

www.pibb.ac.cn

分子伴侣 HdeA 与底物蛋白 SurA 作用 机制的模拟研究 *

周丹丹1) 于延庆2) 吴 吴1) 李艳妮11** 乔建军1)

(¹⁾ 天津大学化工学院制药工程系,系统生物工程教育部重点实验室,天津 300072; ²⁾ 上海药明康德新药开发有限公司,上海 200131)

摘要 分子伴侣 HdeA 与底物蛋白间的相互作用可帮助底物蛋白复性,这是肠道致病菌得以在酸性环境中幸存的重要原因之一.为探究 HdeA 发挥伴侣活性的作用机制,本研究采用分子对接和分子动力学的方法,模拟了 HdeA 与底物蛋白 SurA 间的相互作用,计算了二者的结合自由能.通过分析 HdeA-SurA 复合物体系的作用模式、氢键作用以及能量分解的结果,确定了 HdeA 与底物蛋白 SurA 结合时发挥重要作用的关键氨基酸残基.该研究结果为以后采用实验手段探究 HdeA 与底物蛋白之间的作用提供了重要的理论参考,同时为今后设计与开发 HdeA 的抑制剂提供了理论指导依据.

关键词 HdeA,分子伴侣,SurA,分子对接,分子动力学 学科分类号 O641.3

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0347

哺乳动物极端酸性的胃部环境是阻止食源性细 菌入侵的天然屏障^[1]. pH 值为 1~3 的胃部环境能 够引起细菌体内的功能蛋白质聚集变性,从而使得 致病菌失去繁殖能力.然而,部分致病菌由于具有 独特的耐酸机制可以安全地通过胃部的酸性环境到 达肠道,进而引发肠道疾病.

分子伴侣依赖性的功能蛋白质的复性是致病菌 具有耐酸性的重要原因之一.分子伴侣主要存在于 周质空间中四,而 HdeA 蛋白是绝大多数致病菌共 有的分子伴侣,对致病菌生理功能的维护发挥着重 要作用[3-5].通常情况下,当致病菌到达酸性的胃 部环境时,HdeA 可阻止致病菌周质蛋白的酸诱导 聚集,从而保证肠道致病菌能够安全地到达肠道^[4]. 具体表现为:在中性条件下,HdeA 以二聚体的形 式存在,不具有分子伴侣的活性。。当致病菌到达 酸性的胃部时, HdeA 迅速由二聚体解离成具有分 子伴侣活性的单体,暴露出可以和底物蛋白质结合 的疏水性表面^[7], HdeA 单体具有较强的柔性且结 构部分展开和无序,因此能够与很多底物蛋白结 合. 昌增益等18通过利用光交联探针技术鉴定出在 低 pH 值下 HdeA 可以特异性地结合底物蛋白 SurA 和 DegP^[9],阻止其酸诱导聚集.当致病菌安全度过 酸性的胃部环境后,HdeA单体便缓慢释放底物蛋白,帮助底物蛋白重新折叠复性,从而保护肠道致病菌安全地通过极酸的胃部环境^[10-11].

目前虽然已经对 HdeA 发挥分子伴侣作用的过程有了一定的认识,但对于在酸性胃部环境中 HdeA 与蛋白底物相互作用的分子机制,人们却知 之甚少.Bardwell等¹⁰⁹只报道了 HdeA 单体展开 时,暴露出的疏水性区域负责与底物蛋白进行结 合,但具体的作用结合模式并未见报道.另外,他 们研究的是 HdeA 与苹果酸脱氢酶(MDH)之间的相 互作用,然而 MDH 却并不是存在于周质空间的 酶.因此,研究在肠道致病菌的周质空间中 HdeA 如何与其底物蛋白发生作用,对于揭示肠道致病菌 的耐酸机制至关重要.但目前尚未见任何相关报 道,主要是由于在酸性环境中 HdeA 的晶体结构一 直未被解析,限制了人们对此展开相关的实验研 究.而分子模拟技术可构建出酸性环境中 HdeA 的

收稿日期: 2016-11-02, 接受日期: 2017-02-15

^{*}国家自然科学基金(31570049)资助项目.

^{**} 通讯联系人.

Tel: 022-27892069, E-mail: liyanni@tju.edu.cn

三维结构,并可在此基础上从分子水平深入探究 HdeA 与底物蛋白的相互作用机制.

本文中我们以 HdeA 及其作用底物 SurA 为研 究对象,通过分子对接和分子动力学模拟技术来探 究在酸性的胃部环境中, HdeA 是如何发挥伴侣活 性的.之所以选择 SurA,这是因为它不仅作为 HdeA 的底物存在于周质空间中,而且它本身也是 分子伴侣,可以帮助外膜蛋白(outer membrane) proteins, OMPs)更好地折叠[12], 也可保护其他蛋白 质(LamB、OmpA、OmpC、OmpF)进行正确折叠[13]. 而且 SurA 对于稳定细菌的生长是十分重要的. SurA 首先在酸性胁迫下被 HdeA 保护,并进而在 恢复中性的过程中与 HdeA 协同作用以帮助其他底 物分子重折叠成具有活性功能的蛋白质. 由于极端 酸性胁迫是一种十分强烈和直接的环境刺激,它将 使绝大多数蛋白质失去功能,因此在膜间质中专门 发挥酸性保护作用的分子伴侣 HdeA 可能会通过保 护类似于 SurA 这样的分子伴侣, 使得它们在恢复 中性的过程中发挥分子伴侣活性,继而帮助下游蛋 白质进行重折叠^[14-16].另外,SurA的晶体结构文献 中已有报道[17-18]. 本文中我们选择 SurA 作为分子 伴侣 HdeA 的作用底物,是非常有代表性的. 通过 结合自由能的计算和能量分解可以揭示出分子伴侣 HdeA 与底物蛋白 SurA 的主要推动力,确定出对 二者的结合有重要作用的氨基酸残基.我们的研究 结果可以为今后使用实验手段探究 HdeA 与底物之 间的作用提供重要的理论指导依据.

1 实验过程

1.1 HdeA 和 SurA 模型文件的准备

HdeA 的晶体结构模型来自 Protein Data Bank (PDB)数据库,编号为 1DJ8^[4]. HdeA 单体有 A、 B、C、D 4 个 α 螺旋结构,共含有 79 个氨基酸残 基,编号为 9~87,在 HdeA-SurA 复合物中的编号 为 409~487,采用恒定 pH 的分子动力学模拟 (CPHMD)技术^[19],获得 HdeA 在 pH=2 时的结构.

在酸性条件下具有伴侣活性的 HdeA 晶体结构 一直没有被解析出来,研究生物分子在特定 pH 值 环境下的构象变化,CPHMD 方法是一个强有力的 手段.模拟过程中,被滴定的酸性氨基酸残基用蒙 特卡洛取样法抽取根据玻尔兹曼方程分布的质子化 状态,弥补了常规动力学模拟下可滴定残基质子态 不能改变的缺陷.质子化状态如何分配,受溶剂 pH 这个外部参数影响.改变原子的部分电荷,可 改变氨基酸质子化状态^[20]. 与传统的设定质子化状态方法相比,CPHMD 不仅能模拟质子化状态之间的平衡和所有滴定基团之间的反应,还能节约计算时间^[21].更加重要的是,CPHMD 不仅可计算酸性氨基酸的 pKa 值,还能获得被滴定氨基酸残基的质子化状态和生物分子的构象变化之间的关系^[21].

本文利用分子动力学软件 Amber12^[22]中的 Sander 模块对 HdeA 进行恒定 pH 值下的分子动力 学模拟,采用ff03 力场及 Onufriev、Bashford、 Case 等[23-24]开发的 "OBC" 模型(igb=2)用于溶剂化 效应,盐浓度设为0.15 mol/L.具体方法如下:首 先将体系中的 ASP 改成 AS4, GLU 改成 GL4, HIS 改成 HIP, 这将保证生成的 prmtop 文件中在每 个可能的质子化位点上都有一个定义的氢质子. 然 后根据得到的 prmtop 文件生成 cpin 文件,此文件 描述了哪些残基将被滴定并且定义了可能的质子化 状态和相关的能量.对 HdeA 体系进行优化,先采 用 5000 步的最陡下降法计算,再进行 5000 步的共 轭梯度法计算,然后在2ns的时间内将体系的温 度从 10 K 升温到 300 K, 接着进行在等温等压条 件下(NPT) 2 ns 的动力学平衡计算,最后进行 10 ns 的分子动力学模拟,得到的结构用于分子对接.

SurA 的晶体结构在 PDB 数据库虽然也存在, 编号为1M5Y,但缺失了第165~171位和389~ 394 位的氨基酸残基,为了保证模拟的准确性,通 过在线服务器 I-TASSER 将结构补齐(http:// zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). 取得分 高的 SurA 模型进行分子动力学模拟,从而消除初 始模型在构型和稳定性上的一些缺陷. 使用的软件 为 Amber12, 力场为 ff99SB. 水溶剂采用 TIP3P 模型[25],向 SurA 体系添加 33 172 个水分子和 4 个 Na⁺ 使 SurA 体系呈电中性. 在进行动力学模拟之 前,先对体系进行能量优化.首先进行 2000 步约 束优化,前1000步使用最陡下降法,后1000步使 用共轭梯度法;然后进行4000步无约束优化,前 2000步使用最陡下降法,后 2000步使用共轭梯 度法. 能量优化之后, 对体系进行升温, 温度在 60 ps 的时间内从 10 K 升到 300 K,最后在等温等 压(NPT)条件下对体系进行 5 ns 的分子动力学平 衡.模拟过程中使用 SHAKE 算法来对氢键进行约 束,使用 PME 法处理长距离静电作用,非键相互 作用的截断值设置为 1.0 nm, 步长为 2 fs, 每隔 2 ps 记录一次坐标文件.模拟过程中,使用 VMD 查看

整个动力学过程.

蛋白质结构进行动力学优化以后,需要对其最终结构进行评价,本研究采用 ERRAT¹⁰⁶和 PROSA¹²⁷ 来对模型进行打分评价.ERRAT 是一种蛋白质结构的验证算法,特别适用于评估晶体结构模型的构 建和细化过程.它考察的是分子中原子间非键相互 作用的总体性质.其原理是利用 PDB 数据库中 96 个优秀结构作为标准,通过一些定义的函数,计算 模型的 ERRAT 值,其值越高越好,通常认为模型 的 ERRAT 值高于 50 就表示是高质量的.ERRAT 对于判断模型的可靠性是非常有用的¹²⁶.本研究课 题 ERRAT 值 的计算是提交到网站上(http:// nihserver.mbi.ucla.edu/ERRAT/)得到的.

PROSA 程序评价的是构建模型的能量,反映的是氨基酸残基之间的相互作用能.通过公式(1) 得到.

$$Zs, c = \frac{Es, c - \xi s, c}{\sigma_c}$$
(1)

式(1)中 *E*s, c 表示在构象 C 空间中,序列 S 中 残基与残基之间的作用能量, *ξ*s, c 表示在构象 C 空间中,序列 S 中残基与残基之间相互作用的平均 能量, *σ*_s表示相对应的标准偏差.计算得到的 *Z*s,c 是 *Z*-score 值,通常为负值.在 PROSA 运行出的 结果图中,将显示目前 PDB 数据库中所有已经被 实验确定大小相似的蛋白结构链的 *Z*-score 值组成 的区域,若目标蛋白的 *Z*-score 值在这一范围内, 则说明该目标蛋白结构是可以接受的,否则,则认 为结构不合理^[27].本研究课题 *Z*-score 值的计算是 提交到网站上(http://prosa.services.came.sbg.ac.at)得 到的.

将动力学优化后的 SurA 结构使用 ERRAT 和 PROSA 进行评价和打分,以保证所得到的 SurA 模型 是 合 理 可 靠 的 . 将 SurA 的 最 终 结 构 使 用 CPHMD 技术获得它在 pH=2 时的蛋白质结构,对 SurA 体系进行 6 ns 的动力学模拟,其他参数设置 同 HdeA.

1.2 HdeA 与底物蛋白 SurA 的分子对接

将 pH=2 时的 HdeA 结构和 SurA 结构使用 Zdock 对接服务器进行分子对接生成 HdeA-SurA 体系,在 HdeA-SurA 体系中,SurA 编号为 1~ 408, HdeA 编号为 409~487(9~87). Zdock^[28]是 Weng 研究小组开发的蛋白质对接程序,服务器网 址为(http://zdock.bu.edu/),是目前预测成功率较高 的一种刚性对接方法.对接完成后生成 2000 个构 象,选择前10个打分最高的复合物结构,采用 Fiberdock¹²⁹对复合物的骨架结构进行柔性诱导契合 以及对侧链进行细化,最终得到一个最佳的 HdeA-SurA 复合物构象进行分子动力学模拟.

1.3 HdeA-SurA 复合物体系的分子动力学模拟

使用 Amber12 软件对 HdeA-SurA 复合物体系 进行 45 ns 的分子动力学模拟,向 HdeA-SurA 复合 物体系中添加 28 618 个水分子,同时添加 8 个 Na⁺ 使体系呈电中性.其他的参数设置同 1.1 中对 SurA 进行分子动力学模拟的参数设置.

1.4 结合自由能的计算和能量分解

采用 MM-PBSA^[30]的方法计算模拟体系的结合 自由能,计算公式:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{SOL}} - T\Delta S \tag{1}$$

其中 ΔG_{MM} 是真空条件下的分子内能差,包括 静电作用能 ΔG_{ELE} 和范德华作用能 ΔG_{VDW} ; $T\Delta S$ 指 的是构象熵的变化值,我们采用简正模分析法 (normal mode analysis, NMA),用 Amber12 程序中 的 Nmode 模块计算^[31]. NMA 方法的基本假设是分 子的运动可以被描述为局域能量极小值附近简单的 简谐振动. 它的优点在于理论的简化性、计算速度 快以及需要的参数少,T为绝对温度; ΔG_{SOL} 是溶 剂化自由能差,

$$\Delta G_{\rm SOL} = \Delta G_{\rm PB} + \Delta G_{\rm SA} \tag{2}$$

 ΔG_{PB} 为通过求解 Poisson-Boltzmann 方程^[32]获得的极性溶剂化自由能差, ΔG_{SA} 是非极性溶剂化自由能差, 由经验公式得到:

$$\Delta G_{\rm SA} = \gamma^* SA + \beta \tag{3}$$

SA 是溶剂可接触表面积,采用 Tsui 和 Case 等建立的参数,在 PBSA 计算中 γ 和 β 分别为 0.00542 kcal/(mol·Å²)和 0.92 kcal/mol^[33].

能量分解采用的是 MM-GBSA^[34]的方法,各个 残基相互作用能的计算公式为:

 $\Delta G = \Delta G_{\rm VDW} + \Delta G_{\rm ELE} + \Delta G_{\rm GB} + \Delta G_{\rm GBsur} \tag{4}$

 ΔG_{VDW} 、 ΔG_{ELE} 分别是每个氨基酸残基在真空下的范德华作用能和静电相互作用能; ΔG_{GB} 为每个残基的极性溶剂化能,由广义的波恩模型计算得到; ΔG_{GBsur} 为非极性溶剂化能,由 LCPO 模型计算得到.

2 结果与讨论

2.1 HdeA 和 SurA 在 pH=2 时的构象分析

利用 CPHMD 技术分别获得 HdeA(图 1a)和 SurA(图 1b)在 pH=2 时的构象.由图 1a 可以看出: HdeA 的构象在 6 ns 以后趋于平衡, RMSD 值在 0.8~1.0 nm 之间浮动. 而图 1b 显示: SurA 的构

象在 3.5 ns 以后开始趋于稳定, RMSD 值在 0.65~ 0.8 nm 之间浮动.



 Fig. 1
 The RMSD of HdeA and SurA

 (a) The RMSD vs. simulated time in HdeA at pH=2. (b) The RMSD vs. simulation time in SurA by CPHMD.

图 2a 和 2b 分别表示了 HdeA 在中性条件下和 pH=2 时的构象. HdeA 结构中的 A、B、C、D 螺 旋分别使用红色、绿色、黄色、橘色来表示. 从图 中可以看出, pH 值由中性变为 2 后, HdeA 的螺 旋结构发生了很大的变化. B、C 螺旋部分展开且 无序,同时我们注意到 B 螺旋展开的程度要比 C 螺旋大,这与文献中报道的实验检测结果是一致 的^[35]. 这是因为 A、C 螺旋之间存在着二硫键,使 得二硫键附近的螺旋结构比较稳定,这也是 A 螺 旋没有展开的原因. D 螺旋完全展开,可能的原因 是 D 螺旋中存在酸性氨基酸,而且 D 螺旋接近 N 端, N 端无序性较强,在构象变化中带动 D 螺旋 完全解离.



Fig. 2 The conformation of HdeA at pH=7 and pH=2 (a) The HdeA conformation at pH=7. (b) The HdeA conformation at pH=2.

SurA 在中性条件下和 pH=2 时的构象见图 3a 和图 3b. pH 值由中性变为 2 后, SurA 的结构整体上变得更为松散,也有一定程度的展开,部分 α 螺旋结构展开变为无序.



Fig. 3 The conformation of SurA at pH=7 and pH=2 (a) The conformation of SurA at pH=7. (b)The conformation of SurA at pH=2.

2.2 HdeA-SurA 复合物体系的分子动力学模拟 结果

2.2.1 HdeA-SurA 复合物体系的稳定性分析

HdeA-SurA 复合物在经过 45 ns 的分子动力学 模拟后,体系的 RMSD 值变化如图 4a 所示.从 图 4a 可以看出, HdeA-SurA 体系在 30 ns 以后趋 于稳定, RMSD 值波动范围在 0.55~0.75 nm 之间, 表明复合物体系已达到平衡.

为了考察复合物体系中各个氨基酸残基的柔性 情况,我们分别计算了 HdeA 与 SurA 结合前及结 合后体系的均方根涨落(RMSF)值(图 4b). 由图 4b 可以看出: HdeA 在没有和底物蛋白结合时,处于 9~10、39~43 和 83~87 位氨基酸残基的 RMSF 值比其他氨基酸残基的 RMSF 值要高,表明这些 氨基酸残基的柔性很强.在与 SurA 结合后, HdeA 中氨基酸残基的 RMSF 值整体上都明显低于结合前的数值.这主要是因为 HdeA 与 SurA 结合后,它们之间较强的相互作用使得 HdeA 的构象整体上变得更为稳定.尤其是处于 9~10、39~43 和 83~87 位的氨基酸残基,它们的 RMSF 值在与底物蛋白 SurA 结合后有着非常明显的降低,表明它们很可能参与了与底物蛋白的结合.后面的结合模式分析以及能量分解会进一步确证究竟哪些氨基酸 残基是 HdeA 结构中与底物蛋白结合的关键残基.



2.2.2 HdeA-SurA 复合物体系的结合模式分析

图 5 给出的是 HdeA(黄色)与 SurA(棕色)相互 作用表面的局部放大图.从图 5 中可以看出, HdeA 中位于 10~12、16、20、22~23、25、38~ 40、42~43、46~47、50~51、55、57~58、64、 68~69、76~79、82、84~85 位的氨基酸残基均 分布在与底物相互作用的结合腔表面.有实验研究 报道^[35-36], HdeA 在与底物结合的过程中,发挥主 要作用的是 HdeA 的疏水性区域,而 HdeA 的疏水 性区域主要分布在 18~43 和 46~65 位氨基酸残 基.在我们研究的 HdeA-SurA 体系中,接触表面 的 30 个氨基酸残基中有 17 个分布在疏水性区域, 由此也可以推断, HdeA 在与 SurA 结合的过程中, 疏水性区域是主要的作用部位,这与文献中相关的 实验报道是一致的.

2.2.3 HdeA-SurA 复合物体系的氢键分析 氢键相互作用对于维持蛋白质结构、蛋白配体

识别过程以及蛋白配体相互作用等方面都是非常重要的,因此我们对 HdeA-SurA 复合物体系的氢键进行了分析. 评判氢键的标准如下: a. 氢原子供体和受体之间的距离不大于 3.5 Å; b. 氢键供体-氢原子-氢键受体之间键角不小于 120°; c. 氢键的占有率在 50%以上. HdeA 与 SurA 在相互作用的过程中一共形成了 22 个氢键,参与形成的氨基酸残基共 10 个,分别为 LYS11、TRP16、ASP20、ASP25、 ASP47、 GLN68、 LYS79、 GLY80、LYS84 和 ILE85,如表 1 和图 6 所示. 由表 1 可以看出,22 个氢键中有 11 个氢键的占有率在 90%以上,有 4 个氢键的占有率在 80%~90%之间,说明这些氢键在复合物体系中基本上是稳定存在的. 由于多个氢键的存在,使得 HdeA 和 SurA 之间的结合更为紧密和稳定.



Fig. 5 The binding surface of the HdeA-SurA complex(HdeA: Yellow SurA: brown)

生物化学与生物物理进展 Prog. Biochem. Biophys.

2017; 44 (3)

Donor	Acceptor	Occupancy/% 92.61	
SurA-GLN35-Side-NE2	HdeA-GLN68-Main-O		
SurA-GLN111-Side-NE2	HdeA-ILE85-Main-O	75.82	
SurA-LYS114-Side-NZ	HdeA-ILE85-Main-O	85.81	
SurA-LYS114-Side-NZ	HdeA-ILE85-Side-OXT	89.21	
SurA-ARG127-Side-NE	HdeA-ASP47-Side-OD2	51.25	
SurA-ARG127-Side-NE	HdeA-ASP47-Side-OD1	97.80	
SurA-ARG127-Side-NH2	HdeA-ASP47-Side-OD2	98.80	
SurA-ARG215-Side-NH1	HdeA-ASP20-Side-OD1	99.20	
SurA-ARG215-Side-NH2	HdeA-ASP20-Side-OD2	99.40	
SurA-ARG215-Side-NH2	HdeA-ASP20-Side-OD1	56.54	
SurA-ASN383-Side-ND2	HdeA-ASP25-Side-OD2	93.11	
SurA-ASN148-Side-OD1	HdeA-LYS11-Side-NZ	94.51	
SurA-ASP367-Side-OD2	HdeA-LYS11-Side-NZ	93.01	
SurA-ASP367-Side-OD1	HdeA-LYS11-Side-NZ	89.41	
SurA-ASP327-Side-OD2	HdeA-TRP16-Side-NE1	99.90	
SurA-SER28-Main-O	HdeA-GLN68-Side-NE2	94.01	
SurA-ASP101-Side-OD2	HdeA-LYS79-Main-N	58.94	
SurA-ASP101-Side-OD2	HdeA-GLY80-Main-N	61.24	
SurA-SER20-Main-O	HdeA-LYS84-Side-NZ	73.73	
SurA-GLU115-Side-OE2	HdeA-LYS84-Side-NZ	74.43	
SurA-GLU115-Side-OE1	HdeA-LYS84-Side-NZ	84.02	
SurA-ASP23-Side-OD1	HdeA-ILE85-Main-N	97.30	

Table 1 The hydrogen bonds between HdeA and SurA



Fig. 6 The hydrogen bonds between HdeA and SurA

2.2.4 HdeA-SurA 复合物体系的结合自由能分析

我们采用 MM-PBSA 的方法计算了 HdeA-SurA 体系的结合自由能. 由表 2 可知: HdeA 和 SurA 的结合自由能为–102.92 kcal/mol,表明 HdeA 能够与 SurA 很好地结合. 各能量项中,分子内能 ΔG_{MM} 的贡献最大,为–585.83 kcal/mol,其中真空 静电作用能 ΔG_{ELE} 为–438.33 kcal/mol,范德华作用 能 ΔG_{VDW} 为–147.50 kcal/mol. 另外,非极性溶剂 化能 ΔG_{sa} 为-119.55 kcal/mol,它们都有利于 HdeA 与 SurA 之间的结合.此外,我们还可以将体系的 结合能分为极性相互作用能和非极性相互作用能两 项,极性相互作用能包括真空条件下的静电相互作 用和极性溶剂化能,($\Delta G_{\text{ELE}}+\Delta G_{\text{PB}}$)可以视作 HdeA 与 SurA 之间的静电相互作用,大小为 83.23 kcal/mol; 非极性相互作用能包括范德华作用能和非极性溶剂 化自由能($\Delta G_{\text{VDW}}+\Delta G_{\text{sa}}$),可以视作 HdeA 与 SurA

之间的疏水性相互作用,大小为-267.05 kcal/mol. 由此可以看出,极性相互作用能为正值,不利于 HdeA 与底物 SurA 的结合,而非极性相互作用能 为负值,意味着 HdeA 与底物 SurA 的结合,主要的驱动力来自于疏水相互作用,这与前面结合模式的分析结果相吻合.

Contribution	Receptor	Ligand	Complex	Difference
$\Delta G_{ m VDW}$	-2970.65±4.94	-423.56±2.01	-3541.71±5.08	-147.50±1.50
$\Delta G_{ ext{ele}}$	-29241.47±25.17	-5694.35±10.77	-35374.15±29.62	-438.33±9.74
$\Delta G_{ ext{PB}}$	-4572.76±14.95	-1587.13±8.97	-5638.33±18.59	521.56±8.35
$\Delta G_{ ext{SA}}$	3299.51±2.27	685.57±1.07	3865.53±2.83	-119.55 ± 1.20
$\Delta G_{ m MM}$	-32212.12±23.90	-6117.91±10.63	-38915.86±28.28	-585.83 ± 9.47
$\Delta G_{ m SOL}$	-1273.26±13.41	-901.56±8.90	-1772.81±16.72	402.01±8.22
$\Delta G_{ ext{tot}}$	-33485.38±16.37	-7019.47±4.08	-40688.67±17.46	-183.82±3.72
$T\Delta S$	-80.90±5.38	$\Delta G_{ m bind}$	-102.92	

Table 2 Binding free energy of HdeA-SurA complex (kcal/mol)

2.2.5 HdeA-SurA 复合物体系的能量分解

采用 MM-GBSA 的方法,对 HdeA 中与 SurA 相互作用表面的氨基酸残基进行能量分解. 图 7 给出了 HdeA 中发挥重要作用的氨基酸残基为: LYS10、LYS11、TRP16、ASP20、ASP47、LYS84 和 ILE85. 除了 LYS10,其他几个氨基酸残基均在 HdeA 与 SurA 相互作用的过程中参与形成了氢 键.由此可见,氢键在 HdeA 与底物蛋白结合的过 程中发挥着重要的作用.



Fig. 7 Energetic contributions of key residues in HdeA-SurA complex

由图 7 还可以看出:处于 HdeA 两端的氨基酸 残基,第 10、11、84 和 85 位的氨基酸残基对 HdeA 与 SurA 体系结合能的贡献都比较大,分别是 -21.39 kcal/mol、-22.74 kcal/mol、-23.98 kcal/mol、 -27.86 kcal/mol,并且其中的第 11、84 和 85 位的 氨基酸残基还都与 SurA 形成了多个氢键.根据氢 键分析以及能量分解的结果我们不难看出,处于 HdeA 两端的氨基酸残基在与底物蛋白结合时发挥 了很重要的作用.这可能是因为处于 HdeA 两端的 氨基酸残基柔性较大,使得它们能够根据底物的不同来改变自身的构象从而能够与底物蛋白更好地契合,并且能够形成很稳定的氢键.

由此我们推测:这些氨基酸残基(LYS10、 LYS11、TRP16、ASP20、ASP47、LYS84 和 ILE85)很可能在与其他底物蛋白结合时也发挥着重 要作用.该结果既可以为进行 HdeA 抑制剂的设计 提供理论指导,也可以为今后使用实验手段检测 HdeA 与底物蛋白的结合模式提供重要的参考依据.

3 结 论

HdeA 作为酸性分子伴侣能够保护肠道致病菌 安全地通过胃部的酸性环境,到达肠道从而引发肠 道疾病,因此探究 HdeA 发挥伴侣活性的作用机制 从而抑制 HdeA 的伴侣活性显得尤为重要.本研究 使用分子对接和分子动力学模拟的方法从分子水平 上探究了 HdeA 与底物蛋白 SurA 之间的相互作用 机制,并且计算了二者的结合自由能.通过分析 HdeA-SurA 复合物体系的作用模式、氢键作用以及 能量分解的结果,确定了 HdeA 与底物蛋白 SurA 结合时发挥重要作用的关键氨基酸残基为: LYS10、LYS11、TRP16、ASP20、ASP47、LYS84 和 ILE85.该研究结果为以后采用实验手段探究 HdeA 与底物蛋白之间的作用提供了重要的理论参 考,也为今后设计与开发 HdeA 抑制剂提供了理论 指导依据.

参考文献

- Smith J L. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. Journal of Food Protection, 2003, 66(7): 1292–1303
- Kern R, Malki A, Abdallah J, et al. Escherichia coli HdeB is an acid stress chaperone. Journal of Bacteriology, 2007, 189(2): 603– 610
- [3] Malki A, Le H T, Milles S, *et al.* Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(20): 13679–13687
- [4] Gajiwala K S, Burley S K. HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. Journal of Molecular Biology, 2000, 295(3): 605–612
- [5] Waterman S R, Small P. Identification of σs-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. Molecular Microbiology, 1996, **21**(5): 925–940
- [6] Hong W, Wu Y E, Fu X, et al. Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria. Trends Microbiol, 2012, 20(7): 328-335
- [7] Hong W, Jiao W, Hu J, et al. Periplasmic protein HdeA exhibits chaperone-like activity exclusively within stomach pH range by transforming into disordered conformation. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(29): 27029–27034
- [8] Zhang M, Lin S, Song X, *et al.* A genetically incorporated crosslinker reveals chaperone cooperation in acid resistance. Nature Chemical Biology, 2011, 7(10): 671–677
- [9] Audia J P, Webb C C, Foster J W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. International Journal of Medical Microbiology, 2001, 291(2): 97–

106

- [10] Bardwell J C, Jakob U. Conditional disorder in chaperone action. Trends in Biochemical Sciences, 2012, 37(12): 517–525
- [11] Ahlstrom L S, Law S M, Dickson A, et al. Multiscale modeling of a conditionally disordered pH-sensing chaperone. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(8): 1670–1680
- [12] Lazar S W, Kolter R. SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. Journal of Bacteriology, 1996, **178** (6): 1770–1773
- [13] Wang Y, Wang R, Jin F, et al. A supercomplex spanning the inner and outer membranes mediates the biogenesis of beta-barrel outer membrane proteins in bacteria. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(32): 16720–16729
- [14] Castillokeller M, Misra R. Protease-deficient DegP suppresses lethal effects of a mutant OmpC protein by its capture. Journal of Bacteriology, 2003, 185(1): 148–154
- [15] Bitto E, Mckay D B. Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. Structure, 2002, 10(11): 1489–1498
- [16] Goemans C, Denoncin K, Collet J-F. Folding mechanisms of periplasmic proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2014, 1843(8): 1517–1528
- [17] Thoma J, Burmann B M. Impact of holdase chaperones Skp and SurA on the folding of beta-barrel outer-membrane proteins. Nature Structural & Molecular, 2015, 22(10): 795–802
- [18] Missiakas D, Betton J M, Raina S. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. Molecular Microbiology, 1996, 21(4): 871–884
- [19] Chen J, Brooks C L, Khandogin J. Recent advances in implicit solvent-based methods for biomolecular simulations. Current Opinion in Structural Biology, 2008, 18(2): 140–148
- [20] Mongan J, Case D A, Mccammon J A. Constant pH molecular dynamics in generalized Born implicit solvent. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25(16): 2038–2048
- [21] Chen J, Brooks C L, Khandogin J. Recent advances in implicit solvent-based methods for biomolecular simulations. Current Opinion in Structural Biology, 2008, 18(2): 140–148
- [22] Schirmer T. General and specific porins from bacterial outer membranes. Journal of Structural Biology, 1998, 121(2): 101-109
- [23] Onufriev A, Bashford D, Case D A. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004, 55(2): 383–394
- [24] Onufriev A, Bashford D, Case D A. Modification of the generalized Born model suitable for macromolecules. The Journal of Physical Chemistry B, 2000, **104**(15): 3712–3720
- [25] Adcock S A, Mccammon J A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. Chemical Reviews, 2006, 106(5): 1589–1615

- [26] Colovos C Y T O. Verification of protein structurespatterns of nonbonded atomic interactions. Protein Science, 1993, 2(9): 1511– 1519
- [27] Wiederstein M, Sippl M J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Research, 2007, 35(Web Server issue): W407–410
- [28] Chen R, Li L, Weng Z. ZDOCK: an initial-stage protein-docking algo rithm. Proteins: Structure, Function, and Bioinfomatics, 2003, 52(1): 80–87
- [29] Mashiach E, Nussinov R, Wolfson H J. FiberDock: Flexible induced-fit backbone refinement in molecular docking. Proteins, 2010, 78(6): 1503–1519
- [30] Massova I, Kollman P A. Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. Perspectives in Drug Discovery and Design, 2000, 18(1): 113-135
- [31] Kottalam J C, D. A langevin modes of macromolecules:applications to crambin and DNA hexamers. Biopolymers, 1990, **29** (10-11):

1409-1421

- [32] Sharp K A, Honig B. Electrostatic interactions in macromolecules: theory and applications. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 1990, 19(1): 301–332
- [33] Sitkoff D, Sharp K A, Honig B. Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. The Journal of Physical Chemistry, 1994, 98(7): 1978–1988
- [34] Still W C, Tempczyk A, Hawley R C, et al. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. Journal of the American Chemical Society, 1990, 112(16): 6127– 6129
- [35] Tapley T L, Körner J L, Barge M T, et al. Structural plasticity of an acid-activated chaperone allows promiscuous substrate binding. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(14): 5557–5562
- [36] Wu Y E, Hong W, Liu C, *et al.* Conserved amphiphilic feature is essential for periplasmic chaperone HdeA to support acid resistance in enteric bacteria. Biochemical Journal, 2008, 412(2): 389–397

Simulation Study on The Mechanism of Molecular Chaperone HdeA and SurA*

ZHOU Dan-Dan¹⁾, YU Yan-Qing²⁾, WU Hao¹⁾, LI Yan-Ni^{1)**}, QIAO Jian-Jun¹⁾

(¹⁾ Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Tianjin 300072, China ²⁾ WuXi App Tec (Shanghai) Co., Ltd, Shanghai 200131, China)

Abstract Acid-stress chaperone HdeA and its substrate protein, can contribute to pathogenic-bacteria survival by mutual interactions, when bacteria exposed to extremely acidic conditions. To figure out this mechanisms, molecular docking and molecular dynamics simulation were performed in this paper to investigate the binding mode of SurA to HdeA. MM-PBSA method was used to calculate the binding free energy. The interaction mode, H-bond and energy decompositions of the HdeA-SurA complex were firstly analysed. Based on these analysis, the key amino acid residues which are essential for interactions were subsequently determined. Our results may provide a theoretical guidence for exploring binding mechanism between HdeA and substrate as well as a new strategy for the development of new HdeA inhibitors.

Key words HdeA, molecular chaperone, SurA, molecular docking, molecular dynamics **DOI**: 10.16476/j.pibb.2016.0347

^{*}This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31570049).

^{**}Corresponding author.

Tel: 86-22-27892069, E-mail: liyanni@tju.edu.cn

Received: November 2, 2016 Accepted: February 15, 2017