

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.03.03

# DnaK 蛋白扭链残基突变体影响其 ATPase 活性的分子动力学模拟研究

张桥石<sup>1</sup>, 李灌澍<sup>2</sup>, 窦薛楷<sup>2</sup>, 薛友林<sup>3</sup>, 宋有涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 辽宁大学生命科学院, 沈阳 110036;

2. 辽宁大学环境学院, 沈阳 110036;

3. 辽宁大学轻型产业学院, 沈阳 110036)

**摘要:**大肠杆菌分子伴侣蛋白 DnaK 氮端核苷酸结合域(NBD, nucleotide-binding domain)的 II-A 和 II-B 子域之间的一些高度保守的扭链残基突变后(I202A, S203A, G223A, L227A, G228A),其 ATPase 活性也发生变化原因不清楚。我们通过同源建模的方法构建 NBD 与小分子 ATP 相互作用的各蛋白模型,使用分子动力学模拟方法研各模型的结构变化并尝试找出其与 ATPase 活性变化的关系。结果表明,除 L227A 外,所有突变模型 Tyr11 羟基与 ATP- $\gamma$  磷酸基团间的距离与活性变化间具有明显规律;但是所有模型中,能影响与 DnaJ 结合,从而影响 ATPase 活性的  $\beta$ 220(214-221)部分的紧致性变化符合规律,进一步的蛋白对接实验证实了这一点,所以这些扭链残基突变体可能主要是通过这两个部分的变化,引起 ATPase 活性的改变。

**关键词:**DnaK;扭链残基;同源建模;分子动力学模拟;蛋白对接

中图分类号:Q523 文献标志码:A 文章编号:1672-5565(2016)03-139-07

## Using molecular dynamics simulation to study the effects of the ATPase activity in mutants of hinge residues of Dnak

ZHANG Qiaoshi<sup>1</sup>, LI Guanshu<sup>2</sup>, DOU Xuekai<sup>2</sup>, XUE Youlin<sup>3</sup>, SONG Youtao<sup>1,2\*</sup>

(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:** When the highly conserved hinge residues (I202, S203, G223, L227, G228), which are located in the subdomain II-A and II-B of NBD (Nucleotide binding domain) in the *E. coli*'s Dnak, mutate into alanine. It is not clear that the change reason of ATPase activity. We build all of the wild type and mutant protein model which contain small molecule ATP by using the method of homologous modeling, than using the molecular dynamics simulation (MDs) to study the conformational change of these mutants, and want to find the relationship with the change of ATPase activity. Results show that the distances between the hydroxyl of Tyr11 residue and the  $\gamma$  phosphate of ATP in all models except L227A have obvious rules with the activity of ATPase; but the change of compactness in  $\beta$ 220 (214-221), which can impact the binding of DnaJ and effect the activity of ATPase, conform to the rules. The further experiment of protein docking confirm it, so the mutants of hinge residues may influence the ATPase activity by the changes of these two parts.

**Keywords:**DnaK; Hinge residues; Homologous modeling; Molecular dynamics simulation; Protein docking

大肠杆菌 DnaK 蛋白是热休克蛋白 70 (Hsp70, Heat shock protein 70) 家族的重要成员,以分子伴侣

形式发挥作用,帮助新蛋白质的正确折叠,错误折叠和聚集蛋白的重新折叠,调节蛋白的活性控制,细胞

收稿日期:2015-12-16;修回日期:2016-02-19.

基金项目:国家自然科学基金项目(31570154);国家自然科学基金项目(31201285)。

作者简介:张桥石,男,硕士研究生。研究方向:生物信息学、热休克蛋白;E-mail: haxqdkks@hotmail.com.

\* 通信作者:宋有涛,男,教授、博士生导师;研究方向:朊病毒聚集机制、环境化学;E-mail: ysong@lnu.edu.cn.

器和分泌蛋白的跨膜易位等<sup>[1-2]</sup>,而因为 DnaK 在蛋白质内稳态网络中具有的中心作用,对 DnaK 的结构和功能的研究是很有意义和价值的<sup>[3]</sup>。

DnaK 蛋白与其他 Hsp70s 相同,都由一个 N-端高度保守的核苷酸结合功能域和一个 C-端的底物结合功能域(SBD, substrate-binding domain)组成,两者之间可以通过变构作用进行相互调节,相互影响<sup>[4]</sup>。其中,NBD 的结构类似于凝集素和己糖激酶,由 4 个子域组成,分别是 I-A(残基 3-38;112-184),II-A(残基 185-228;310-388),I-B(残基 39-111),II-B(残基 229-309)。这些子域通过两个交叉的  $\alpha$ -螺旋相连接,在子域的中心形成一个包围核苷酸与金属粒子的特定结合口袋,对 ATP 进行水解,而在 NBD 对 ATP 水解时,能够刺激增强 C-端另一功能域 SBD 部位的底物亲和能力,从而降低 SBD 的底物交换率,影响 Hsp70 发挥伴侣活性与帮助蛋白重折叠等功能,所以研究核苷酸结合功能域对 ATP 的水解能力,即 ATPase 活性,对研究 Hsp70 的各种功能有重要意义<sup>[5-6]</sup>。

之前,Peter 等人的研究指出,DnaK 蛋白中位于 NBD 的 II-A 和 II-B 之间的一些在域间通信中起扭链作用的残基,在变构调节中发挥重要作用<sup>[7]</sup>,他们选出一些重要的扭链残基(见图 1),对其进行突变后,发现其 ATPase 活性发生了变化。其中,突变体 S203A、G228A 的 ATPase 活性增强,突变体 I202A、L227A 的 ATPase 活性减弱,突变体 G223A 和 WT 的 ATPase 活性基本一致。但是,Peter 等人并没有从分子水平去探讨扭链残基突变体 ATPase 活性变化的原因,对 DnaK 蛋白中扭链残基突变与 ATPase 活性变化之间的关系研究仍不太清楚,尚需进一步研究。另外,McKay 等人研究发现牛 Hsc70 (Heat shock cognate 70 protein)的 T13 位点(同源于 DnaK 蛋白 T11)的自身磷酸化与 ATPase 活性有重要关系<sup>[8]</sup>,并且 T13 侧链的羟基对 ATPase 活性有重要作用<sup>[9]</sup>。此外,Chiappori 等人研究 Hsp70 与 Hsp40 相互作用时发现,DnaK 蛋白中  $\beta$ 220 (214-221)部位的紧致性对 ATPase 活性也有重要影响,这部位结构越紧致,越容易与 DnaJ 蛋白的 J 结构域相结合,从而促进 ATP 的水解<sup>[15]</sup>,并且  $\beta$ 220 与这些突变的扭链残基位于同一部位上,这些扭链残基突变后,可能使相连的  $\beta$ 220 部位的紧致性产生了改变,从而使其与 DnaJ 蛋白 J 结构域相互作用情况发生改变,影响 DnaJ 对 ATP 的水解刺激作用,影响 ATPase 活性,而我们的模拟结果也证实了这一点。

本研究不仅是对 Peter 等人生化试验数据进行分子动力学上的解释,也是对 Chiappori 等人研究结果的

进一步验证,对后续其他 Hsp70 蛋白家族中氮端 NBD,特别是扭链残基的研究具有重要的借鉴与指导意义。

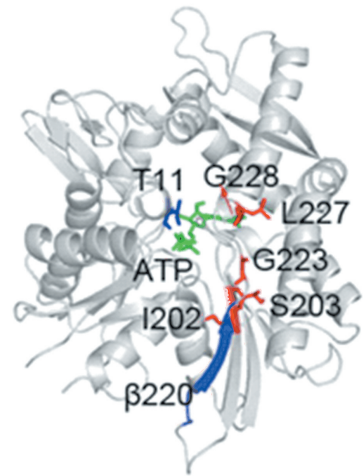


图 1 WT 模型平衡后构象展示及各扭链残基与重要部分  
Fig.1 The show of WT models and the hinge residues and important parts after equilibrium

## 1 实验过程

### 1.1 蛋白质来源及同源建模

本研究采用 RCSB 蛋白数据库中大肠杆菌 DnaK 蛋白经典核苷酸结合域模型(PDB 编号 1DKG: D)<sup>[10]</sup>,并参考与 DnaK 蛋白同族的包含有小分子 ATP 的 Hsp70 与 ATP 结合状态模型(PDB code:4B9Q: A)为模板<sup>[11]</sup>,通过同源建模软件 Modeller9v8 构建 DnaK 蛋白 NBD-ATP 结合状态的 WT 与突变体 I202A、S203A、G223A、L227A、G228A 三维结构模型。所有结构模型均使用 Procheck 对其合理性进行了评估。

### 1.2 动力学模拟过程

分子动力学模拟均在 GROMACS 4.5.5<sup>[11]</sup> 软件包下完成,模拟体系 DnaK 蛋白核苷酸结合域直接使用 GROMOS96 43a1 力场<sup>[12]</sup>,小分子 ATP 使用 PRODRG2 服务器(<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg>)添加基于 GROMACS 的小分子 ATP 的力场<sup>[13]</sup>。然后将蛋白配体模型溶于约包含 26 186 个 SPC216 水分子的立方体盒子中,蛋白边缘与盒子边缘的最小距离为 1.0 nm。采用 LINCS (linear constraint solver)算法对体系中所有键长进行约束。范德华力通过 LJ 势(Lennard-Jones potential)方法进行估算,截断半径为 1.0 nm。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。体系采用 NPT 系综,温度和压力通过采用 V-rescale 和 Parrinello-Rahman 算法分别维持在 300 K 和 1 bar,pH 为 7.0。体系中

加入  $\text{Na}^+$  或  $\text{Cl}^-$  中和多余电荷,中和后的中性体系先进行 2 000 步的能量最小化,然后进行 80 ps 的限制性模拟。最后各体系在恒定的温度和压力下进行 10 ns 分子动力学模拟。分子的运动轨迹每 4 ps 保持一次,用于后续的数据分析。

### 1.3 蛋白对接

本模拟利用 PatchDock 网站服务器进行蛋白-蛋白对接实验<sup>[14]</sup>,DnaJ 模型使用(PDB 编号 1XBL:A),相应结合位点根据 Chiappori 等人文献中确定<sup>[15]</sup>,其他设置默认,然后与平衡后各模型分别进行对接,根据打分函数对结果进行相应排序,用网站上后续工具 FireDock 评测其中最优的 10 个构象结合所需的结合能<sup>[17]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结构稳定性

RMSD (Root mean square deviation, 均方根偏差) 是评价蛋白质稳定性的一个重要参数,通过比较 RMSD 曲线我们发现各模型在 7ns 后均达到结构保持稳定的平衡状态(见图 2)。

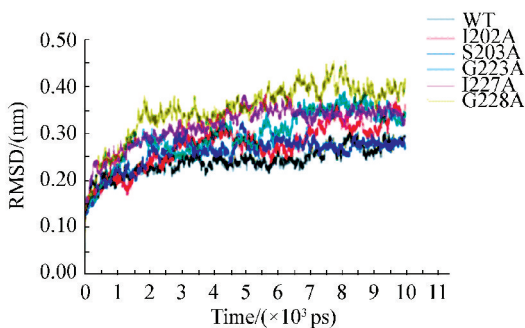


图 2 NBD 主链的 RMSD\*

Fig.2 The RMSD values of the backbone of NBD

注: \*彩图见电子版(<http://swxxx.alljournal.cn/ch/index.aspx>) (2016年第3期 doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.03.03)。

其中除 S203A 外,所有突变体的 RMSD 波动都比较大,但活性增强突变体 S203A 其实在 5-7ns 时波动也较野生型大,平衡后构象也与野生型也有很大差别(见图 3)。这说明所有突变体与野生型相比,其构象都发生了一定变化。平衡过程中,各模型的整体 RMSD 值,分别如下: WT(0.24 nm), I202A(0.27 nm), S203A(0.26 nm), G223A(0.30 nm), L227A(0.32 nm), G228A(0.35 nm), 并且 RMSD 值明显随扭链残基所在部位不同,呈现分级趋势,202 位点与 203 位点,虽然 ATPase 活性变化相反,但两位点却相邻在一起,而 223、227、228 这三个位点 RMSD 值比其他都大,它们也都在另一相连部位(见图 3)。从这可以看出,突变不同部位的扭链残基,

其引起的波动程度也是有差别的。而为什么活性基本不变的突变体 G223A 的 RMSD 波动也非常大,可能是其引起波动的部位与 ATPase 活性无关或者影响作用被抵消的原因,这需要进一步研究。



图 3 野生型 WT 与活性增强突变体 S203A 平衡后三维构象对比

Fig.3 The comparison of three-dimensional conformation between WT and the positive mutant S203A after equilibrium

### 2.2 平衡过程中 NBD 与 ATP 相互作用分析

ATP 与 NBD 间的相互作用是影响 DnaK 蛋白 ATPase 活性变化的直接原因之一,主要有氢键、盐桥、疏水作用,结果如下(见表 1),其中 G223A 突变体活性虽然与野生型差不多,但与 ATP 相互作用是增强的,尤其是 G223A 的氢键作用是远远强于其他突变体的,NBD 与 ATP 间相互作用结果并没有什么明显的规律。

不过进一步查看 NBD 与 ATP 间氢键作用存活时间发现(见图 4),影响 ATPase 活性的重要残基 T11 与 ATP 之间的氢键作用具有明显规律。活性不变突变体 G223A 虽然整体与 ATP 氢键较多,但其 T11:ATP 只有一条(100%),与野生型的类似 T11:ATP(98%),活性减弱突变体 I202A 没有 T11:ATP 的氢键,而 L227A 只有一条 T11:ATP(92%),但存活时间比野生型弱,这可能与活性减弱有一定关系。并且活性增强突变体 S203A、G228A 都具有两条强 T11:ATP 的氢键,S203A 的两条还强于 G223A 突变体的,ATPase 活性规律符合,这很可能是影响扭链残基突变体活性变化的重要原因。



表 1 模拟过程中各模型 NBD 与 ATP 间相互作用结果

Table 1 The results of interaction between NBD and ATP in all the models during MDs

	WT	I202A	S203A	G223A	L227A	G228A
ATPase 活性 * [7]	11.2±0.2	7.4±0.6	20.8±0.2	11.5±0.2	8.4±0.9	18.5±0.6
氢键数目	8.45	6.12	8.72	10.99	7.32	9.06
盐桥数目	4.00	5.00	5.00	5.00	6.00	5.00
疏水数目	60.00	72.75	68.25	62.50	57.00	52.00

注: \* Peter 等人的 ATPase 活性实验结果。单位  $\mu\text{M P}_i/\mu\text{g DnaK/hr}$ 。

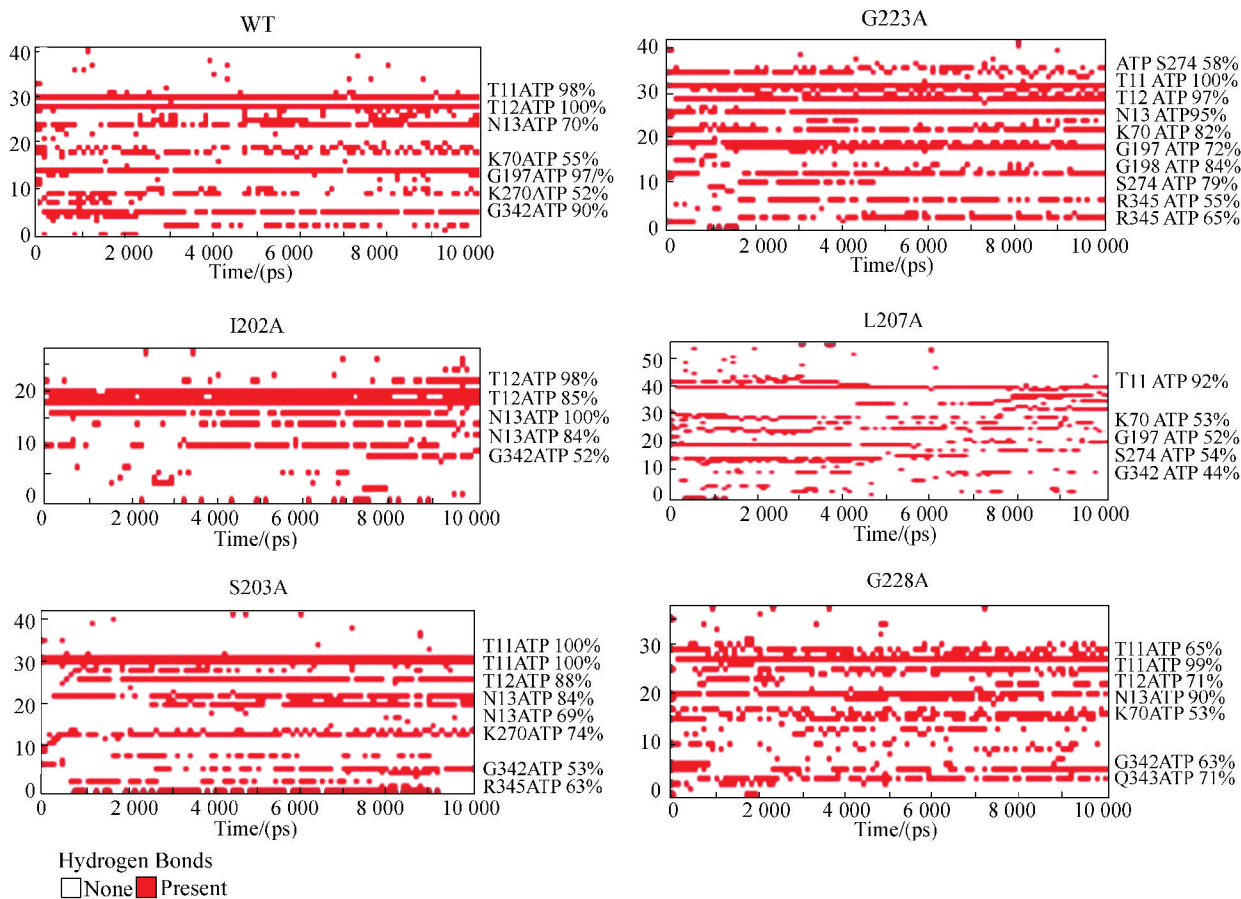


图 4 模拟过程中 NBD 与 ATP 间氢键存活时间

Fig.4 The Hydrogen bond existence map of NBD and ATP during MDs

## 2.2 重要位点 T11 与 ATP 距离和相互作用分析

进一步根据 McKay 等人的研究,提取 T11 与 ATP 残基的距离发现(见图 5a),活性减弱突变体 I202A、L227A 的 T11 在整个模拟过程中,与野生型和活性增强、活性不变突变体相比,T11 明显的远离了 ATP,使其更难与 ATP 相互作用,这可能是其与 ATP 间氢键作用减弱的主要原因。

而继续提取 T11 的羟基与 ATP 的  $\gamma$ -磷酸基团间的距离(见图 5b)发现,扭链残基突变体 T11 距离的变化与 ATPase 活性间的关系更加明显,其平衡过程中的 T11:ATP 平均距离如下:WT(0.43 nm),活性增强突变体 S203A(0.40 nm)、G228A(0.39 nm),

活性减弱突变体 I202A (0.59 nm)、L227A (0.45 nm),活性基本不变突变体 G223A(0.42 nm)。活性增强突变体的 T11 羟基与 ATP 的  $\gamma$ -磷酸距离变近,更易接触,形成更多的氢键作用;活性减弱突变体间的 T11 羟基与 ATP 的  $\gamma$ -磷酸距离变远,更难接触,形成较少或没有氢键作用,虽然 L227A 的距离增大并不太明显,氢键结果也显示了这一点,只是稍微减弱,可能还有其他影响 L227A 的 ATPase 活性变化的原因;另外,活性基本不变突变体 T11 羟基与 ATP 的  $\gamma$ -磷酸距离稍微减小,基本不变,氢键作用强弱也不改变,对 ATP 的水解活性也基本不变,在一定程度上能说明 Peter 等人的生化实验结果。

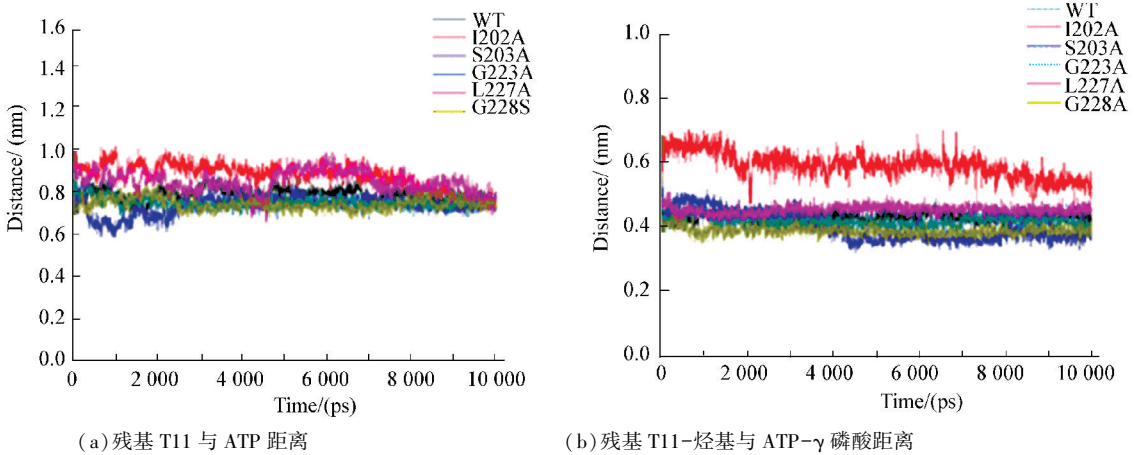


图5 重要位点 T11 与 ATP 距离\*

Fig.5 The distance of important loci T11 and ATP

注: \* 彩图见电子版 (<http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx>) (2016 年第 3 期 doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.03.03)。

### 2.3 扭链残基周围与 ATPase 活性相关重要部位 $\beta$ 220 紧致性分析

进一步查阅文献, Chiappori 等人的研究表明, DnaK 的  $\beta$ 220 (214-221) 部分紧致性能影响与 DnaJ 结合, 从而影响 ATPase 活性<sup>[15]</sup>, 而扭链残基都与  $\beta$ 220 部分相连, 推测是不是这些扭链残基突变后, 从而影响了相连的与 DnaJ 结合  $\beta$ 220 部分发生改变, 从而造成 ATPase 活性发生变化。

而蛋白质结构的紧致性可以通过其  $R_g$  (Radius of gyration, 回旋半径) 来分析<sup>[16]</sup>,  $R_g$  越大, 表明其紧致性越低, 通过提取各模型在模拟过程中  $\beta$ 220 的  $R_g$  发现 (见图 6), 活性减弱突变体 I202A、L227A 的  $R_g$  增大很多, I202A (0.51 nm)、L227A (0.51 nm), 其  $\beta$ 220 部位紧致性降低, 其中, I202A 的  $R_g$  在整个模拟过程中都比 WT 高很多, L227A 的  $R_g$  在平衡过程中急剧升高, 最后体系平衡后, 活性减弱突变体的  $R_g$  都保持在一个很相似的程度, 这也表明, 平衡之后的  $R_g$  值可能更准确。另外如图 5 所示, 平衡过程中, 活性基本不变突变体 G223A 与 WT 的  $R_g$  保持一致 G223A (0.48 nm)、WT (0.48 nm), 而活性增强突变体 S203A、G228A 的  $R_g$  减小, S203A (0.47 nm)、G228A (0.47 nm), 紧致性增强, 可见, 与突变点相连的  $\beta$ 220 部位的紧致性在 ATPase 活性变化中具有一定的规律, 与最后 ATPase 活性变化结果符合, 故扭链残基突变后, 可能也通过引起相连的  $\beta$ 220 部位紧致性发生改变, 从而影响与 DnaJ 的结合, 影响了 ATPase 的活性, 对 T11 羟基与 ATP 的  $\gamma$ -磷酸距离变化规律形成补充, 共同影响造成最后 ATPase 活性变化结果。

### 2.4 蛋白-蛋白对接与结合能分析

通过 PatchDock 网站进行 DnaK 与 DnaJ 对接,

结果见图 7, 以对接后得分最高构象为例, DnaK 与 DnaJ 对接后, 野生型与活性基本不变突变体 DnaK 和 DnaJ 间的平均距离差别不大, WT (10.6 nm)、G223A (10.7 nm), 活性减弱突变体与 DnaJ 的平均距离增大, I202A (11.4 nm)、L227A (11.7 nm), 活性增强突变体与 DnaJ 的平均距离减小, S203A (9.2 nm)、G228A (9.5 nm), 这一结果能在一定程度上反应 DnaK 与 DnaJ 蛋白作用情况, 但两蛋白之间相互作用距离只是反映其相互作用强弱的一个方面, 进一步对大范围各模型与 DnaJ 对接结果进行分析, 主要是能直接反应相互作用情况的平均所需结合能的分析 (见表 2)。

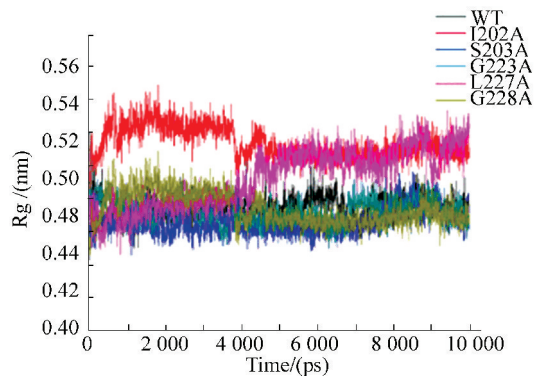


图6 模拟过程中  $\beta$ 220  $R_g$  随时间的变化\*

Fig.6 Time dependence of the  $R_g$  in region  $\beta$ 220 during MDs

注: \* 彩图见电子版 (<http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx>) (2016 年第 3 期 doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.03.03)。

发现其中所有突变体都比野生型形成更多构象, DnaK 与 DnaJ 接触面积增加, 虽然活性减弱突变体反而倾向形成最多的构象, I202A (638 个)、L227A (622 个), 远远多于其他突变体。不过进一步的结合所需能量结果发现, 活性减弱突变体虽然倾向形成更多构象, 但其结合所需能量远远高于其

他突变体,更难与 DnaJ 结合,影响 DnaJ 刺激 ATP 水解。而活性不变突变体 G223A 所需结合能显示

与野生型相差不多,活性增强突变体 S203A、G228A 所需结合能量比野生型减少,更有利于结合。

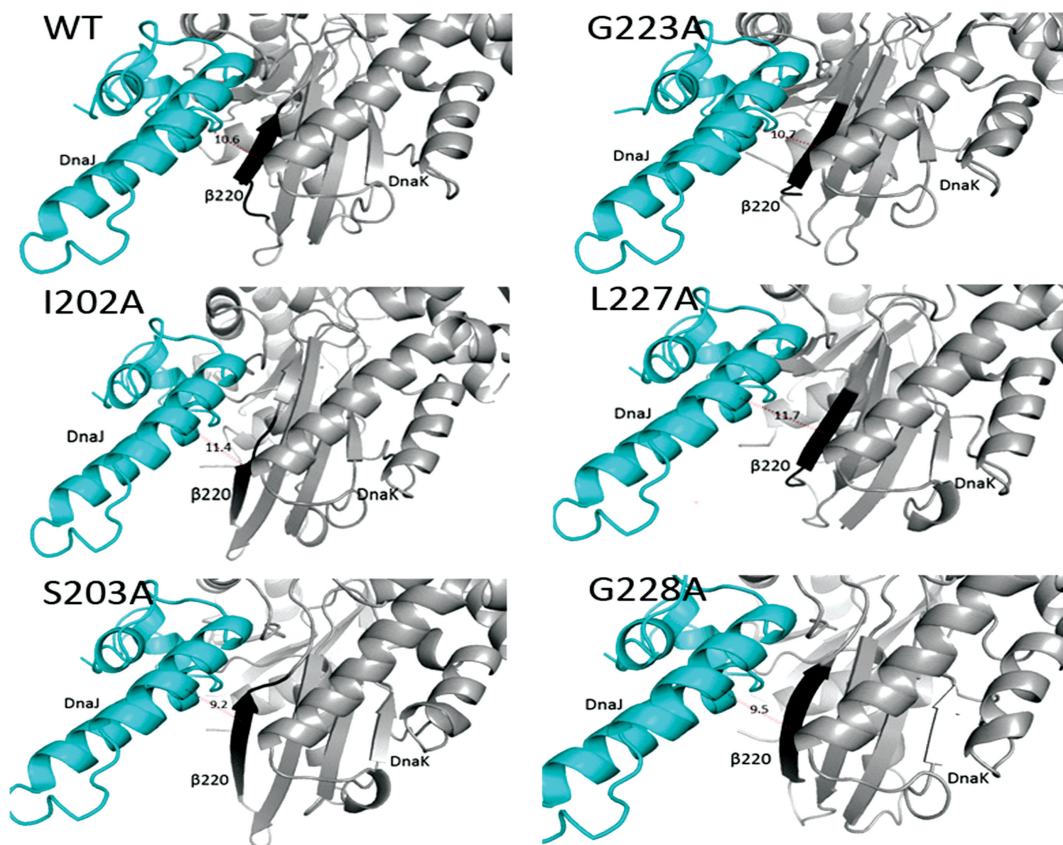


图 7 各 DnaK 模型与 DnaJ 蛋白对接后得分最高构象及平均距离展示

Fig.7 The highest score conformation after DnaK model docking with the DnaJ and the average distance

表 2 蛋白对接结果统计

Table 2 The statistical results of protein docking

突变体	构象数量/个	构象平均得分 (前 10 个)	平均接触面积/( $\text{nm}^2$ ) (前 10 个)	平均所需结合能/( $\text{kcal.mol}$ ) (前 10 个)
WT	254	8 795	1 279	19.52
I202A	638	9 626	1 331	112.24
S203A	404	9 921	1 436	10.08
G223A	368	9 455	1 356	19.69
L227A	622	9 961	1 498	66.38
G228A	354	8 965	1 315	18.86

这说明突变体的紧致性变化的确会影响其与 DnaJ 的结合情况,从而影响 ATPase 活性变化。至于为什么活性减弱突变体倾向形成最多的突变体,这可能与其  $\beta 220$  下面部分形成更多的  $\beta$  片层有关。另外,也不排除  $\beta 220$  及其相连部位也是 NBD 向 SBD 域间信号传递的重要扭链区域之一,将核苷酸信号改变通过一系列扭链区域作用传递到域间 linker 和 SBD 中<sup>[7]</sup>,那么反过来, $\beta 220$  及其相连部位扭链的结构改变,如紧致性、 $\beta$  片层程度变化,也可能对 ATPase 活性产生直接影响,但具体是怎样影响和传递的,本实验还没有找到明确规律,尚需要进一步的研究。

### 3 结论

通过分子动力学模拟的实验数据可知,活性增强突变体 S203A、G228A 突变引起 ATPase 活性区域重要残基 T11 的羟基与 ATP 的  $\gamma$ -磷酸基团靠近,使 ATP 更容易与 T11 发生反应,提高 ATP 水解速率,从而增强 ATPase 活性;活性基本不变突变体 G223A 突变没有使 T11 羟基与 ATP 的  $\gamma$ -磷酸基团距离发生改变,从而使 ATP 水解速率与野生型时一样,不改变 ATPase 活性;活性减弱突变体 I202A 突变使 T11 的羟基与 ATP 的  $\gamma$ -磷酸基团远离,使 ATP 更难



与 T11 发生作用,从而降低 ATP 水解速率,降低 ATPase 活性,L227A 虽然远离的不明显,但其与突变残基相连的  $\beta$ 220(214–221) 部位的紧致性降低,所需结合能增大,难与 DnaJ 结合,从而影响了其 ATPase 活性。另外,活性增强突变体 S203A、L227A 突变使相连的  $\beta$ 220 的紧致性增强,更易结合,所需结合能减小。活性基本不变突变体 G223A 紧致性与所需结合能结果也与 ATPase 活性结果相符,所以,扭链残基突变体很可能是通过突变引起 T11 部分与  $\beta$ 220 部分结构改变,从而影响了其 ATPase 活性的。

本研究为我们从分子水平上解释 Peter 等人的生化实验结果提供了数据支持,同时也从分子水平对 McKay 等人研究发现的牛 Hsc70 的 T13 位点(同源于 DnaK 蛋白 T11)侧链的羟基对 ATPase 活性有重要影响在 DnaK 中进行了验证,另外,也对 Chiappori 等人研究发现的 DnaK 蛋白中  $\beta$ 220(214–221) 部位的紧致性对 ATPase 活性也有重要影响的结果进行了进一步的验证,对后续的 Hsp70 家族 NBD 部分突变及机制的研究有重要的借鉴作用。

## 参考文献(References)

- [1] MCCLELLAN A J, TAM S, KAGANOVICH D, et al. Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations [J]. *Nature Cell Biology*, 2005, 7(8): 736–741.
- [2] ALBANÈSE V, YAM A Y W, BAUGHMAN J, et al. Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells[J]. *Cell*, 2006, 124(1): 75–88.
- [3] PATURY S, MIYATA Y, GESTWICKI J E. Pharmacological targeting of the Hsp70 chaperone[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2009, 9(15): 1337.
- [4] GOIÀSE, MAISURADZE G G, SENET P, et al. 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.
- [5] MAYER M P, BUKAU B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62(6): 670–684.
- [6] HARTL F U, HAYER-HARTL M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(6): 574–581.
- [7] UNG P M U, THOMPSON A D, CHANG L, et al. Identification of key hinge residues important for nucleotide-dependent allostery in *E. coli* Hsp70/DnaK[J]. *PLOS Computational Biology*, 2013, 9(11): e1003297.
- [8] CHANG L, THOMPSON A D, 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] SOUSA M C, MCKAY D B. 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.
- [10] HARRISON C J, 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] KITYK R, KOPP J, SINNING I, et al. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones[J]. *Molecular Cell*, 2012, 48(6): 863–874.
- [12] GUEX N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714–2723.
- [13] SCHUËTTTELKOPF A W, VAN AALTEN D M F. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2004, 60(8): 1355–1363.
- [14] SCHNEIDMAN-DUHOVNY D, INBAR Y, NUSSINOV R, et al. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(suppl 2): W363–W367.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] MASHIACH E, NUSSINOV R, WOLFSON H J. FiberDock: a web server for flexible induced-fit backbone refinement in molecular docking [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(suppl 2): W457–W461.