, однако окончательного расхождения не произошло. В связи с этим предстояло выявить наиболее стабильные в ходе предыдущих молекулярно-динамических исследований нековалентные связи, разрыв которых мог бы привести к полному расхождению доменов hHsp70.

Первоначально был выбран солевой мостик Arg155 : Glu523, соединяющий α -спираль 'A' с субдоменом IA, однако его разрыв не привел к расхождению доменов и не выявил никаких тенденций к по-

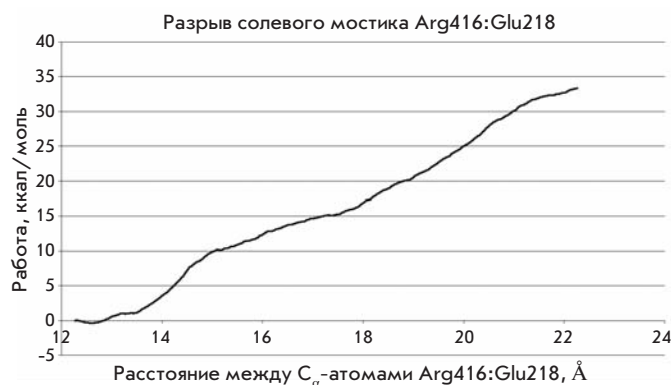


Рис. 4. Работа, затраченная на второй этап симуляции расхождения АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов.

ложительному развитию процесса. Отрицательный результат позволил сделать вывод о том, что, скорее всего, связью, ключевой для расхождения доменов, остается солевой мостик Arg416 : Glu218, соединяющий один из поворотов β-субдомена SBD с субдоменом ПА АТФ-азного домена.

Исходное расстояние между C_α-атомами аминокислотных остатков, образующих связь, составляло 12.2 Å, после имитации разрыва – 22.2 Å. Общая работа, затраченная на разрыв этой связи, составила 33.4 ккал/моль. На кривой, отображающей этот процесс, наблюдается скачок: увеличение расстояния с 13.4 до 14.7 Å, сопровождавшееся непосредственным разрывом интересующей нас связи, потребовало около 7 ккал/моль (рис. 4).

Работа, затраченная на разрыв связи, равна энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ, поэтому можно предположить, что разрыв макроэргической связи в АТФ в АТФ-азном домене (предположительно вызванный разрывом мостика Arg171 : Glu516) требуется для разрыва солевого мостика Arg416 : Glu218. Glu218 является частью β-листа (образованного аминокислотными остатками 192–226 и 332–338; рис. 5), второй β-поворот которого непосредственно фиксирует β- и γ-фосфаты молекулы АТФ. Первый β-поворот принимает участие в связывании АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов. Учитывая тот факт, что β-лист является жесткой структурой, его смещение, опосредованное гидролизом АТФ, вполне может вызвать разрыв второй связи, необходимой для расхождения доменов.

Как и ожидалось, симуляция разрыва связи Arg416 : Glu218 привела к полному расхождению доменов. Полученная структура уравнивалась на протяжении 1.5 нс, в течение которых никаких значительных изменений в структуре исследуемого шаперона не замечено.

В процессе моделирования расхождения доменов выяснился интересный факт: освободившиеся от солевых мостиков остатки Arg416 и Glu516 в дальнейшем образовали друг с другом новый солевой мостик (см. рис. 5). Образование аналогичного солевого мостика стерически возможно и между Arg171 и Glu218.

На основании этих данных можно сделать вывод о важной роли междоменных солевых мостиков в функционировании hHsp70: мостики Arg171 : Glu516 и Arg416 : Glu218 связывают АТФ-азный и субстратсвязывающий домены, однако по мере расхождения доменов партнеры перестраиваются и образуются солевые мостики Arg171 : Glu218 и Arg416 : Glu516, которые стабилизируют новое структурное состояние шаперона.

Симуляция раздвижения субдоменов I и II

В процессе обмена нуклеотида АТФ-азный и субстратсвязывающий домены сходятся обратно, однако силы, заставляющие их это сделать, достоверно не установлены. Стохастический характер схождения доменов представляется маловероятным. Ввиду того, что обмен нуклеотида проходит при разобщенных доменах и сопровождается взаимодействием АТФ-азного домена с фактором обмена нуклеотидов, естественно пред-

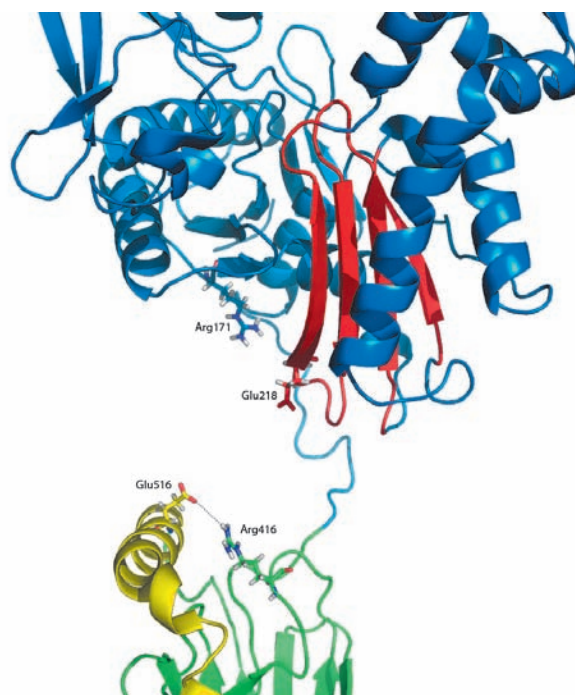


Рис 5. hHsp70 после симуляции расхождения доменов. Красным отмечен β-лист, движение которого сопровождается разрывом второго солевого мостика Glu218 : Arg416. Пунктиром обозначен образовавшийся после расхождения доменов солевой мостик Glu516 : Arg416.

положить, что раздвижение субдоменов I и II фактором нуклеотидного обмена теоретически способно повлиять на схождение АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов. Мы провели моделирование этого процесса. При симуляции раздвижения субдоменов I и II точками приложения силы являлись атомы азота, принадлежащие остаткам Thr14 и Gly203, непосредственно взаимодействующим с АТФ/АДР.

Исходное расстояние между ними составляло 7.3 Å, конечное – 14.3 Å. Несмотря на теоретическую возможность того, что обмен нуклеотида повлияет на схождение доменов, мы получили достаточно предсказуемый результат: изменение расстояния между субдоменами I и II никак не отразилось на взаимодействии доменов друг с другом. Этот результат говорит о том, что схождение доменов, вероятнее всего, опосредуется неким белком, которым вполне может быть другой шаперон hHsp70. Теоретически он способен связать высвободившийся при расхождении доменов гидрофобный линкер в качестве субстрата и таким образом сблизить разошедшиеся домены. Однако эта гипотеза требует дальнейшей проверки.

ВЫВОДЫ

На основании проведенного исследования можно предложить следующую схему функционирования hHsp70: при взаимодействии с J-доменом кошаперона Hsp40 происходит разрыв солевого мостика Arg171 : Glu516, что приводит к сближению петель, фиксирующих АТФ, и способствует гидролизу АТФ.

Гидролиз АТФ, в свою очередь, сопровождается смещением β-листа, содержащего одну из петель, фиксировавших АТФ, и расположенного в области междоменного контакта остатка Glu218, что влечет за собой разрыв солевого мостика Arg416 : Glu218. Разрыв солевого мостика Arg416 : Glu218 приводит к расхождению АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов, а остаток Arg416 образует солевой мостик с Glu516, входящим в субстратсвязывающий домен. Остаток Arg171, в свою очередь, образует новый солевой мостик с Glu218, и происходит перегруппировка солевых мостиков, ранее связывавших АТФ-азный и субстратсвязывающий домены hHsp70.

Роль фактора обмена нуклеотида в функционировании hHsp70, по-видимому, заключается не только в обмене АДФ на новую молекулу АТФ, но и в фиксации субдоменов I и II в раздвинутом состоянии, которое сопровождается сближением АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов с образованием солевого мостика Arg171 : Glu516, что образно может быть охарактеризовано как «взведение курка» для осуществления гидролиза следующей молекулы АТФ. «Пальцем», способным вновь нажать на этот курок, является J-домен кошаперона Hsp40.

Построенная и уравновешенная модель Hsp70 человека доступна в депозитории PMDB [20, 21] (PMDB id: PM0076412). ●

*Работа была поддержана грантом
РФФИ 09-04-92744-ННИОМ_а.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Multhoff G., Pfister K., Gehrman M., Hantschel M., Gross C., Hafner M., Hiddemann W. // Cell Stress Chaperones. 2001. V. 6. № 4. P. 337–344.
- Schmitt E., Gehrman M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C. // J. Leukoc. Biol. 2007. V. 81. № 1. P. 15–27.
- Vogel M., Bukau B., Mayer M.P. // Mol. Cell. 2006. V. 21. № 3. P. 359–367.
- Nollen E.A., Kabakov A.E., Brunsting J.F., Kanon B., Höfeld J., Kampinga H.H. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 7. P. 4677–4682.
- Гужова И.В., Новоселов С.С., Маргулис Б.А. // Цитология. 2005. Т. 47. № 3. С. 187–199.
- Osipiuk J., Walsh M.A., Freeman B.C., Morimoto R.I., Joachimiak A. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1999. V. 55. № 5. P. 1105–1107.
- Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F., Gragerov A., Ogata C.M., Gottesman M.E., Hendrickson W.A. // Science. 1996. V. 272. № 5268. P. 1606–1614.
- Chang Y., Sun Y., Wang C., Hsiao C. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 22. P. 15502–15511.
- Freeman B.C., Myers M.P., Schumacher R., Morimoto R.I. // EMBO J. 1995. V. 14. № 10. P. 2281–2292.
- Mitra A., Shevde L.A., Samant R.S. // Clin. Exp. Metastasis. 2009. V. 26. № 6. P. 559–567.
- Chou C., Forouhar F., Yeh Y., Shr H., Wang C., Hsiao C. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 32. P. 30311–30316.
- Jiang J., Maes E.G., Taylor A.B., Wang L., Hinck A.P., Lafer E.M., Sousa R. // Mol. Cell. 2007. V. 28. № 3. P. 422–433.
- Jiang J., Prasad K., Lafer E.M., Sousa R. // Mol. Cell. 2005. V. 20. № 4. P. 513–524.
- Mazzaferro V., Coppa J., Carrabba M.G., Rivoltini L., Schiavo M., Regalia E., Mariani L., Camerini T., Marchianò A., Andreola S., Camerini R., Corsi M., Lewis J.J., Srivastava P.K., Parmiani G. // Clin. Cancer Res. 2003. V. 9. № 9. P. 3235–3245.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. // Bioinformatics. 2006. V. 22. P. 195–201.
- Kiefer F., Arnold K., Künzli M., Bordoli L., Schwede T. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. 387–392.
- Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Kolossvary I., Wong K.F., Paesani F., Vanicek J., Wu X., Brozell S.R., Steinbrecher T., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Mathews D.H., Seetin M.G., Sagui C., Babin V., Kollman P.A. // AMBER 10. San Francisco: University of California, 2008.
- <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.8.6/>
- Worrall L.J., Walkinshaw M.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 357. P. 105–110.
- <http://mi.casput.it/PMDB/main.php>
- Castrignanò T., De Meo P.D., Cozzetto D., Talamo I.G., Tramontano A. // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. 306–309.