

学校编码: 10384

学号: 200426077

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

热休克蛋白 Hsp70 ATP-ADP 转换活性及分子伴侣功能研究

The research on ATP-ADP exchange activity and  
molecular chaperone activity of Hsp70

曲 宁

指导教师姓名: 吴学记

徐金森

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007 年 5 月 20 日

论文答辩时间: 2007 年 6 月 04 日

学位授予日期: 2007 年 月

答辩委员会主席: 陈清西 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 ( ), 在      年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ( )

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:                      日期:      年      月      日

导师签名:                      日期:      年      月      日

声明人 (签名):

年      月      日

# 目录

摘要.....	1
Abstract.....	3
1 前言 .....	5
1.1 热休克蛋白.....	5
1.2 Hsp70 基因与蛋白结构特点 .....	6
1.3 Hsp70 与 ATP-ADP 转换关系.....	10
1.4 Hsp70 的主要功能 .....	13
1.5 Hsp70 在疾病研究上的应用.....	15
1.6 本实验的目的及意义 .....	17
2 材料和方法.....	18
2.1 材料.....	18
2.2 实验方法 .....	20
3 结果.....	30
3.1 样品的处理 .....	30
3.2 牛脑 Hsp70 研究.....	30
3.2.1 牛脑 Hsp70 ATP-ADP 转换活性部位研究.....	30
3.2.2 NDP 激酶对 Hsp70 44-kD 片段酶活性的影响 .....	33
3.2.3 Hsp70 酸稳定磷酸化片段的检测.....	35
3.2.4 44-kD 片段酸稳定磷酸化位点检测.....	38
3.3 人 Hsp70 研究.....	39
3.3.1 野生型及突变体 Hsp70 原核表达.....	39
3.3.2 野生型及突变体 Hsp70 圆二色谱分析.....	41
3.3.3 野生型及突变体 Hsp70 ATP-ADP 转换活性分析.....	42
3.3.4 野生型及突变体 Hsp70 磷酸化检测.....	44
3.3.5 野生型及突变体 Hsp70 体外助折叠功能及 ADP 对其影响.....	45
4 讨论.....	47

4.1 Hsp70 44-kD 片段 ATP-ADP 活性及磷酸化.....	47
4.2 Hsp70 野生型及突变体 ATP-ADP 活性及助折叠功能.....	49
参考文献.....	52
致谢.....	58
在学期间发表论文及参加的课题.....	59

厦门大学博硕士论文摘要库

## Catalog

<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1 Introduction</b> .....	5
1.1 The introduction of heat shock proteins .....	5
1.2 The struction of gene <i>hsp70</i> and protein Hsp70 .....	6
1.3 Hsp70 and ATP-ADP exchange .....	10
1.4 The main function of Hsp70.....	13
1.5 The research on Hsp70 and the some diseases.....	15
1.6 The purpose and meaning of this experiment.....	17
<b>2 Materials and methods</b> .....	18
2.1 Materials.....	18
2.2 Methods.....	20
<b>3 Results</b> .....	30
3.1 The preparation of sample .....	30
3.2 The stuty of bovine brain Hsp70.....	30
3.2.1 The functional domain for ATP-ADP exchange reaction.....	30
3.2.2 Evaluating the possibility of NDP kinase contamination of 44-kD fragment .....	33
3.2.3 Detection acid-stable autophosphorylation.....	35
3.2.4 Identification of the Phosphorylated residue .....	38
3.3 The stuty of human Hsp70 .....	39
3.3.1 Site-directed mutagenesis of <i>hsp70</i> and the expression in <i>E.Coli</i> ...39	
3.3.2 The analysis of circulardichroism (CD) spectra .....	41
3.3.3 ATP-ADP exchange activity of wide-type and mutant Hsp70 .....	42
3.3.4 The autophosphorylation of wide-type and mutant Hsp70 .....	43
3.3.5 The chaperone activity of wide-type and mutant Hsp70 .....	45

<b>4 Discussion</b> .....	47
<b>4.1 The ATP-ADP exchange activity of 44-kD fragment and its acid-stable autophosphorylation</b> .....	47
<b>4.2 The ATP-ADP exchange activity of wide-type and mutant Hsp70 and their chaperone activity</b> .....	49
<b>References</b> .....	52
<b>Acknowledgments</b> .....	58
<b>Publication</b> .....	59

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

热休克蛋白是细胞受热等因素刺激后诱导产生的蛋白质,是在生物进化中高度保守的蛋白质分子家族,广泛存在于从原核到真核各种生物细胞内,后来研究证明热休克蛋白在正常生理条件下亦表达并起重要作用,其作为分子伴侣参与未折叠新生多肽链、多蛋白复合物的组装和跨膜运输、转位、蛋白质降解,细胞内蛋白质合成后的加工等一系列生物活动,保护细胞生存。

Hsp70是热休克蛋白家族中最重要的一员,其诱导性显著,合成量较多。Hsp70功能发挥可能依赖ATP的结合、ATP-ADP的转换或Hsp70的自身磷酸化所引起构象的变化,进而引起的底物结合和释放。Hsp70蛋白家族具有一个共同的三级结构: N端高度保守ATP<sub>ase</sub>功能域和C端底物结合功能域。Hsp70N端44-kD的ATPase功能域存在微弱的ATP水解活性,后来发现Hsp70不仅存在ATP水解活性还存在ATP合成活性, Hsp70表现的是ATP-ADP转换活性。

本实验首先以牛脑 Hsp70 为研究对象,确定 Hsp70 ATP-ADP 转换活性发生部位。用糜蛋白酶酶切 Hsp70,获得了稳定的 44-kD 片段,用 C<sup>14</sup> 标记的[<sup>14</sup>C]ATP 生成[<sup>14</sup>C]ADP 的量测定 ATPase 活性;反过来由[<sup>14</sup>C]ADP 生成[<sup>14</sup>C]ATP 的量测定 ATP 合成酶活性。为获得准确的结论排除 NDP 激酶可能对实验的影响,按照纯化 Hsp70 44-kD 片段的方法对等物质量 NDP 激酶和 Hsp70 混合物进行酶切、纯化,检测得到的 44-kD 片段的 ATP-ADP 转换活性,确定 Hsp70 ATP-ADP 转换活性是 Hsp70 自身固有的,位于其 N 端 44-kD 片段处。

Hsp70 与 NDP 激酶相似通过形成酸或碱不稳定自身磷酸化中间体催化  $\gamma$ -磷酸基团在 ATP 和 ADP 间传递。本实验研究了酸稳定的磷酸中间体的生成。纯化后的 Hsp70、44-kD 蛋白片段与标记的[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 反应, SDS-PAGE 后在酸性条件下处理凝胶, Hsp70 与 44-kD 蛋白片段的放射自显影图谱都显示酸稳定的自身磷酸化,推测可能是丝/苏氨酸磷酸化。用 CNBr 裂解磷酸化的 44-kD 蛋白片段,磷酸化片段位于裂解后的 12-kD 片段,氨基酸测序为 Lys128-Met237。赖氨酰肽链内切酶酶切、反相分离、氨基酸测序确定磷酸化位点为 204 位苏氨酸,与大肠杆菌 Hsp70---DnaK 的 199 位苏氨酸磷酸化一致。

人 Hsp70 与牛 Hsp70 无论氨基酸序列还是三级结构都存在高度同源性。本实验选择人 Hsp70 中两金属结合位点的 3 个氨基酸来研究其对 Hsp70 功能的影



响及作用机理。Lys71、Thr204 和 His227 分别位于 ATPase 功能域两金属结合位点内，测定 Hsp70K71A、T204A 突变体 ATP-ADP 转换活性发现二者 ATP-ADP 的转换活性几乎完全丧失，无磷酸化中间体的形成。用变性荧光素酶的重折叠实验检测 Hsp70 的分子伴侣功能，Hsp70K71A、T204A 突变体体外帮助变性荧光素酶的重折叠功能受到抑制。H227S 突变体的 ATP-ADP 的转换活性几乎完全丧失，但是其磷酸化中间体未受影响，而且体外帮助变性荧光素酶的重折叠功能比野生型 Hsp70 稍有降低。ADP 部分抑制了野生型 Hsp70 变性荧光素酶的重折叠，但是对第二个金属结合位点的 H227S 突变体的重折叠功能没有影响，进一步证实第二个金属结合位点可能与 ADP 结合相关。

**关键词：**热休克蛋白70；ATP-ADP转换；自身磷酸化；分子伴侣

## Abstract

Heat shock proteins (HSPs), also called stress proteins, are a group of proteins highly conserved in all cells, which are induced when a cell undergoes various types of environmental stresses like heat, cold and oxygen deprivation. Lately it was found they were also present in cells under normal conditions. The 70kDa heat shock proteins (Hsp70s) were the most important family in the heat shock proteins. They work as molecular chaperones in eukaryote being involved in various cellular functions, such as protein synthesis, folding, translocation, degradation and modulation of protein expression.

Now many researches are focused on the chaperone mechanism of Hsp70. Hsp70 is a multifunctional molecular chaperone whose interactions with protein substrates are regulated by ATP hydrolysis and ATP-ADP exchange. Hsp70 exhibits weak ATPase activity and locates at the N-terminal 44-kD domain. Recently it was found that besides the activity of ATP hydrolysis Hsp70 exhibited ATP synthesis activity. To identify the function domain of ATP-ADP exchange reaction of Hsp70, we purified the N-terminal 44-kD fragment after extensive digestion with  $\alpha$ -chymotrypsin and then characterized the enzyme activity assaying the conversion of [ $^{14}$ C]ADP to [ $^{14}$ C]ATP and [ $^{14}$ C]ATP to [ $^{14}$ C]ADP respectively. It has been reported that NDP kinase has weak interaction with Hsp70, which can increase the ATP hydrolysis activity, so we carefully examined the possibility of NDP kinase contamination in the experiment. The equimolar mixture of NDP kinase and Hsp70 were digested and then 44-kD fragment was purified. No different activity was observed for the 44-kD fragment from the mixture of NDP kinase and Hsp70. All the results conformed that N-terminal 44-kD fragment exhibited the intrinsic ATP-ADP exchange activity.

During the ATP-ADP exchange reaction Hsp70 forms an acid-labile autophosphorylated intermediate transferring  $\gamma$ -phosphate from ATP to ADP in a similar manner occurring in NDP kinase. In this experiment we analyzed the acid-stable autophosphorylation and its phosphorylated residue of 44-kD fragment.

The phosphorylated 44-kD fragment was cleaved with CNBr at Met cleavage sites under acidic condition and 12-kD fragment of Lys128-Met237 showed autophosphorylation after SDS-PAGE and N-terminal amino-acid sequence. Analysis of the digestion of lysyl endopeptidase and N-terminal amino-acid sequence showed that Thr204 was the phosphorylated site which was consistent with the phosphorylation of Thr199 in DnaK.

The human Hsp70 and bovine Hsp70 have highly homologic in both sequence and structure. The wide-type and mutant (K71A, T204A and H227S) were expressed in *E.Coli* and purified on HisTrap<sup>TM</sup> Ni<sup>2+</sup>-agarose column and then mono Q anion-exchange column. Lys71、Thr204 和 His227 are important residues in Hsp70 in the two calcium binding sites respectively. No ATP-ADP exchange activity and autophosphorylation were observed in Lys71 and Thr204 mutant and chaperone activity was abolished either. The ATP-ADP exchange activity of H227S point mutation on the second calcium binding site residue wasn't detected but no affect on its phosphorylation and chaperone activity. Moreover ADP partly inhibited the chaperone activity of wide-type Hsp70 but didn't affect the chaperone activity of the mutant on the second calcium binding site residue H227S. The results suggested that the second calcium binding site maybe mainly for ADP binding.

**Key words:** Hsp70; ATP-ADP exchange; autophosphorylation; chaperone activity

# 1 前言

## 1.1 热休克蛋白

1962年, Ritossa在对果蝇的研究中发现25℃培养的果蝇幼虫置于30-32℃环境30min后, 其唾液腺巨大染色体上出现了新的膨突(puff), 显示这一区带转录增强, Ritossa将这一现象称为“热休克反应”(heat shock respond, HSR)。后来他又证实更多应激条件能够产生热休克反应。1974年Tissieres等发现在HSR过程中, 伴随着染色体膨突的出现, 细胞合成了一类特殊的蛋白质, 同时细胞正常蛋白质合成受到抑制, 由于这类蛋白的合成与HSR有关, 他们将其称为热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)。后来总结生物细胞在受热、受损、应激刺激(如缺血、缺氧、重金属离子、射线、病毒感染、DNA损伤等)作用下, 发生热休克反应, 可以抑制一些正常蛋白质的合成、折叠, 致使疏水区暴露相互聚集结合形成不溶性沉淀, 此时细胞启动热休克蛋白基因, 合成热休克蛋白, 阻止蛋白的相互结合<sup>[1,2]</sup>。热休克蛋白首先是在应激条件下发现, 后来研究证明其在正常生理条件下亦起重要作用, 并广泛存在于从原核到真核生物的生物界有机体内。对各种热休克蛋白的研究发现, Hsps是一组在生物进化过程中高度保守的蛋白质分子家族, 如大肠杆菌的热休克蛋白DnaK与真核生物的热休克蛋白氨基酸序列同源性可以高达50%<sup>[3]</sup>。热休克蛋白按分子量大小分为以下几个家族: Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60、小分子Hsp家族, 各个Hsp家族又分别含有多种亚型, 如Hsp70家族就有Hsp72, Hsp73、Hsp75和Hsp78等。热休克蛋白家族中最主要的是Hsp70家族, 其诱导性最显著, 合成量较多。

Hsp70家族是分子量在70 kD左右的热休克蛋白, 其不仅能在热胁迫下表达, 而且组成性地存在于所有的活体细胞中如细胞核、细胞质、内质网、线粒体和叶绿体等细胞的各个部分<sup>[4]</sup>。正常条件下Hsp70存在细胞质中, 热击发生后Hsp70可以迅速转移到细胞核, 在核内、核仁区聚集<sup>[5]</sup>。Hsp70家族成员众多, 大肠杆菌中的DnaK, 酵母中的Ssa1p, Ssa2p, Hsp70家族在哺乳动物细胞中分为四种: 第1种是Hsp70, 也称为Hsp72, 通常在正常细胞中并不表达或表达量很少, 但是在热应激或其它应激原的作用下, 则表达迅速增加, 属于诱导型Hsp70; 第2种为Hsc70(热应激同源蛋白70, heat shock cognate 70), 也称为Hsp73, 是哺乳动物细胞内的结构蛋白, 在所有的细胞内均能表达, 表现为细胞生长依赖型, 受热表达

轻度提高,属于结构型Hsp70,主要存在于细胞质中。这两种Hsp具有高度的序列同源性(可高达95%)和相似的生物化学特性;第3种是GRP78(葡萄糖调节蛋白78, glucose-regulated protein 78),又称为Bip,为细胞内结构蛋白,存在一个信号肽,引导GRP78定位于内质网腔内。免疫球蛋白(immunoglobulin)组装实验发现GRP78与Ig重链瞬时牢固结合,阻止未成熟重链的自身结合,直至重链和轻链结合。GRP78可瞬时结合血细胞凝集素亚基和不能正确折叠的突变或未糖基化修饰的血细胞凝集素。第4种是GRP75,主要位于线粒体基质内,也是细胞内结构蛋白。GRP78和GRP75在应激时表达稍有提高,它们在细胞内分别以分子伴侣的形式发挥作用<sup>[6]</sup>。

## 1.2 Hsp70基因与蛋白质结构特点:

*hsp70*基因家族组成差异较大。如*hsc70*基因含有8个内含子,它的cDNA序列已在人、大鼠、小鼠、中国仓鼠和牛等的细胞中被发现。据推测其所编码的蛋白质约含有646个氨基酸。*hsp70*基因组成与*hsc70*基因有很大不同。*Hsp70*基因没有内含子,转录一旦启动就可产生出成熟的mRNA来快速表达Hsp70,防止应激原对*hsp70* mRNA前体的影响,从而保证了机体对Hsp70的需要。以Wistar大鼠的*hsp70*基因为例,其由2770个核苷酸组成,5'端非编码区序列长为284个核苷酸,3'端非编码区序列长为342个核苷酸,5'端上游距转录起始位置30个核苷酸是TATA box和2个HSE(热应激元件, heat shock element)即HSE I、HSE II。HSE与转录起始相关,其位于转录起始点上游区域,具有增强子(enhancer)的特征。细胞受到热激或其它的生理应激诱导后,存在胞质中的多肽----热休克转录因子(heat shock transcription factor, HSF)单体聚合形成有活性的三聚体,转运到核内,结合到热应激基因上游的启动子元件----热应激元件(HSE), HSF与HSE结合后,立即激活热应激基因转录;在非应激条件下, Hsp70与HSF相结合,从而抑制HSF的活性, HSF与HSE仅有低水平结合<sup>[7]</sup>。现已发现脊椎动物和植物存在4个HSF基因家族成员,线虫和果蝇中只有一个HSF,在人类细胞中发现3个HSF(HSF1, HSF2, HSF3)。*hsp70*基因编码序列在进化上具有高度保守性,大鼠Hsp70氨基酸序列与人类Hsp70氨基酸序列的同源性约为95%,与小鼠Hsp70氨基酸序列的同源性约为98%,人类Hsp70氨基酸序列与果蝇Hsp70氨基酸序列的同源性为73%,与大肠杆菌诱导型Hsp70(即Dnak)氨基酸序列的同源性则为47%<sup>[8]</sup>。

Hsp70蛋白大约由650个氨基酸组成，是一组进化上高度保守的应激蛋白，其所有成员都具有一个共同的结构，这个共同结构包括两个区域：一个高度保守的N端，分子量约为44kD的ATP<sub>ase</sub>功能域(ATP binding domain)和一个C端分子量约为25-kD的底物结合功能域(substrate binding domain)。图1-1C显示各功能域氨基酸在全蛋白的大约位置。比较Hsp70家族各蛋白氨基酸序列发现N末端的氨基酸(大约400个氨基酸)保守性高于C端<sup>[6]</sup>。一些Hsp70蛋白N端或C端存在一段信号肽或延伸序列有助于细胞内定位、驻留<sup>[9,10]</sup>。X光衍射晶体结构分析发现N端ATP<sub>ase</sub>功能域的结构类似于肌动蛋白和己糖磷酸激酶，主要由2个大的球形亚功能域(Globular subdomain) I 和 II 所组成，中间被一个深的中央裂缝所分开，并通过2个交叉的 $\alpha$ 螺旋相连接，亚功能域和连接的 $\alpha$ 螺旋在裂缝的底部形成一个核苷酸及所需金属离子的结合袋，核苷酸和金属离子通过弱得相互作用结合在裂缝底部，如图1-1A<sup>[11]</sup>。C端区域又可分成一个保守的 $M_r$ 15-kD的多肽结合功能域(Polypeptide-binding domain)和一个不保守的靠近C端的 $M_r$ 10-kD不确定功能域。Zhu等研究表明DnaK(Hsp70同源体)底物结合功能域和部分可变区域的结构主要由两部分组成，如图1-1B：第一部分(N端)多个 $\beta$ 折叠形成成一个紧密的 $\beta$ 三明治( $\beta$ -sandwich)结构；第二部分(C端)由5个 $\alpha$ 螺旋( $\alpha$ -helices)组成，形成一个松弛的 $\alpha$ 螺旋束结构。N端部分的 $\beta$ 三明治结构由底部和上部2个片层结构组成，每个片层结构都含有4条反向平行的 $\beta$ 折叠( $\beta$ -sheet)链组成， $\beta_3$ 、 $\beta_6$ 、 $\beta_7$ 和 $\beta_8$ 等4条链组成三明治结构中相对规则的底部片层， $\beta_5$ 、 $\beta_4$ 、 $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 等4条链组成上部不规则的片层结构， $\beta$ 折叠之间形成一些特殊的环状结构(loop, L)相连，不规则的上部片层结构与三明治结构伸出的特殊的环联合形成底物结合位点，L1,2( $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 之间形成的)和L3,4( $\beta_3$ 和 $\beta_4$ )形成一个大小为0.5nm $\times$ 0.7nm的底物疏水结合通道(substrate-binding channel)。松弛构象的多肽结合在由 $\beta$ 三明治结构形成的底物结合通道中，而 $\alpha$ 螺旋部分位于多肽结合单位之上，象一个盖子覆盖在结合通道上面，而且不与底物直接接触，能阻止结合底物的逃逸<sup>[12]</sup>。Hsp70的10kD片段序列不保守，其结构变化较多，如上述DnaK的5个 $\alpha$ -螺旋结构，真核生物大鼠Hsc70 10kD片段的螺旋-环-螺旋结构，线虫Hsp70 C末端10-kD功能域的螺旋束结构等<sup>[12,13,14]</sup>。

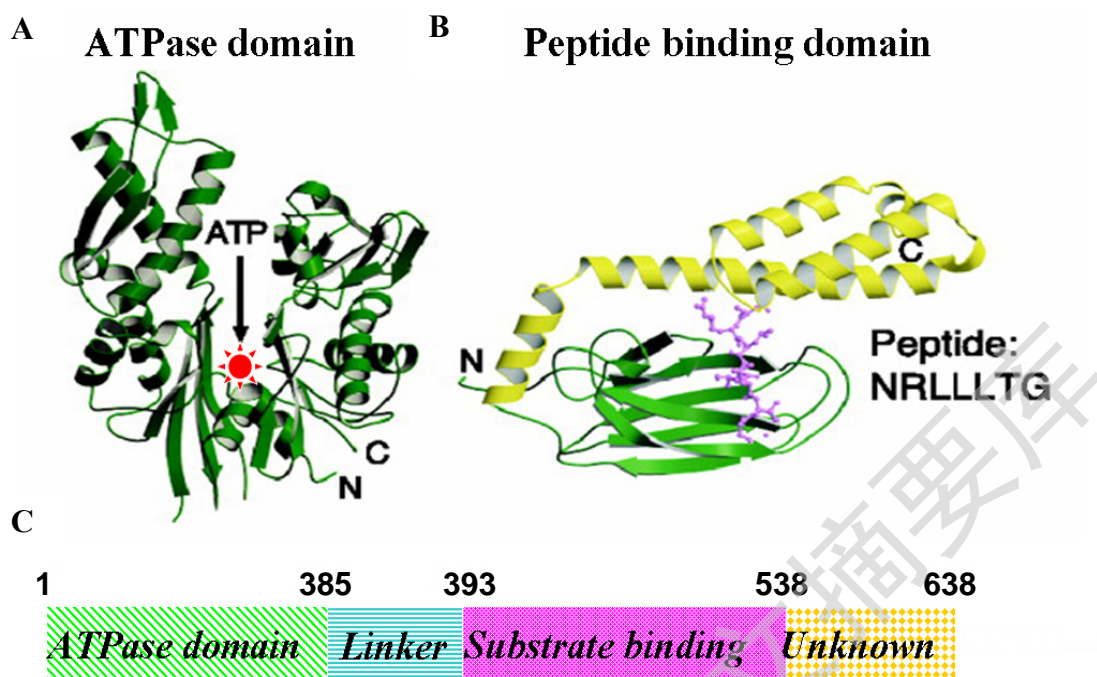


图1-1: Hsp70 N端ATPase功能域(A)、底物结合功能域结构(B)、结构分布示意图(C)

Fig.1-1 Structures of the ATPase domain and the peptide-binding domain of Hsp70

Hsp70N端和C端两个结构功能域对Hsp70的分子伴侣功能是至关重要的。N端ATPase功能域具有水解ATP的活性，C端底物结合功能域能够与没有折叠的多肽底物暴露在外的疏水区域特异结合。研究表明Hsp70与底物多肽结合和释放过程，是依赖ATP水解为ADP的过程，无水解活性ATP类似物不能引起底物的释放。ATP的结合和水解可能调节了Hsp70对多肽底物的亲和力，而多肽和未折叠的蛋白质可以促进其ATPase活性<sup>[15,16]</sup>。Milarski以各结构的缺失体研究其在Hsp70中的作用如ATP结合部位、底物结合部位、细胞内定位等。如437-618位氨基酸的缺失导致Hsp70虽然可以在核内出现，但是没有在核仁区聚集；480-641位的多肽显示了正常的核仁定位，从而确定480-641部位与Hsp70和核仁区结合相关。最保守部位的氨基酸缺失(122-264)导致Hsp70ATP结合能力的丧失。351-414位缺失既影响ATP结合又影响细胞定位，可能是N端与C端的连接区域。具体突变部位及引起功能变化如下图<sup>[6]</sup>：

表1: Hsp70各结构缺失体细胞定位和生物特性, +: 有; -: 无

Table1. Summary of the Phenotypes and Biochemical Properties of Hsp70

## Mutants

mutant	Deleted Amino acid	Localization		Association		ATP binding
		Cytoplasmic	Nuclear	Nucleoli	Other nuclear	
CRI	504-641	+	+	+/-	-	+
NSC	5-479	+	+	+	+	-
SN	5-122	+	+	+	+	+
NF	122-264	+	+	+	+	-
PB	351-414	+	-	-	-	-
BC	415-479	+	+	+	+	+
SMA	437-617	+	+	-	-	+

同时Hsp70伴侣功能的发挥需要辅助伴侣的协助, 辅助伴侣通过催化ATP-Hsp70结合态和ADP-Hsp70结合态转换进一步调节其功能。Hsp70辅助分子伴侣有DnaJ、Hsp40、Bag-1、Hip和Hop等<sup>[17,18,19,20,21]</sup>。但是目前对ATP与Hsp70ATPase功能域的结合和水解引起底物结合功能域构象发生变化的机理仍不清楚。不同研究小组根据研究的不同内容尝试对Hsp70作用机理进行解释。Hartl以细菌中Hsp70同源体---DnaK作研究对象推测其机理。他认为首先辅助分子伴侣DnaJ识别未折叠的多肽, 靶向结合ATP的DnaK, DnaK-ATP与DnaJ-多肽的DnaJ的J功能域通过未确定的DnaK的结合位点相互作用, 然后把蛋白质底物转移到打开的DnaK-ATP底物结合袋中。DnaJ与DnaK相互作用刺激ATP的水解, 形成ADP结合状态DnaK。此时底物多肽、ADP-DnaK、DnaJ形成三聚体复合物。然后核苷交换因子GrpE催化DnaK结合的ADP释放, 三聚体复合物可能解聚, 释放DnaJ, 最后ATP结合到DnaK上同时底物释放。Hsp70的分子伴侣作用周期分析首先是用原核生物DnaK研究, 真核生物的Hsp70作用机理与原核生物相似, 辅助分子伴侣Hsp40与底物结合引导底物与Hsp70结合, Hsp40通过其保守的J结构域与Hsp70结合, 后促进Hsp70的ATP水解活性, 调节底物与Hsp70的结合与解离。但是GrpE类似物在真核生物细胞质、细胞核和内质网中却未找到, 可能真核细胞不需要GrpE的协助, 因为哺乳类动物Hsc70本身具有核苷酸交换活性<sup>[22,23,24]</sup>。图



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库