

DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.20160715001

Ydj1p 锌指结构突变体对底物结合影响的分子动力学模拟分析

刘冠宏¹, 孙玉娜², 张桥石², 薛友林³, 宋有涛^{1,2*}

(1.辽宁大学 环境学院, 沈阳 110036; 2.辽宁大学 生命学院, 沈阳 110036; 3.辽宁大学 轻型产业学院, 沈阳 110036)

摘要: Ydj1p 是酵母细胞质中一种主要的 I 型 Hsp40 分子伴侣, Ydj1p 锌指结构在传递底物给 Hsp70 时发挥重要的作用, 锌指结构域的两个锌离子结合位点区域 (ZBD I 和 ZBD II) 与半胱氨酸形成配位键对底物传递中维持结构稳定非常重要。本研究通过分子动力学手段对 Ydj1p 与各锌指结构突变体进行了模拟, 分析 ZBD I 突变体关键残基 C143S、C201S, ZBD II 突变体关键残基 C162S、C185S 的突变影响 Hsp40 与 Hsp70 的底物传递。分析结果表明, 当锌指部位的氨基酸发生突变, 不仅能影响 Ydj1p 的结构稳定性, 也能影响底物的传递, 并且锌指结构 I 突变体和锌指结构 II 突变体之间也具有明显差异。通过结合能量的分析以及构象变化比对, 揭示了 Ydj1p 以及各锌指结构突变体底物结合能力的强弱, 这与生化实验研究了 Ydj1p 锌指结构与 Hsp70 合作, 帮助多肽传递的功能是至关重要的结果较为相近。

关键词: Ydj1p; 锌指结构; 突变体; 底物结合; 分子动力学模拟

中图分类号: Q523 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2017)02-090-07

Using molecular dynamics to study the effects of Zinc mutant of Ydj1p to the binding of substrate

LIU Guanhong¹, SUN Yuna², ZHANG Qiaoshi², XUE Youlin³, SONG Youtao^{1,2*}

(1. School of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China;

2. School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China;

3. College of Light Industry, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: Ydj1p is a major kind of I type Hsp40 molecular chaperone in yeast cytoplasm. Zinc finger structure plays a significant role in transmitting substrates to Hsp70. The two zinc binding sites region (ZBD I and ZBD II) in the zinc finger domain can form a coordination bond with cysteine, which is important for maintaining structural stability during the substrate transfer process. In this paper, Ydj1p and the various zinc structural mutants are studied by using the method of molecular dynamic simulation. How the mutations that take place in ZBD I mutant key residues C143S, C201S and ZBD II mutant key residues C162s, C185S affect the substrate transfer between Hsp40 and Hsp70 are also analyzed. The results show that mutations in the amino acids in zinc finger sites not only affect the structural stability of Ydj1p, but also affect the substrate transport. Moreover, there are also significant differences between zinc finger type I mutants and zinc finger structure II mutants. It reveals how about the combining capacities of Ydj1p with the various zinc finger structure mutant substrates through the analysis of binding energy and the contrast of conformation changes are. The simulated result is similar to the results of the biochemistry experiments that the cooperation of Ydj1p zinc finger structure and Hsp70 is crucial to help peptide transfer function.

Keywords: Ydj1p; Zinc binding domain; Mutants; Substrate binding; Molecular dynamic

收稿日期: 2016-07-15; 修回日期: 2016-10-18.

基金项目: 国家自然科学基金 (31570154, 31201285).

作者简介: 刘冠宏, 女, 硕士研究生。研究方向: 生物信息学, 环境化学; E-mail: 418775689@qq.com.

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

Hsp40 在原核细胞和真核细胞中广泛存在,它作为 Hsp70 的辅助伴侣可以与 Hsp70 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^[1-2]。Ydj1p 是 Hsp40 分子伴侣家族成员之一,通过调节 Hsp70 的 ATP 酶活性结合展开多肽促进蛋白正确折叠。Ydj1p 也可单独发挥其生物学功能,能够识别并结合错误折叠的蛋白使其重新展开,起到抑制蛋白聚集的作用, Hsp40 重新展开的多肽片段传递给 Hsp70 折叠成有生物活性的蛋白质^[3-4]。

锌指结构是由若干保守的氨基酸残基同锌离子结合,形成相对独立的“指”状四面体结构,这一结构最早由 Miller 等^[5] 1985 年在非洲爪蟾转录因子 TF III A 中发现。锌指结构域含有两个锌离子结合位点(ZBD I 和 ZBD II)与半胱氨酸形成配位键维持结构稳定。生化实验表明,Ydj1p 锌指结构有助于 Hsp70 捕获多肽底物,锌指 I 和 锌指 II 突变不改变 Ydj1p 结合化学变性荧光素酶的能力。因此蛋白折叠的缺陷可能是在 Ydj1p 结合多肽之后,ZFLR 的功能可能是帮助多肽从 Ydj1p 到 Hsp70 的传递^[6],这个发现与之前报道一致。蛋白折叠依赖于锌指 I 和锌指 II 的原因之一是 Hsp70 需要它们来转移非本地多肽。

锌指 I C143S 和 锌指 II C162S 突变,失去刺激 Hsp70 与底物结合的能力。锌指 II 突变呈现温度敏感型生长缺陷,但是锌指 I 突变体没有这种现象,热激条件下 C143S 有功能与 Hsp70 结合抑制荧光素酶聚集而且与野生型相似,C143S 有部分生物学功能可以保护高温下的细胞^[7]。相反 C162S 不能抑制荧光素酶聚集,C162S 在高温下不能生长,原因是高温使蛋白变性。因此,锌指 II 对于酵母高温下生存是至关重要的,与 Hsp70 合作抑制热压力导致的蛋白聚集^[8]。这一现象反映了锌指结构 I 和 II 在作为分子伴侣功能上的差异,但是从分子水平无法解释产生这一现象的原因。所以本文通过分子动力学手段模拟 Ydj1p 以及各突变体,对模拟后的数据进行进一步分析找到不同突变体差异的原因^[9-10]。

1 计算方法与条件

1.1 突变体模型构建

采用 RCSB 蛋白数据库中酵母 Ydj1p 部分晶体结构(PDB:1NLT)为模型,通过 Swiss-Pdb 突变软件以上述模型为模板构建突变体 C143S、C162S、C185S、C201S 模型如图 1 所示。



图 1 Ydj1p 结构图及锌指一区域 Cys-201, Cys-143 和 锌指二区域 Cys-162, Cys-185 局部图

Fig.1 The structure of Ydj1p and the side chains for Cys-201 and Cys-143 in zinc-binding domain (ZBD) I and Cys-162 and Cys-185 in ZBDII are depicted

1.2 分子动力学模拟

利用分子动力学模拟软件 Gromacs 4.5.5 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^[11]。

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 应接近中性^[12-13],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^[14]。

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 80×10^{-12} s 的限制性模拟。

6) 最终动力学模拟。达到上述平衡之后,各体系在恒定的温度和压力下进行 10×10^{-9} s 的分子动力学模拟。分子的运动轨迹每 4×10^{-12} s 收集一次,以便用于后续的数据分析^[15-17]。

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”^[18]方法对体系温度和压力进行控制,耦合常数分别为 0.1×10^{-12} s 和 0.5×10^{-12} s。模拟的时间积分步长为 2×10^{-15} s,整个体系使用周期性边界条件,采用 LINCS^[18](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。

1.3 拉伸分子动力学模拟

取模拟后的平衡结构作为拉伸动力学的初始结构,采用 GROMACS 恒速拉伸动力学算法进行计算。拉伸过程中采用的弹簧系数为 $300 \text{ kJ}/(\text{mol} \cdot \text{nm})$,拉伸速度为 $0.002 \text{ nm}/\text{s}$,拉伸方向为 Y 轴方向。拉伸过程中底物七肽沿着结合口袋延伸的方向拉出。分子的运动轨迹每 0.1×10^{-12} s 保持一次,拉伸时间为 2×10^{-9} s^[19-20]。

1.4 模拟结果分析软件

通过 GROMACS 软件包内置模块完成,所有的三维结构图像通过 Pymol 软件呈现。均方根偏差 (root mean square deviations, RMSD) 计算了蛋白质所有 C α 在模拟过程中的偏移程度。氢键估算键长为 0.35 nm ,键角为 300° 。疏水相互作用的强弱使用 Ligplot+软件计算^[23]。

2 结果分析

2.1 突变体稳定性分析

差异均方根 (root mean square deviation, RMSD) 值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的碳原子之间的距离,它是用来衡量模拟过程中蛋白是否达到稳定结构的重要参数。该值的大小直接反映了不同时刻蛋白构象与初始构象的差异程度^[27-30]。当 RMSD 值趋于恒定时可以认为该蛋白构象稳定,相对值越低的 RMSD 对应的蛋白质结构越稳定。如图 2 所示,ZBD I 突变体 C143S、C201S 的 RMSD 值与野生型相似,而 ZBD II 突变体 C162S、C185S 的 RMSD 值与野生型相比略高,在模拟了 7×10^{-9} s 之后各突变蛋白基本达到稳定。由数据结果可知,C143S、C201S 突变体在模拟过程中结构变化不大,而 C162S、C185S 结构变化较大,一方

面,ZBDI 位于 CTDI 和 ZFLR 之间,ZBDI 单点突变有增加结构的灵活性的可能性,但可能不显著影响整体 ZFLR 结构。ZBDII 位于在 ZFLR 的中间,由氨基包围具有相对高的 B-因子酸,根据数据推测 ZBD I 结构可能比 ZBD II 结构更稳定。

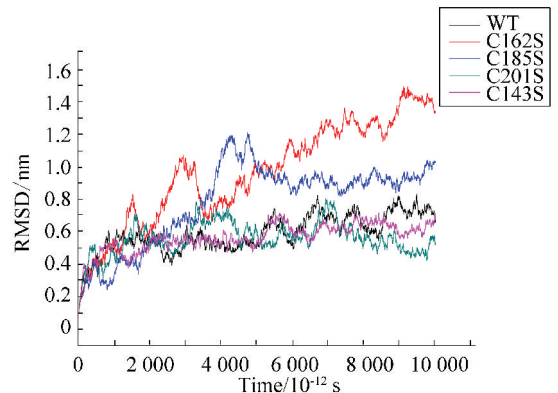


图 2 模拟过程中 WT 和突变体 RMSD 随时间的变化*

Fig.2 Time dependence of RMSD values of WT and Mutants

* 彩图见电子版 (<http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx>) (2017 年第 2 期 doi:10.3969/j.issn.1672-5565.20160715001)。

另一方面,生化试验表明通过对 Ydj1p 锌指区域突变体分析,其无法支持酵母在高温下生长,当温度升高到非酵母正常生长温度后,锌指结构突变使抑制荧光素酶聚集的能力缺失,ydj1p 锌指 II 突变体在 37° 时生长缓慢,到达 43° 时不能生存^[21]。纯化的 ydj1p 锌指 II 突变体不能与 Hsp70 合作抑止蛋白折叠,故本文中 C162S 不能支持酵母在非正常条件下生长,锌指 II 功能的损坏,阻止 Hsp40 与 Hsp70 合作去抑制热激条件下的蛋白质损伤。相反,ZBD I 突变体 C143S 能部分行使功能与 Hsp70 合作抑制蛋白质聚集,在热激条件下保护蛋白。通过 RMSD 分析,模拟 7×10^{-9} s 后 C162S 最不稳定,其次是 C185S,都位于 ZBD II,C143S 和 C201S 平衡后波动较平稳。也证实了 ZBD II 构象的改变对整个锌指区域构象造成了大的影响,因此,该 ZBDII 的突变是有可能破坏 ZFLR 整体结构并使其不起作用的。Hsp40,Hsp70 与底物共同存在,并且 ATP 提供能量时,底物能进行正确折叠。而当仅含有 Hsp70 或 Hsp40 时,底物错误聚集都在 80% 以上。Hsp40 锌指区域进行突变后,ZBDI 突变体 C143S 使 Hsp70 与底物的结合率降低至 35%,底物的正常折叠可达到 75%,ZBDII 突变体 C162S 使 Hsp70 与底物的结合率降低至 25%,底物 80% 发生错误聚集;上述数据说明:在一定热激或者化学条件改变下,当 Hsp40 锌指区域发生突变后,突变体严重影响底物与 Hsp70 的传递,使 Hsp70 与底物结合率降低,Hsp70

不能帮助底物应对热激或者化学条件的改变,而进行错误的折叠组装。

2.2 RMSF 分析

均方根涨落 (root mean square fluctuation, RMSF) 是蛋白体系最终原子位置同参考位值的比较,它可以通过蛋白中各个氨基酸相对于平均结构的位置偏差,来计算蛋白质二级结构变化剧烈程度^[26]。为了分析局部残基的构象变化,本文分析了 WT 和突变体所有氨基酸残基 C α 原子的均

方根位移 (Root-mean square fluctuations, RMSF)。如表 1 所示,与野生型相比, C162S、C185S 的 ZBDII 和 ZBDI 区域均发生明显偏移,而 C143S、C201S 的 ZBDII 和 ZBDI 区域偏移较小,其他结构没有发生明显的偏移。分析可知各突变体锌指结构都有不同程度的变化,因此,影响蛋白结构稳定性的原因可能是蛋白突变后锌指结构的变化,为了进一步证实这一推测,对突变后的蛋白与野生型进行结构比对。

表 1 模拟过程中 WT 和突变体的 RMSF 平均值

Table 1 The average RMSF of WT and Mutants during MDs

区域	WT	锌指 I 点突变体		锌指 II 点突变体	
		C201S	C143S	C162S	C185S
锌指 I 部分平均 RMSF	0.29	0.22	0.18	0.43	0.35
锌指 II 部分平均 RMSF	0.88	0.65	0.43	1.04	0.95

由表 1 可以看出,锌指 I 点突变体的平均 RMSF 比野生型降低,锌指 II 点突变体的平均 RMSF 比野生型升高,并且所有模型中锌指 II 部分的平均 RMSF 均比锌指 I 部分的平均 RMSF 大,说明锌指 II 部分结构更易受到影响,在其部分的突变可能对 Ydj1 功能有更大的影响。

2.3 Ydj1p 及各突变体与多肽底物的静电能量和范德华能量分析

分子动力学模拟的方法分析相互作用力时,通常以疏水和静电作用为主来判断结合能力的强弱^[27-28],为了定量分析底物与 Ydj1p 之间相互作用能量的变化,本文对 Ydj1p 野生型和各突变体与多肽底物进行了拉伸动力学模拟。由表 2 可知,Ydj1p 突变体的氢键数量以及疏水数量略少于野生型, C143S, C162S 较为明显,降低约 10%,其 C143S 较 C162S 降低的更多,说明突变后与底物结合能力稍差,稍许影响结合。而 C201S, C185S 的疏水以及氢键数量均与野生型相似,底物结合能力不发生改变,这与之前生化报道的数据一致^[21]。

当与底物结合时,只含有 Ydj1p 野生型和各突

变体的多肽底物,不含 Hsp70 时,底物发生错误聚集;当 Hsp70, Ydj1p 野生型与多肽底物结合后,底物进行正常折叠^[29]。相比之下,当 Hsp70, Ydj1p 各突变体与多肽底物结合后, Ydj1p 锌指 I 突变体 C143S 与底物结合后,正确折叠相较 ydj1p 野生型与底物结合的正确折叠率略低,而 ydj1p 锌指 II 区域突变体 C162S 与底物结合后,严重影响底物的正确折叠,结合上述结论,突变后并未大幅度影响与底物的结合能力,即可推测出 Ydj1p C162S 突变后影响底物与 Hsp70 之间的传递,从而影响底物的正确折叠。拉伸数据如图 3 所示,能量分析与前面的疏水数量和氢键数量的分析结果相符,由表 2 可知,从能量角度来看, C143S, C162S 的静电能量以及范德华能量都略少野生型, C185S 和 C201S 的静电能量与野生型相似,范德华能量略高于野生型。 C185S, C201S 突变体与底物之间的能量没有太大变化,对底物结合能力的影响也不大。而 C143S, C162S 能量降低,这与之前的文献报道一致^[21]。进而推测出 ZBDI 和 ZBDII 的突变 C143S 和 C162S 是对底物与 Hsp70 之间的传递产生了一定的影响。

表 2 WT 和不同突变体对底物结合的影响

Table 2 The effect of WT and Mutants in substrates combination

不同突变体	氢键数量/个	疏水数量/个	静电能量/(kJ·mol ⁻¹)	范德华能量/(kJ·mol ⁻¹)	总能量/(kJ·mol ⁻¹)
WT	5.560	65.380	-108.309	-139.758	-248.067
C143S	4.730	58.610	-90.544	-120.227	-210.771
C162S	4.820	58.290	-93.506	-117.834	-211.340
C185S	5.580	66.280	-102.756	-141.196	-243.952
C201S	5.550	67.660	-108.656	-141.515	-250.171

2.4 锌指结构变化分析

通过 Pymol 可视化软件做了 10 \times 10⁻⁹ s 时 WT 与所有突变体的结构比对,如图 3 所示,其中图 3(a)为

WT、图 3(b)、(c)为 ZBDI 突变体(C143S、C201S)与野生型结构比对,图 3(d)、(e)为 ZBDII 突变体(C185S、C162S)与野生型结构比对,绿色*为模拟

0×10^{-9} s时的构象,红色*为模拟 10×10^{-9} s 时的构象,模拟 10×10^{-9} s 过程中每隔 500×10^{-12} s 所有构象进行比对,由比对结果可知,ZBDI 突变体只是锌指结构末端,位于 ZBDII 区域发生偏移,而 ZBDII 突

变导致整体锌指结构明显受到影响。那么突变体结构变化后是否会影响与 Hsp70 的合作的功能呢?本文通过 ClusterPro 2.0 Server 在线服务器对野生型及 C143S、C162S 突变体进行对接^[30]。

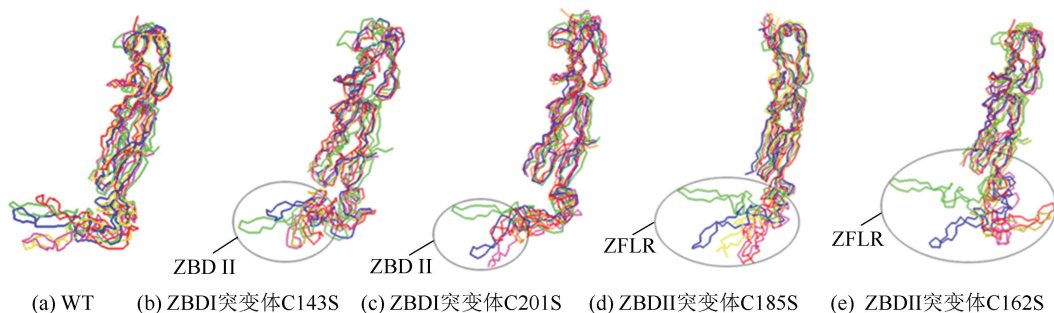


图3 WT及各变异体锌指模拟不同时刻的结构变化图

Fig.3 The construction change of the zinc finger of WT and Mutants during different times of the MDs

* 彩图见电子版 (<http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx>) (2017年第2期 DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.20160715001)。

2.5 Ydj1p 与 Hsp70 对接结果分析

采用蛋白晶体结构数据库中的 Ydj1 (PDB code: 1NLT) 为对接模型,以 Ydj1 为模型利用 Swiss-Pdb Viewer 进行同源建模构建 C143S、C162S 突变体模型,考虑到大肠杆菌的 HscA 与 Ssa1 的序列相似性较高,采用大肠杆菌的 C 末端为对接模型 (PDB code: 1U00),首先对 WT、C143S、C162S 进行分子动力学模拟使分子结构处于稳定,以此为初始模型使用 ClusterPro 2.0 Server 分别做了 Ydj1p 以及突变体与 HscA 的对接。Hsp40 与 Hsp70 分子伴侣相互作用,分子伴侣 Ydj1p 暂时与未折叠的多肽迅速结合,Ydj1p 的 J 结构域通过刺激 Hsp70-ATP 酶结构域促进 ATP 酶水解,使 Hsp70 的盖子结构打开,然后底物转移到 Hsp70 的底物结合口袋中,Ydj1p 解离,核苷酸交换因子与 Hsp70 复合物结合,引起 ADP 释放盖子关闭。Hsp70 进一步对底物进行折叠。Ydj1p 与大肠杆菌

中 HscAC-末端相互作用模型的结果有很多种,依据相关文献报道选择了最优的对接模型,如图 4 所示,图 4 中红色*片段为多肽底物,通过 Hsp40 将其转移到 Hsp70 底物结合部位,通过对图 4 分析,Ydj1 单体都与 Hsp70-SBD 结构域结合的可能,但考虑到 Ydj1 在酵母细胞中是以二聚体形式存在的,C143S 的这种对接形式由于空间位阻的影响会阻碍与 Hsp70 的结合,底物传递到 Hsp70 的效率会降低。但不会影响 Ydj1p 的生物学功能,所以抑制变性蛋白的聚集也不会受到影响。而突变体 C162S 模拟之后锌指结构偏移程度较大,在锌指结构与 Hsp70 碳末端结合时 C162S 的锌指结构反向与 Hsp70 结合,使 Ydj1p 底物结合口袋背离 Hsp70,因此,底物的传递会受到影响。C162S 与 Hsp70 这种对接方式排名靠后,能结合的对接模型数量较少,可能现实中并不存在,锌指 II 突变阻碍了与 Hsp70 的进一步合作。

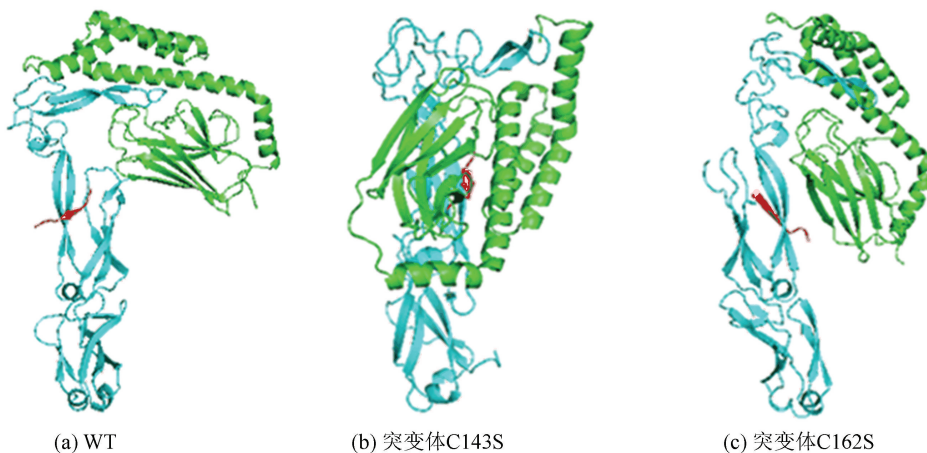


图4 WT及突变体 C143S、C162S 与 Hsp70 对接,底物结合模式图(红色部分为底物*)

Fig.4 The docking models among WT and C143S, C162S with Hsp70, substrate (the red part is substrate)

* 彩图见电子版 (<http://swxxx.alljournals.cn/ch/index.aspx>) (2017年第2期 DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.20160715001)。

对 WT 和突变体的对接模型进行了分析,也只是从结果上证实确实结构的变化可能影响了底物的传递的原因,如果更进一步对 Hsp40 与 Hsp70 之间的相互作用进行研究,推测出 Hsp40 (Ydj1p) 与 Hsp70(1U00) 相互作用的第 2 位点,那对两者之间的研究将更进一步。

3 结论

1) 突变体 C143S, C162S 与底物之间的氢键数量、疏水数量以及总能量略少于野生型,与多肽底物的结合能力降低约 10%。而突变体 C185S, C201S 与底物之间的疏水、氢键数量以及总能量与野生型相似,对多肽底物的结合能力影响不大,总体来讲不影响底物结合。

2) ZBDI 单点突变有增加结构的灵活性的可能性,但可能不显著影响整体 ZFLR 结构。ZBD II 构象的改变对整个锌指区域构象造成了大的影响,因此,该 ZBDII 的突变是有可能破坏 ZFLR 整体结构并使其不起作用的。

3) 野生型及 C143S, C162S 突变体都能与 Hsp70 作用,由于空间位阻以及构象变化的原因, Ydj1p 与 Hsp70 的合作受到影响,底物传递效率降低。

参考文献(References)

[1] LINKE K, WOLFRAM T, BUSSEME J, et al. The roles of the two Zinc binding sites in DnaJ[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(45): 44457-66. DOI: 10.1074/jbc.M307491200.

[2] SCOTT W R P, HÜNENBERGER P H, TIRONI I G, et al. The GROMOS biomolecular simulation program package[J]. Journal of Physical Chemistry A, 1999, 103(19): 3596-3607. DOI: 10.1021/jp984217f.

[3] KARPLUS M, PETSKO G A. Molecular dynamics simulations in biology[J]. Nature, 1990, 347(6294): 631-639. DOI: 10.1038/347631a0.

[4] VJESTICA A, ZHANG Dan, LIU Jianhua, et al. Hsp70-Hsp40 chaperone complex functions in controlling polarized growth by repressing Hsf1-Driven heat stress-associated transcription[J]. Plos Genetics, 2013, 9(10): e1003886. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003886.

[5] FAN Chunyang, REN Hongyu, LEE P, et al. The type I Hsp40 zinc finger-like region is required for Hsp70 to capture non-native polypeptides from Ydj1 * [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(1): 695-702. DOI: 10.1074/jbc.M410645200.

[6] FLORIN E L, MOY V T, GAUB H E. Adhesion forces be-

tween individual ligand-receptor pairs [J]. Science, 1994, 264(5157): 415-417. DOI: 10.1126/science.8153628.

[7] XU Yechun, SHEN Jianhua, LUO Xiaomin, et al. Steered molecular dynamics simulations of protein-ligand interactions [J]. Science in China Series B: Chemistry, 2004, 47(5): 355-366. DOI: 10.1007/BF02990895.

[8] CYR D M. Cooperation of the molecular chaperone Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation [J]. FEBS Letters, 1995, 359(2/3): 129-132. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00024-4.

[9] SILVA J C, BORGES J C, CYR D M, et al. Central domain deletions affect the SAXS solution structure and function of Yeast Hsp40 proteins Sis1 and Ydj1 [J]. BMC Structural Biology, 2011, 11(1): 3348-3353. DOI: 10.1186/1472-6807-11-40.

[10] SUMMERS D W, DOUGLAS P M, CYR D M. Prion propagation by Hsp40 molecular chaperones [J]. Prion, 2009, 3(2): 59-64. DOI: 10.4161/pri.3.2.9062.

[11] CHAARI A, HOARAU-VÉCHOT J, LADJIMI M. Applying chaperones to protein-misfolding disorders: Molecular chaperones against α -synuclein in Parkinson's disease [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60: 196-205. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.032.

[12] MASISON D C, KIRKLAND P A, SHARMA D. Influence of Hsp70s and their regulators on yeast prion propagation [J]. Prion, 2009, 3(2): 65-73. DOI: 10.4161/pri.3.2.9134.

[13] KIRKLAND P A, REIDY M, MASISON D C. Functions of Yeast Hsp40 chaperone sis1p dispensable for prion propagation but important for prion curing and protection from prion toxicity [J]. Genetics, 2011, 188(3): 565-577. DOI: 10.1534/genetics.111.129460.

[14] LANGER T, LU Chi, ECHOLS H, et al. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding [J]. Nature, 1992, 356(6371): 683-689. DOI: 10.1038/356683a0.

[15] WU Yunkun, LI Jingzhi, JIN Zhongmin, et al. The crystal structure of the C-terminal fragment of Yeast Hsp40 Ydj1 reveals novel dimerization motif for Hsp40 [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 346(4): 1005-1011. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.12.040.

[16] 王浩, 徐利楠, 孙玉娜, 等. Ydj1p 二聚体中 $\beta 14 \sim \beta 15$ 与 domain-III 分离的拉伸分子动力学模拟研究 [J]. 生物信息学, 2013, 11(3): 167-171. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2013-03.2013.03.02.

WANG Hao, XU Li'nan, SUN Yuna, et al. Steered molecular dynamics simulation of the binding of $\beta 14$ - $\beta 15$ and domain-III in Ydj1p dimer [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2013, 11(3): 167-171. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2013.03.02.

[17] ZHANG Jilong, ZHENG Qingchuan, ZHANG Hongxing.

- Unbinding of glucose from human pulmonary surfactant protein D studied by steered molecular dynamics simulations [J]. *Chemical Physics Letters*, 2010, 484(4/5/6):338–343. DOI:10.1016/j.cplett.2009.12.022.
- [18] SHEN Manli, GUAN Jing, XU Linan, et al. Steered molecular dynamics simulations on the binding of the appendant structure and helix-B2 in domain-swapped human cystatin C dimer[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2012, 30(6): 652–661. DOI: 10.1080/07391102.2012.689698.
- [19] HESS B, KUTZNER C, VAN DER SPOEL D, et al. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2008, 4(3): 435–447. DOI: 10.1021/ct700301q.
- [20] 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. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt055.
- [21] LINKE K, WOLFRAM T, BUSSEMER J, et al. The roles of the two zinc binding sites in DnaJ[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(45):44457–44466. DOI: 10.1074/jbc.M307491200.
- [22] HESS B, BEKKER H, BERENDSEN H J C, et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 1997, 18(12):1463–1472. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.
- [23] DARDEN T, YORK D, PEDERSEN L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems[J]. *Journal of Chemical Physics*, 1993, 98:10089–10092. DOI:10.1063/1.464397.
- [24] ESSMANN U, PERERA L, BERKOWITZ M L, et al. A smooth particle mesh Ewald potential[J]. *Journal of Chemical Physics*, 1995, 103(19): 8577–8593. DOI: 10.1063/1.470117.
- [25] LIN E S, YANG Y S, YANG J M. Modeling the binding and inhibition mechanism of nucleotides and sulfotransferase using molecular docking[J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2003, 50(3B):655–663. DOI: 10.1002/jccs.200300095.
- [26] SHEN Lingling, SHEN Jianhua, LUO Xiaomin, et al. Molecular dynamics simulation on the binding of NNRTI to HIV-1 RT[J]. *Biophysical Journal*, 2003, 84(6):3547–3563. DOI:10.1016/S0006-3495(03)75088-7.
- [27] CUÉLLAR J, PERALES-CALVO J, MUGA A, et al. Structural insights into the chaperone activity of the 40-kDa heat Shock protein DnaJ binding and remodeling of a native substrate [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(21): 15065 – 15074. DOI: 10.1074/jbc.M112.430595.
- [28] ZHURAVLEVA A, CLERICO E M, GIERASCH L M. An interdomain energetic Tug-of-War creates the allosterically active state in Hsp70 molecular chaperones [J]. *Cell*, 2012, 151(6):1296–1307. DOI:10.1016/j.cell.2012.11.002.
- [29] ZHURAVLEVA A, GIERASCH L M. Substrate-binding domain conformational dynamics mediate Hsp70 allostery[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(22):E2865–E2873. DOI: 10.1073/pnas.1506692112.
- [30] 周雷,徐利楠,周小红,等. Hsc70-Auxilin 复合物的拉伸分子动力学模拟[J]. *生物信息学*, 2014,12(2):110–116. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2014.02.06.
- ZHOU Lei, XU Li'nan, ZHOU Xiaohong, et al. Steered molecular dynamics simulations of Hsc70-Auxilin interactions[J]. *Chinese Journal of Bioinformatics*, 2014,12(2): 110–116. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2014.02.06.