

Homology modeling of HSPA1L – METTL21A interaction

이승진, Art E. Cho*

[30019] 세종특별자치시 세종로 2511 고려대학교 세종캠퍼스
제1 과학 기술관 617 호,
1

초록 : Heat Shock 70kDa Protein 1-Like(HSPA1L)는 Heat-shock protein70(HSP70) family에 속하는 chaperone protein으로 polypeptide folding, assembly, protein degradation 등 다양한 biological processes에 관여하고 있다. HSPA1L은 human methyltransferase-like protein 21A(METTL21A)에 의해 lysine residue에 methylation이 일어나게 되는데, 암세포에서 일반적인 HSPA1L은 주로 세포질에서 발견되는 반면 methylated HSPA1L의 경우 주로 핵에서 발견이 됨으로써 HSPA1L methylation이 암 세포 성장에 중요할 역할을 할 것이라 추측되며 anti-cancer drug target으로 주목 받고 있다. 하지만 현재 HSPA1L의 구조가 부분적으로만 밝혀져 있어 HSPA1L과 METTL21A가 어떤 residue들이 interaction 하여 binding을 하는지에 대해서 아직 밝혀 지지 않았다. 이로 인해 anti-cancer drug target으로서의 연구에 제한이 있다. 이번 연구에서는 homology modeling(Galaxy-TBM, Galaxy-refine)을 통해 HSPA1L 전체 구조를 밝혀 낸 후, HSPA1L 와 METTL21A를 protein-protein docking을 통해 binding pose 예측을 하였다. 이러한 binding pose를 protein interaction analysis하여 HSPA1L과 METTL21A binding에 관여하는 중요 residue들을 밝혀 냈다. 이러한 structural information은 methylated HSPA1L과 암 세포 성장간의 연관성, 더 나아가 anti-cancer drug 개발로 까지도 이어 질 수 있을 것이라 생각한다.

핵심어: HSPA1L, METTL21A, Galaxy-TBM, Galaxy-refine protein-protein docking

Introduction

HSP70 protein

Heat Shock 70kDa Protein(HSP70)은 ATP-dependent molecular chaperones으로 polypeptide folding, assembly, protein degradation, apoptosis 등 다양한 biological processes에 중요한 protein으로 bacteria에서부터 human까지 모든 organism에 발견되며 매우 conserved하다.¹

HSP70는 unstressed normal cells에서는 매우 낮게

expressed 된다. 그러나 hyperthermia, oxidative와 같은 다양한 stress condition에서는 빠르게 upregulated 되어 대부분의 human cancer cells에서 overexpress된 것이 확인 되었다. Overexpress된 HSP70가 비정상적인 대사 과정을 유발 하여 암세포의 빠른 성장 및 비정상적인 단백질들을 만드는 것으로 알려져 있다.¹ 이러한 이유로 HSP70 inhibition은 preclinical과 clinical trial에서 cancer-target으로 주목 받고 있다.

HSPA1L와 cancer

HSP70 family 중에 하나인 Heat Shock 70kDa Protein 1-Like(HSPA1L)역시 cancer와 관련이 있으며 암

Running Title ((please provide a Running Title))

이외에도 neurodegenerative diseases, cell senescence, Graft-versus-host disease (GVHD)와 관련이 있다고 알려지면서 주목 받고 있다.²

HSPA1L은 HSP70과 마찬가지로 정상 세포에서는 적게 발현하며 cytoplasmic에 localization한다. 그러나 stress condition 특히 암 세포의 경우 HSPA1L의 발현이 증가하게 된다. 이때 증가된 대부분의 HSPA1L은 cytoplasmic에 localization하는 것에 반해 methylated HSPA1L 특히 lysine561-methylated HSPA1L은 nucleus에 localization한다. 이 lysine 561-methylated HSPA1L이 암 세포의 성장과 관련하여 nucleus에서 중요한 역할을 할 것이라 생각 된다.³

Lysine 561-methylated HSPA1L이 암세포 성장에 관여 하는 방법에 대해서 두 가지 추측이 있다. 첫 번째 추측은 이러한 lysine 561-methylated HSPA1L이 aggressive cancers 에서 많이 발견되는 것으로 보아 암세포의 성장을 위한 protein synthesis을 위해 HSPA1L의 chaperone function이 많이 필요하기 때문이다. ⁴ 두 번째 추측은 HSPA1L가 methylation됨으로써 stability에 변화가 생겨 다른 co-factor들과 결합하여 단백질의 기능을 조절 하는 것 이다. 실제로 methylated-HSPA1L가 Aurora Kinase B(AURKB)와 결합하여 AURKB kinase activity를 조절하여 세포주기 진행과 암세포의 성장에서 중요한 역할을 하고 있다고 밝혀졌다.³

HSPA1L methylation을 일으키는 enzyme은 Human Methyltransferase-Like Protein 21A(METTL21A) 으로 HSP70 family에 specific한 enzyme으로 HSP70 conserved lysine residue를 tri-methylate하는 enzyme이다. HSPA1L에서는 lysine 561을 methylation한다. 이런 METTL21A에 의한 Lys-561methylation과 발암과의 관련성은 선행 연구들에서 밝혀 졌다. 특히 breast와 ovarian cancer와 관련성이 높다.^{4,5}

Methylation은 ATP의 존재 유무에 상관없이 일어나지만 ATP가 존재 할 경우 methylation이 더 잘 일어 나게 된다. ATP에 의해 stimulated되긴 하지만

METTL21A-mediated methylation이 HSPA1L의 basal function을 위해 필수적인 것은 아니므로 HSPA1L의 ATPase activity에 영향을 주지 않는다.⁵

HSPA1L structure

HSPA1L은 N-terminal ATPase domain (nucleotide-binding domain, NBD), C-terminal substrate-binding domain (SBD) 두 개의 domain으로 구성되며 allosterically regulate된다. ATP가 ATPase domain에 결합하면 substrate binding domain에서 substrate release를 stimulate한다. 반면 ADP가 결합할 경우 substrate가 강하게 substrate binding domain에 결합한다. SBD는 hydrophobic binding pocket을 형성하는 β -sandwich subdomain(SBD- β)와 binding pocket의 'lid' 역할을 하는 α -helical subdomain(SBD- α)로 나눌 수 있다. Lid는 c-terminal의 3개의 helices로 구성되며 HSPA1L에 ATP가 결합 할 경우 lid가 open되어 있어 peptide의 bind와 release가 상대적으로 빠르게 일어난다. 반면 ADP가 결합해 있을 경우에는 lid가 closed 되며 peptide가 substrate binding domain에 강하게 bound 한다.^{1,6}

Substrate의 binding 과 release cycle을 regulating하기 위해 co-factor들이 추가로 더 필요하다. 이러한 co-factor들은 ATPase activity regulating과 substrate binding을 modulate하며 SBD- α (aa.562-610)에 binding 하여 ATPase cycle동안 NBD and SBD domain의 conformational change 및 allosteric regulation을 한다.⁶

전체 구조가 밝혀진 yeast HSP70(3D2F), E.coil DnaK(2KHO), bovine hsc70(1YUW)와는 달리 HSPA1L(aa1-641)은 부분적으로만 구조가 밝혀져 있다. - NBD(3GDQ, aa 6-384), SBD(4PO2, aa 386-610), SBD(2LMG, aa538-610)

이러한 structural information의 부족으로 인해 HSPA1L의 K561-methylation이 cancer 이외에도 neurodegenerative diseases, cell senescence, Graft-versus-host disease (GVHD)의 diagnostic/prognostic biomarker,

drug target으로 잠재력을 가지고 있지만 관련 연구에 제한이 있다.

이번 연구에서는 homology modeling 을 통해 HSPA1L 의 전체 structure 를 modeling 한 후, HSPA1L 와 METTL21A 의 binding site 와 binding pose 알아 내하고자 한다. 그 후 binding 에 중요한 역할을 하는 residue 들을 밝히고자 한다.

이론 및 계산방법

HSPA1L의 경우 전체 structure가 아닌 NBD crystal structure(3GDQ), SBD crystal structure(4PO2) 가 각각 따로 밝혀져 있다. HSPA1L의 전체구조를 만들기 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 HSPA1L sequence를 다운받아 Galaxy TBM과 Galaxy refine를 이용하여 homology modeling 하였다. 그 후 protein-protein docking을 통해 HSPA1L와 METTL21A의 binding site 와 binding pose를 예측 하였고 protein interaction analysis 통해 HSPA1L과 METTL21A binding에 관여하는 중요 residue들을 밝혀 냈다.

Galaxy TBM

Template Based protein structure predict program으로 총 3단계에 걸쳐서 modeling을 한다.

1. Template protein을 구조데이터베이스(PDB)에서 선택
2. Template protein과 target protein sequence를 alignment한다.
3. Template protein의 3D 구조를 기반으로 target protein sequence를 modeling한다.

Target protein인 HSPA1L sequence(Heat shock 70 kDa protein 1-like [Homo sapiens])을 NCBI에서 fasta format으로 다운 받아 Galaxy TBM으로 입력해 주면 위의 세 단계를 거쳐 modeling된 HSPA1L model이 PDB format으로 출력 된다.

Galaxy refine1

Galaxy refine1은 단백질 구조 정밀화 프로그램으로

이승진 *et al.*

template-based로 생성된 model structure를 정밀화 한다. 초기 구조를 지나치게 벗어나지 않도록 에너지 형태로 제한 한 뒤 단백질 내 상호작용 및 용매화 자유에너지를 표현한 에너지 모델을 이용하여 시뮬레이션 수행하게 된다. 초기 단백질의 곁가지 구조를 Galaxy OptSC로 우선 최적화한 뒤 곁가지를 perturb한 후 짧은 분자 동역학 시뮬레이션으로 relax하는 과정을 반복하여 전체 구조를 정밀화 한다.

HSPA1L sequence와 Galaxy TBM의 output을 input으로 사용하며 Galaxy refine1의 결과로 총 5개의 refine model 생성되었다.

Protein-Protein docking

Homology modelin 통해 얻은 HSPA1L structure와 단백질 구조 데이터베이스인 Protein Data Bank (PDB)에서 다운 받은 METTL21A(4LEC)를 Schrodinger사의 maestro를 사용하여 protein-protein docking을 실행 한 결과 총 30개의 PPD(protein-protein docking) model이 생성되었다.

Protein interaction analysis

Protein- protein docking을 통해 얻은 30개의 PPD model을 Schrodinger사의 maestro를 사용하여 protein interaction analysis를 실행하였다.

결과 및 토의

결론

HSPA1L와 METTL21A(4LEC) interaction 연구를 위해서는 HSPA1L의 전체 구조가 필요 하므로 Galaxy TBM 과 Galaxy refine1를 사용하여 homology modeling 실행 한 결과(Figure1).

Galaxy TBM은 Template Based protein structure predict program으로 query sequence와 template의 amino acid sequence가 비슷하면 3D 구조도 비슷할 것이라고

Running Title ((please provide a Running Title))

가정하고 template의 구조를 기반으로 query sequence를 modeling을 한다. Target protein과 template protein의 amino acid sequence identity가 30% 이상인 경우 비교적 정확한 구조 예측이 가능하다.

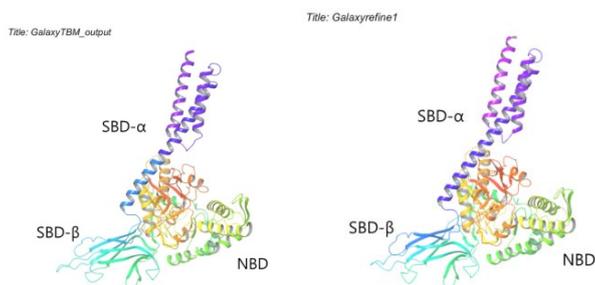


Figure1. 왼쪽 HSPA1L TBM output, 오른쪽 TBM output 의 refine output

Galaxy TBM 을 통해 얻은 model 은 Galaxy refine1 을 이용해 refine 을 해주게 된다. Refine 결과 Galaxy TBM output 과 큰 차이가 없음을 알 수 있다 (Figure1).

Title: GalaxyTBM_output

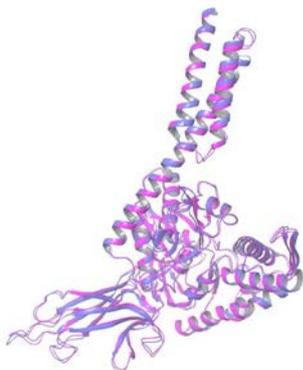


Figure2. HSPA1L TBM output과 refine output superposition. TBM output(purple), refine output(light blue), C-α RMSD = 0.8230_Å

Protein-Protein docking

Homology modeling 통해 얻은 HSPA1L structure와 METTL21A(4LEC)의 binding site 및 pose를 알아보기 위한 과정으로 protein-protein docking을 통해 30개의 PPD model이 생성되었다.

Protein interaction analysis

Protein- protein docking을 통해 얻은 30개의 PPD model에서 두 protein에서 어떤 residue이 interaction에 참여하여 두 protein의 binding에 영향을 주는지를 알아 보기 위해 30개 PPD model의 protein interaction analysis를 실행 하였다. 분석 결과 두 protein에서 interaction에 관여하는 residue간의 distance와 두 protein이 binding할 때 hydrogen bond, salt bridges, pi stacking, disulfides 중 어떠한 interaction이 존재하는지에 대하여 알 수 있다. 그 결과 Salt bridges가 HSPA1L와 METTL21A binding에 중요한 역할을 하며 30개의 model 중 PPD model 1과 PPD model 20이 HSPA1L와 METTL21A(4LEC)의 binding pose로 가장 적합 할 것이라는 예상된다(Figure3).

또한 binding에 중요한 역할을 하고 있을 것이라고 예상되는 residue를 HSPA1L와 METTL21A 각각 에서 알 수 있었다(Figure4).

Title: homology_4LEC_01

Title: homology_4LEC_20

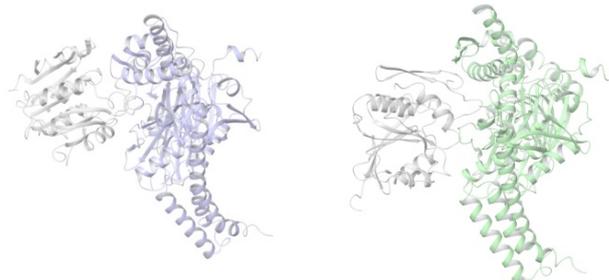
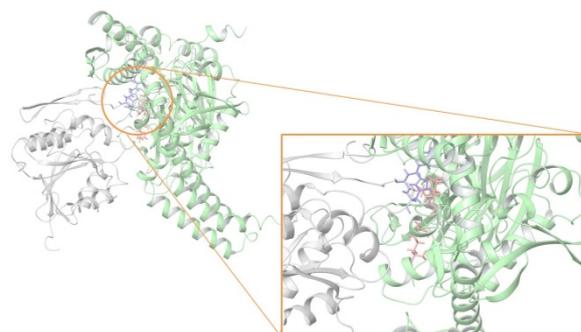


Figure3 PPD model 1 (왼쪽)and PPD model 20(오른쪽) METTL21A(4LEC) – grey, HSPA1L – light blue, light green

(A)



(B)

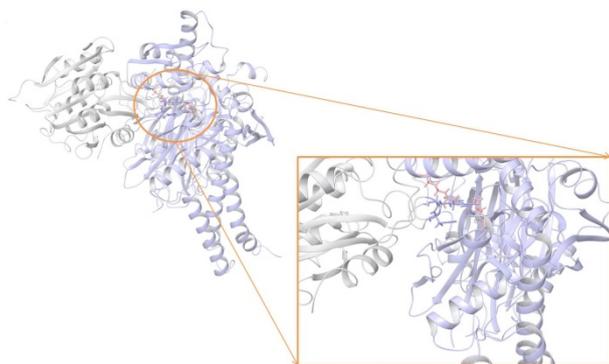


Figure4 HSPA1L-METTL21A interaction

HSPA1L- light green. Blue residue, METTL21A(4LEC) residue, pink residue - HSPA1L residue.

(A) PPD model11- METTL21A(4LEC) – grey, HSPA1L – light blue, (B) PPD model 20- METTL21A(4LEC) – grey,

토의

Chaperones으로 polypeptide folding, assembly, protein degradation, apoptosis 등 다양한 biological processes에 중요한 HSP70이 cancer 및 여러 질병과 관련 있음이 밝혀지면서 drug target으로 연구가 활발히 진행 되자 HSP70 family의 다른 protein들도 질병과의 연관성이 있을 것이라 예상 하였는데 그 중에서도 human HSP70 protein인 HSPA1L의 lysine 561 methylation이 cancer와 높은 상관관계가 있다는 것이 실험을 통해 밝혀졌다. 하지만 정확히 어떠한 경로로 methylation이 일어나며 methylation이 암세포의 생존과 직접적으로 어떤 관련이 있는지에 대해서는 밝혀지지 않았다.

HSPA1L의 lysine 561에 methylation을 일으키는 methyltransferase인 METTL21A은 HSP70에 specific한 enzyme으로 현재 HSPA1L의 methylation이 암에 따라 methylation의 정도가 다르다는 점을 이용하여 bio marker 개발 연구 중이며, cancer-drug target으로도 주목을 받아 methylation inhibitor 개발도 이루어 지고 있다. 이러한 HSPA1L와 METTL21A interaction 연구를 위해서는 정확한 HSPA1L와 METTL21A binding site와 pose 연구가 선행 되어야 하는데 HSPA1L 전체

이승진 *et al.*

구조가 아직 밝혀지지 않았다는 것이 HSPA1L와 METTL21A interaction 연구에 가장 큰 제한 점이다.

이번 연구에는 이런 제한 점을 해결하기 위해 Galaxy TBM과 Galaxy refine1을 이용한 homology modeling을 통해 HSPA1L 전체 구조를 예측 한 후 protein-protein docking을 통해 두 protein의 binding site와 pose를 예측하였다. 그 후 protein-protein docking 결과인 30개의 PPD model를 protein interaction analysis하여 binding에 중요한 역할을 하고 있을 것이라고 예측되는 residue를 HSPA1L와 METTL21A 각각에서 알 수 있었다.

HSPA1L의 NBD, SBD 두 개의 domain으로 이루어져 있으며 NBD는 ATP/ADP가 결합하는 장소이며 SBD-β는 substrate가 결합 하는 hydrophobic binding pocket이 존재 하는데 이곳에서는 최대 8 residue peptide 만이 결합 할 수 있으므로 METTL21A가 binding 할 것이라고 예상한 부분은 SBD-α 지역이다. 그 중에서도 lid 역할을 하며 여러 co- factor 들이 결합하는 3개의 α-helix 지역에 METTL21A에 결합 할 것이라고 예상 하였는데 protein-protein docking 결과 대부분의 model이 예상대로 그 지역에 binding하는 것으로 나왔다.

α-helix 지역 이외 에도 NBD 지역에서도 결합 할 것이라고 예상 되는 model들도 있었는데 그 이유를 예상해 보자면 HSPA1L는 ATP binding form과 ADP binding form의 구조가 다르다. ADP binding form일때는 substrate binding 안정성을 위해 SBD-α의 lid 부분이 SBD-β을 감싸게 되면서 lid 부분이 NBD 부분과 떨어져 상대적으로 확장된 구조를 가지게 된다. 하지만 ATP binding form일때는 conformation change가 일어나서 lid 부분과 NBD 부분이 가까워 지게 된다. 즉, METTL21A이 SBD-α와 NBD 두 지역에 동시에 binding 할 수도 있다. 실제로 METTL21A-mediated methylation의 경우 ATP binding form에서 더 활발히 일어난다. 이 부분에 대한 정확한 결론은 실험을 통해서 밝혀야 할 부분이다.

감사의 말. 이 연구는 EDISON 과제를 통해 지원받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. Pingfeng Zhang^{1,2}, Julia I-Ju Leu^{3*}, Maureen E. Murphy⁴, Donna L. George³, Ronen Marmorstein **2014** Crystal Structure of the Stress-Inducible Human Heat Shock Protein 70 Substrate-Binding Domain in Complex with Peptide Substrate PLOS ONE
2. W isniewska M, Karlberg T, Lehtiö L, Johansson I, Kotenyova T, Moche M, Schüler H **2010** Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78". PLOS ONE 5
3. Hyun-Soo Cho, Tadahiro Shimazu, Gouji Toyokawa, Yataro Daigo, Yoshihiko Maehara, Shinya Hayami, Akihiro Ito, Ken Masuda, Noriko Ikawa, Helen I. Field, Eiju Tsuchiya, Shin-ichi Ohnuma, Bruce A.J. Ponder, Minoru Yoshida, Yusuke Nakamura & Ryuji Hamamoto **2012** Enhanced HSP70 lysine methylation promotes proliferation of cancer cells through activation of Aurora kinase B. nature communication DOI: 10.1038/ncomms2074
4. Magnus E. Jakobsson, Anders Moen, Ben Davidson, Pål Ø. Falnes **2015** Hsp70 (HSPA1) Lysine Methylation Status as a Potential Prognostic Factor in Metastatic High-Grade Serous Carcinoma PLoS ONE 10(10): e0140168. doi:10.1371/journal.
5. Magnus E. Jakobsson, Anders Moen, Luc Bousset, Wolfgang Egge-Jacobsen[‡], Stefan Kernstock, Ronald Melki, and Pål Ø. Falnes **2013** Identification and Characterization of a Novel Human Methyltransferase Modulating Hsp70 Protein Function through Lysine Methylation. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 288, NO. 39, pp. 27752–27763
6. Xue-Chao Gao, Chen-Jie Zhou, Zi-Ren Zhou, Meng Wu, Chun-Yang Cao, and Hong-Yu Hu **2012** The C-terminal Helices of Heat Shock Protein 70 Are Essential for J-domain Binding and ATPase Activation THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 8, pp. 6044–6052