

## GroEL 的耗能分子伴侣机制\*

姚玲<sup>1)</sup> 蔺宗<sup>2)\*\*</sup> 傅正伟<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014; (<sup>2)</sup>浙江清华长三角研究院, 嘉兴 314000)

**摘要** 双环结构 GroEL 及其辅分子伴侣 GroES 是目前研究得最深入的分子伴侣。然而, GroEL/GroES 帮助蛋白质折叠的一些关键理化机制, 尤其是水解 ATP, GroEL 发生构象改变, 能否主动调节蛋白质错误折叠中间体的构象, 以促进错误折叠中间体的复性, 仍然存在争议。结合本研究组近年的工作, 作者着力介绍 GroEL 促进蛋白质折叠的主动解折叠机制。

**关键词** 蛋白质折叠, 分子伴侣, 主动解折叠, GroEL, GroES

**学科分类号** Q5, Q7

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2014.0143

尽管蛋白质的氨基酸序列包含着三级空间结构的信息<sup>[1]</sup>, 但是在细胞内的微环境中, 新生肽链却经常不能正确折叠。蛋白质折叠形成天然功能态分子, 是一个沿着“折叠漏斗”中某条轨迹, 不断降低自由能的过程<sup>[2-3]</sup>。对于某些蛋白质来说, 通过自发折叠形成天然功能态分子的发生概率很小, 更倾向于形成非天然态分子。这些非天然态蛋白通常会暴露出内部疏水区, 如果其自发折叠较慢或发生错误折叠时, 这些暴露的疏水面就可能发生聚集, 从少量分子形成的可逆聚集, 发展成为不可逆聚集。蛋白质发生不可逆的聚集, 不但影响细胞的结构与功能, 甚至引起细胞死亡。因此, 细胞需要一个高保真的纠错系统, 在这个纠错过程中, 分子伴侣<sup>[4]</sup>这类在某种刺激下产生的热休克蛋白<sup>[5]</sup>, 行使了重要的作用。

### 1 GroEL/ES

分子伴侣包括几类高度保守家族, 目前研究最深入的一类伴侣蛋白是 *Escherichia coli* 中的 GroEL (Hsp60)<sup>[6]</sup>。分子伴侣 GroEL 在新生肽链的折叠和组装以及变性蛋白的复性过程中发挥重要作用。细胞内许多蛋白质的折叠严格依赖 GroEL, 而不能被其他类别的分子伴侣替代<sup>[7]</sup>, 辅分子伴侣 GroES 参与 GroEL 帮助蛋白质折叠的过程, ATP 的水解为

之提供能量。在某一蛋白质不能自发折叠的情况下, GroEL 和辅分子伴侣 GroES 能促进蛋白质的折叠<sup>[8-10]</sup>。GroEL 具有 ATP 水解酶的活性部位, 可结合并水解 ATP, 同时 GroEL 发生构象改变<sup>[9-10]</sup>。

GroEL 和 GroES 均为多亚基环状结构分子。GroEL 由 14 个相同(57 ku)亚基组成双环圆柱状结构<sup>[11]</sup>, 7 个亚基组成一个环, 两个环以背靠背的形式结合, 形成两个空腔。GroES 是由 7 个相同(10 ku)亚基组成的一个圆盘状结构<sup>[12-13]</sup>。GroES 覆盖在 GroEL 空腔上。GroEL 结构按功能划分为三个区域: 顶部结构域、中间结构域和赤道结构域(图 1)。顶部结构域包含了非天然态蛋白和 GroES 的结合位点。赤道结构域含有 ATP 结合位点, 具有 ATP 酶活性。顶部结构域和赤道结构域通过细长的中间结构域相连, 中间结构域形成空腔, 两个空腔被赤道域和亚基 C 端的末尾隔开<sup>[14]</sup>。GroEL 的顶部结构域内表面拥有非极性氨基酸结合位点<sup>[14]</sup>, 这些疏水面对于捕获蛋白质折叠中间体非常关键<sup>[15]</sup>。

\* 国家自然科学基金面上项目(31370743), 浙江省自然科学基金杰出青年项目(LR12C05001)和嘉兴市科技计划项目(2012AZ1050)资助。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0573-82582761, E-mail: linzong@tsinghua-zj.edu.cn

收稿日期: 2014-05-21, 接受日期: 2014-05-28

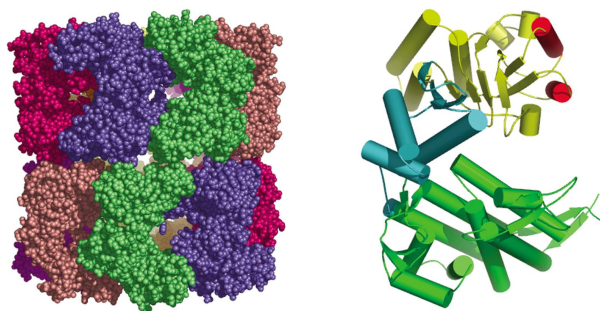


Fig. 1 The structure of GroEL

图 1 GroEL 的结构域

GroEL 的三个结构域: 顶部结构域、中间结构域和赤道结构域<sup>[8,14]</sup>.

## 2 GroEL 的工作循环

GroEL 顶部结构域内表面为非天然态蛋白提供了结合位点, 同时, 该区域也是 GroES 的结合位点<sup>[16]</sup>, 即非天然态蛋白与 GroES 在 GroEL 上的结合部位有重叠. 与 GroES 结合时, GroEL 需要发生构象结构变化, 即连接顶部与赤道结构域的铰链, 发生弯曲和扭转(图 2), 使得顶部结构域升高, 增大了密闭空腔. 这一构象变化需要 ATP 提供能量<sup>[9,17-18]</sup>. ATP 与 GroEL 的环结合, GroES 也随之结合到相同的环上, GroEL 的空腔闭合, 形成 GroEL-底物蛋白-GroES 三元复合物. GroEL 的结构变化对于大部分依赖 GroEL 折叠的底物蛋白来说是非常必要的<sup>[19-20]</sup>, 密闭空腔的形成成为非天然态蛋白提供了一种“无限稀释”的环境, 可以限制蛋白质折叠中间体发生聚集. 这种由 ATP 驱动的别构效应是 GroEL 行使分子伴侣功能的核心机制(图 3)<sup>[9,21]</sup>.

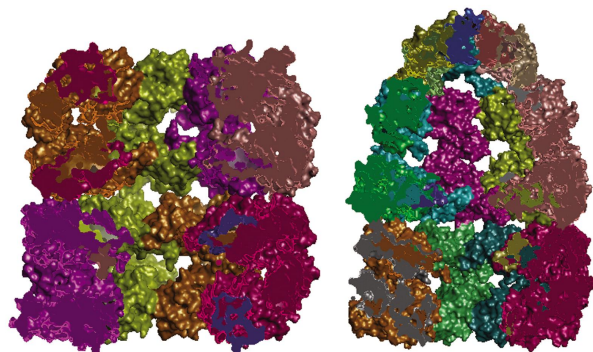


Fig. 2 Binding of GroES to a GroEL ring creates an enclosed and enlarged cavity

图 2 GroES 与 GroEL 结合及其闭增的空腔

GroEL-GroES 复合物结构. GroEL 双环结构, 分别为顺式环和反式环, 每个环由 7 个亚基组成; GroES 由 7 个亚基组成, 结合在 GroEL 顶部, 将蛋白质折叠中间体封闭在 GroEL 空腔内<sup>[8-9,22]</sup>.

GroEL 结构的变化会带来两方面的影响, 一是顶部域的变化使底物结合位点发生位移, 这种位移对于 GroES 结合到 GroEL 顶部结构域有利, 从而形成一个密闭且增大的空腔. 二是改变了空腔内壁上氨基酸残基的位置, 使 GroEL 内表面从疏水性转为亲水性, 掩盖了疏水多肽结合位点, 促进肽链的折叠<sup>[18]</sup>.

ATP 与双环中任何一个环结合, 都会抑制另一个环与 ATP 的结合. ATP 的水解产生 GroEL-GroES 顺式复合物非常稳定, 除非另一个环上发出解离的信号<sup>[9,23-24]</sup>, 随即反式环上开始新一轮的 ATP 结合.

“子弹型”不对称型 GroEL/GroES 复合物是循环反应中的经典结构, 对称 GroEL-(GroES)<sub>2</sub> 型复合物(橄榄球型复合物)极为少见, 有报道这种橄榄球型复合物与子弹型复合物共存的现象, 在这种球型复合物中, 底物蛋白在球型复合物的双环结构中完成折叠, 值得注意的是, 折叠是一个连续的两步反应, 其动力学参数与子弹型复合物中的也一致,

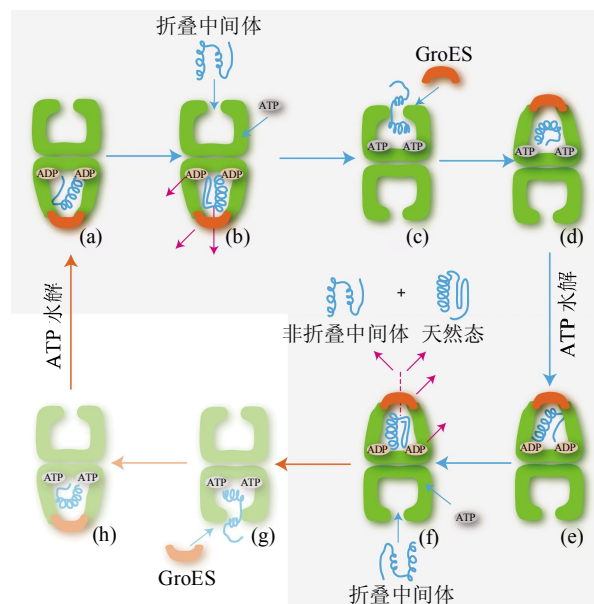


Fig. 3 The GroEL-GroES duty cycle

图 3 GroEL-GroES 的循环作用

GroEL 循环包含两个半循环过程(a~d 和 e~h), 一个环上 GroEL-GroES 顺式复合物的形成与另一个环上 GroEL-GroES 顺式复合物的解离同时发生. GroEL 空环(a)结合底物蛋白、GroES、ATP, 引起另一环上 ADP、GroES 和产物的解离(b). 底物蛋白进入 GroEL 空腔中(c, d), 顺式环上结合的 ATP 水解形成 ADP, 开始另一环的半循环(e~h). 第一个半循环进入 GroEL 空腔的蛋白折叠中间体的产物(e)在另一环开始形成新的顺式复合物时离开 GroEL (f)<sup>[11,22,25]</sup>.

说明在子弹型和橄榄球型复合物中可以发生相同的反应<sup>[24]</sup>.

### 3 GroEL 识别非天然态底物蛋白

通常能被 GroEL 识别并结合的蛋白都处于相对较松散的结构状态, 如完全去折叠的非天然蛋白或尚未折叠完成的蛋白中间体. 天然态蛋白不被 GroEL 所识别. 与 GroEL 相作用的蛋白具有较多暴露的疏水表面<sup>[9]</sup>, 而这些暴露的疏水表面位于天然态蛋白的内部. Hlodan 等<sup>[26]</sup>研究表明, GroEL 具有保护与其结合的底物免受蛋白酶水解, 这可能是底物的酶切位点与 GroEL 发生了紧密结合的缘故. GroEL 的最佳底物约为 20~60 ku, 底物的  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  发夹、一些延展的线性部分可能更易被 GroEL 顶部结构域识别<sup>[15, 26]</sup>. 这些局部结构都有疏水性侧链基团的暴露, 为 GroEL 的识别提供了基础. 在底物与 GroEL 的识别过程中, 这种疏水相互作用对捕获底物以及后续的促进折叠作用都是非常关键的.

### 4 GroEL 参与蛋白质的去折叠

目前认为, GroEL 对底物蛋白的去折叠存在三种机制(图 4). a. GroEL 可以在促进底物去折叠时不改变去折叠的速率<sup>[9, 27]</sup>. Walter 等用 RNase T1 突变体 RCAM-T1 作为底物, 因为其二硫键的缺失不能形成稳定的折叠结构, 而作为典型的折叠中间体模型. 实验发现, 加入 GroEL 后, RCAM-T1 开始去折叠, 但 GroEL 的加入并未改变 RCAM-T1 的去折叠速率. RCAM-T1 被牢牢地结合在 GroEL 上, 使平衡向着去折叠方向进行. b. GroEL 也可以促进底物蛋白去折叠的速率<sup>[22, 28]</sup>, 即折叠中间体不自发的发生去折叠, 一旦 GroEL 参与, 去折叠速率明显增高. c. GroEL 的主动解折叠机制, 即 ATP 驱动的 GroEL 顶部结构域的拉升和旋转, 主动将底物去折叠. 在这种机制下, 底物结合到 GroEL 环顶部, ATP 的结合引起 GroEL 结构发生变化, 使得结合在顶部结构域的底物被拉伸而去折叠<sup>[25, 29-31]</sup>.

### 5 GroEL 参与蛋白质的再折叠

GroEL 与小型分子伴侣的一个重要区别, 也是较多蛋白的折叠严格依赖 GroEL 的一个重要原因, 是 GroEL 不仅抑制底物聚集为蛋白质提供更多的复性机会, 还通过被动和主动的方式改变折叠中间

体的构象, 影响折叠过程和产率.

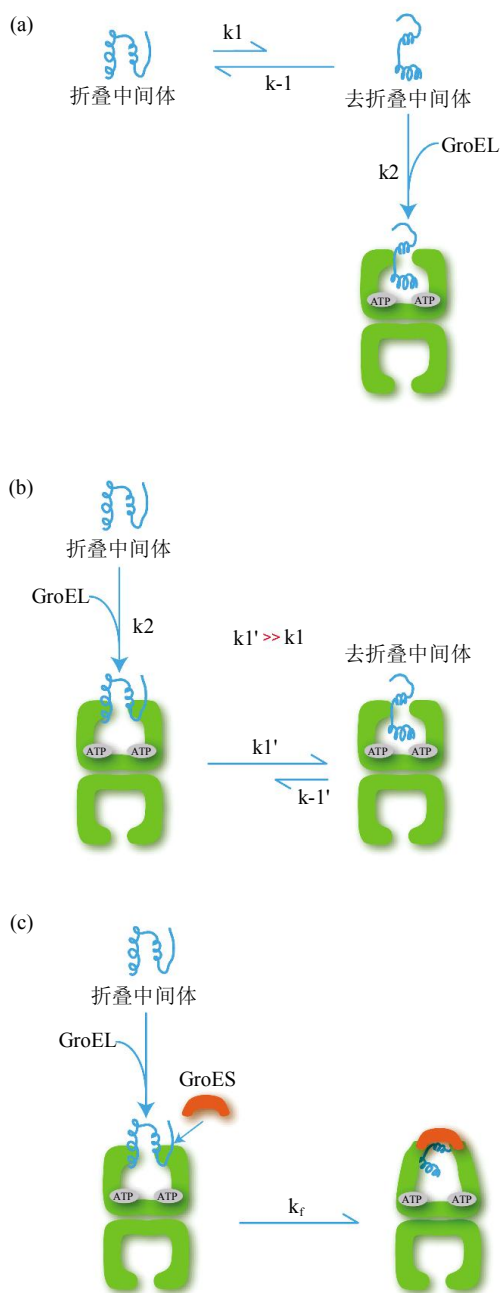


Fig. 4 Possible mechanisms of GroEL-induced protein unfolding

图 4 GroEL 引起的蛋白质去折叠的机制

(a)热力学机制. 蛋白质折叠中间体与一种结构更松散, 能与 GroEL 结合的折叠中间体达到动态平衡. GroEL 结合后者, 使得蛋白质倾向于去折叠的状态. 这种机制不会影响蛋白质本身解折叠速率. (b)催化机制. 折叠中间体不会自发地解折叠但能通过和 GroEL 结合, 与疏水的 GroEL 环作用使解折叠的速率有显著提升, 类似于酶的催化作用. (c)主动解折叠机制. 蛋白质折叠中间体首先与 GroEL 结合, 在结合了 ATP 和 GroES 后, GroEL 顶部结构域构象变化导致底物蛋白发生解折叠<sup>[25, 29-31]</sup>.



Anfinsen Cage 模型认为, GroEL 的空腔为底物提供了一个无限稀释的环境<sup>[4, 22]</sup>(图 2). 空腔可以避免底物与其他分子碰撞产生不可逆聚集的可能性, 为蛋白质提供了自复性折叠的无干扰环境. GroEL-GroES 的循环作用, 反复结合与释放蛋白质折叠中间体, 反复结合 ATP、水解 ATP、释放 ADP, 所形成的 GroEL 构象变化, 均不对错误折叠中间体的构象采取主动或被动的改变. 在这种情况下, GroEL 帮助复性折叠的速率可能和底物蛋白在没有聚合干扰时的自复性速率相同<sup>[22]</sup>. 然而, 那些严格依赖 GroEL 才能复性蛋白的研究数据表明, 在没有聚集干扰的条件下, 蛋白质折叠中间体并不能自主复性折叠, 仍然需要 GroEL 的帮助. 显然, 这与传统 Anfinsen Cage 模型的推论不相符合<sup>[22]</sup>.

改良 Anfinsen Cage 模型则认为, GroEL 空腔壁的特性可以限制蛋白质构象搜索的空间, 减少了搜索的时间; 或 GroEL 空腔壁的疏水表面与底物蛋白相互作用, 底物蛋白复性的速率可以被加快或减慢<sup>[22, 33-35]</sup>. 该模型仍然不认为 GroEL 构象的改变可对错误折叠中间体的构象有主动或被动的改变. Gupta 等<sup>[36]</sup>利用超低浓度底物蛋白(100 pmol/L)以排除聚集反应, 通过荧光共振能量转移和荧光相关光谱技术观察到, GroEL/ES 复合物通过 GroEL 空腔壁与底物蛋白的相互作用, 可以大大提高底物蛋白的折叠速率.

以上两种模型都没有承认 GroEL-GroES 复合体需要 ATP 结合、水解、ADP 的解离来主动帮助蛋白质折叠的机制<sup>[37-38]</sup>. Lorimer 等<sup>[39-40]</sup>曾经提出 GroEL 利用 ATP 的能量, 使底物蛋白解折叠, 其结果没有能够在 Horwich 等<sup>[41]</sup>邀请下所进行共同实验重复. Lorimer 等所提出的, 底物蛋白在被装入 GroEL 空腔之后发生去折叠的观点也未能获得一致的认同<sup>[29, 31, 42]</sup>. 一些数据显示, GroEL 主动帮助错误折叠复性中间体去折叠的现象, 发生在 GroEL 捕捉底物和 ATP 结合的两个阶段, 即在底物装入 GroEL 空腔之前<sup>[29, 31, 42]</sup>.

为验证 GroEL 主动去折叠作用是否能促进蛋白质折叠中间体的复性, Lin 等使用严格依赖 GroEL 才能复性的核酮糖 -1, 5- 二磷酸羧化酶 / 加氧酶(RuBisCO)和 GroEL 单环突变体(SR1)<sup>[23, 30-31]</sup>. 在 GroEL 单环突变体 SR1 中, 蛋白质折叠中间体被限制在 SR1-GroES 内部, 不能进行反复的释放与结合, 只发生一次主动去折叠, 但依旧可以形成天然态蛋白<sup>[23, 25, 31]</sup>. 由于选择了 RuBisCO 不能自主

复性的条件, RuBisCO 只能在 GroEL 空腔内折叠复性, 因此, 双环 GroEL 介导的复性过程为脉冲式. 在 GroEL 单环突变体 SR1 中, RuBisCO 不能被 GroEL 释放, 因而发生的是一个持续的复性过程. 在低温状态下, GroEL 单环突变体帮助复性的效率大大高于双环循环的野生型 GroEL. 随温度的增加, 双环循环速度加快, 主动解折叠次数增加. 虽然 RuBisCO 在 GroEL 内驻留时间的比例并未显著增加, 但由于主动解折叠的作用, 野生型 GroEL 帮助折叠的效率可增加 20 倍. 相比之下, GroEL 单环突变体帮助复性的效率则无明显变化(图 5)<sup>[31]</sup>.

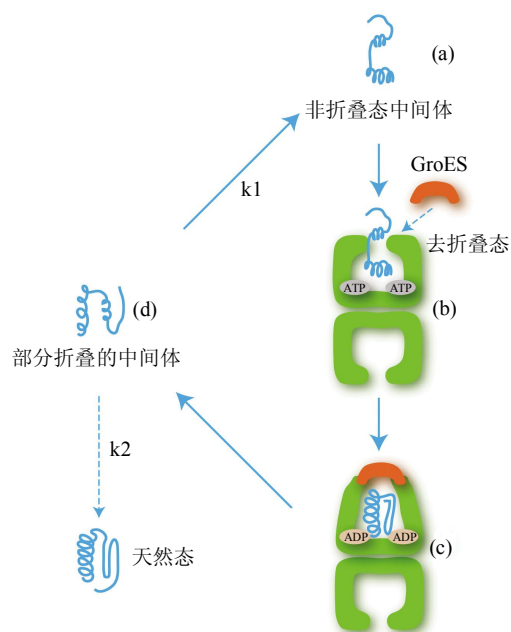


Fig. 5 Stimulation of protein folding by repetitive unfolding

图 5 反复解折叠提高蛋白质折叠速率

错误折叠中间体(a)与 GroEL 结合后(b)发生解折叠并被装入 GroEL (c). 从 GroEL 中释放后重新获得折叠的机会, 形成天然蛋白或重新与 GroEL 结合(d). 双环 GroEL 重新结合底物蛋白质折叠中间体并重复进行解折叠的过程, 能够提高蛋白质复性折叠的速率<sup>[29, 31]</sup>.

## 7 展 望

近年来, GroEL 开始被应用到医学领域. Johnson 等<sup>[42]</sup>对 70 万种小分子抑制剂进行高通量筛选, 发现其中有 235 种抑制剂能阻碍 GroEL/GroES 的复性循环, 其中有 21 种复合物能够强效抑制蛋白质复性, 这为研发分子探针应用于伴侣蛋白的生化 and 生理作用研究迈出重要的一步.

GroEL 除了在蛋白质折叠中发挥重要作用,

GroEL 在共生微生物和宿主之间的相互作用以及致病性方面也起到一定的作用<sup>[43]</sup>。在对芽胞梭状杆菌引起的疾病研究过程中, 利用重组 GroEL, 对小鼠进行鼻内免疫, 发现其芽孢杆菌在肠道中明显减少, GroEL 对免疫系统的影响, 将会促进其在免疫研究中的作用<sup>[44]</sup>。近期研究发现, 嗜线虫致病杆菌分泌一种 XnGroEL 蛋白, 这种蛋白与 GroEL 同源, 口服 XnGroEL 能够使棉铃虫幼虫的生长发育停止。将编码 XnGroEL 的基因导入到烟草基因组中, 可以使幼虫的死亡率达到 100%, 植株的损伤率降低 55%~70%<sup>[45]</sup>。

GroEL 介导的蛋白质再折叠机制目前依然知之甚少。然而, GroEL 可以为底物蛋白提供一个避免聚集的“无限稀释”的环境, 同时 GroEL 空腔内壁的物理性质可以改变蛋白质折叠构象搜索空间。GroEL 如何利用 ATP 的能量改变自身的构象, 来主动调节错误折叠中间体的结构<sup>[46]</sup>, 帮助蛋白质折叠的理化机制仍然有待于进一步阐明<sup>[28,47]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Anfinsen C B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 1973, **181**(4096): 223-230
- [2] Fukunishi Y. Folding-unfolding energy change of a simple sphere model protein and an energy landscape of the folding process. *Proteins*, 1998, **33**(3): 408-416
- [3] Bryngelson J D, Onuchic J N, Socci N D, *et al.* Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins*, 1995, **21**(3): 167-195
- [4] Ellis R J, van der Vies S M. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 1991, **60**: 321-347
- [5] Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol*, 2003, **27**(6-7): 449-464
- [6] Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C. The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol*, 1989, **171** (3): 1379-1385
- [7] Azia A, Unger R, Horovitz A. What distinguishes GroEL substrates from other *Escherichia coli* proteins?. *FEBS J*, 2012, **279**(4): 543-550
- [8] Sigler P B, Xu Z, Rye H S, *et al.* Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 581-608
- [9] Fenton W A, Horwich A L. GroEL-mediated protein folding. *Protein Science*, 1997, **6**(4): 743-760
- [10] Hayer-Hartl M K, Weber F, Hartl F U. Mechanism of chaperonin action: GroES binding and release can drive GroEL-mediated protein folding in the absence of ATP hydrolysis. *EMBO J*, 1996, **15**(22): 6111-6121
- [11] Ryabova N A, Marchenkov V V, Marchenkova S Y, *et al.* Molecular chaperone GroEL/ES: unfolding and refolding processes. *Biochemistry (Mosc)*, 2013, **78**(13): 1405-1414
- [12] Harrison C J. La cage aux fold: asymmetry in the crystal structure of GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub>. *Structure*, 1997, **5**(10): 1261-1264
- [13] Xu Z, Horwich A L, Sigler P B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES- (ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature*, 1997, **388**(6644): 741-750
- [14] Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, *et al.* The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*, 1994, **371** (6498): 578-586
- [15] Farr G W, Furtak K, Rowland M B, *et al.* Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL. *Cell*, 2000, **100**(5): 561-573
- [16] Fenton W A, Kashi Y, Furtak K, *et al.* Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*, 1994, **371**(6498): 614-619
- [17] Chen S, Roseman A M, Hunter A S, *et al.* Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature*, 1994, **371**(6494): 261-264
- [18] Horwich A L, Farr G W, Fenton W A. GroEL-GroES-mediated protein folding. *Chem Rev*, 2006, **106**(5): 1917-1930
- [19] Motojima F, Chaudhry C, Fenton W A, *et al.* Substrate polypeptide presents a load on the apical domains of the chaperonin GroEL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(42): 15005-15012
- [20] Chaudhry C, Farr G W, Todd M J, *et al.* Role of the gamma-phosphate of ATP in triggering protein folding by GroEL-GroES: function, structure and energetics. *EMBO J*, 2003, **22** (19): 4877-4887
- [21] Saibil H R, Fenton W A, Clare D K, *et al.* Structure and allostery of the chaperonin GroEL. *J Mol Biol*, 2013, **425**(9): 1476-1487
- [22] Lin Z, Rye H S. GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2006, **41** (4): 211-239
- [23] Rye H S, Burston S G, Fenton W A, *et al.* Distinct actions of *cis* and *trans* ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature*, 1997, **388**(6644): 792-808
- [24] Ishino S, Kawata Y, Ikegami T, *et al.* Evaluation of the stability of an SR398/GroES chaperonin complex. *J Biochem*, 2014, **155** (5): 295-300
- [25] Lin Z, Puchalla J, Shoup D, *et al.* Repetitive protein unfolding by the trans ring of the GroEL-GroES chaperonin complex stimulates folding. *J Biol Chem*, 2013, **288**(43): 30944-30955
- [26] Hlodan R P, Tempst P, Hartl F U. Binding of defined regions of a polypeptide to GroEL and its implications for chaperonin-mediated protein folding. *Nat Struct Biol*, 1995, **2**(7): 587-595
- [27] Bhutani N, Udgaonkar J B. A thermodynamic coupling mechanism can explain the GroEL-mediated acceleration of the folding of barstar. *J Mol Biol*, 2000, **297**(5): 1037-1044
- [28] Jewett A I, Shea J E. Reconciling theories of chaperonin accelerated folding with experimental evidence. *Cell Mol Life Sci*, 2010, **67**(2): 255-276
- [29] Lin Z, Rye H S. Expansion and compression of a protein folding intermediate by GroEL. *Mol Cell*, 2004, **16**(1): 23-34

- [30] Lin Z, Madan D, Rye H S. GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(3): 303–311
- [31] Madan D, Lin Z, Rye H S. Triggering protein folding within the GroEL-GroES complex. *J Biol Chem*, 2008, **283** (46): 32003–32013
- [32] Tyagi N K, Fenton W A, Deniz A A, *et al.* Double mutant MBP refolds at same rate in free solution as inside the GroEL/GroES chaperonin chamber when aggregation in free solution is prevented. *FEBS Letters*, 2011, **585**(12): 1969–1972
- [33] Young J C, Agashe V R, Siegers K, *et al.* Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**(10): 781–791
- [34] Motojima F, Motojima-Miyazaki Y, Yoshida M. Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(39): 15740–15745
- [35] Tian J, Garcia A E. Simulation studies of protein folding/unfolding equilibrium under polar and nonpolar confinement. *J Am Chem Soc* 2011, **133**(38): 15157–15164
- [36] Gupta A J, Haldar S, Milicic G, *et al.* Active cage mechanism of chaperonin-assisted protein folding demonstrated at single molecule level. *J Mol Biol*, 2014, **426**(15): 2737–2754
- [37] Skjaerven L, Muga A, Reuter N, *et al.* A dynamic model of long-range conformational adaptations triggered by nucleotide binding in GroEL-GroES. *Proteins*, 2012, **80**(10): 2333–2346
- [38] Takei Y, Iizuka R, Ueno T, *et al.* Single-molecule observation of protein folding in symmetric GroEL-(GroES)<sub>2</sub> complexes. *J Biol Chem*, 2012, **287**(49): 41118–41125
- [39] Thirumalai D, Lorimer G H. Chaperonin-mediated protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2001, **30**: 245–269
- [40] Shtilerman M, Lorimer G H, Englander S W. Chaperonin function: folding by forced unfolding. *Science*, 1999, **284**(5415): 822–825
- [41] Park E S, Fenton W A, Horwich A L. No evidence for a forced-unfolding mechanism during ATP/GroES binding to substrate-bound GroEL: no observable protection of metastable Rubisco intermediate or GroEL-bound Rubisco from tritium exchange. *FEBS Letters*, 2005, **579**(5): 1183–1186
- [42] Johnson S M, Sharif O, Mak P A, *et al.* A biochemical screen for GroEL/GroES inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, **24** (3): 786–789
- [43] Kupper M, Gupta S K, Feldhaar H, *et al.* Versatile roles of the chaperonin GroEL in microorganism-insect interactions. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, **353**(1): 1–10
- [44] Pechine S, Hoysl S, Collignon A, *et al.* Immunization using GroEL decreases *Clostridium difficile* intestinal colonization. *PLoS One*, 2013, **8**(11): e81112
- [45] Kumari P, Kant S, Zaman S, *et al.* A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. *Transgenic Research*, 2014, **23**(1): 99–107
- [46] Zhang Q, Chen J, Kuwajima K, *et al.* Nucleotide-induced conformational changes of tetradecameric GroEL mapped by H/D exchange monitored by FT-ICR mass spectrometry. *Sci Rep*, 2013, **3**: 1247
- [47] Clare D K, Vasishtan D, Stagg S, *et al.* ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin. *Cell*, 2012, **149**(1): 113–123

## GroEL-Assisted Protein Folding by Utilizing The Energy From ATP\*

YAO Ling<sup>1)</sup>, LIN Zong<sup>2)\*\*</sup>, FU Zheng-Wei<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

<sup>2)</sup> Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314000, China)

**Abstract** The biological function of a protein depends not only on the correct primary amino acid sequence, but also on achieving its native three-dimensional structure. Thus, correct folding of a protein is of great significance to life activities. Due to the complex and crowded intracellular environment, the folding of many proteins is often difficult *in vivo*. One category of proteins, called chaperones, help other proteins to fold correctly. Chaperones can recognize and stabilize other instable protein to assist its folding. Recent studies showed that, the ring-shaped chaperone GroEL can repetitively unfolding kinetically trapped protein folding intermediate, giving the intermediate another chance to refold, thus increases its overall folding rate. The detailed mechanism of GroEL assisted folding is still under controversy. In this review, we briefly summarize the recent progress in the study of the latter mechanism.

**Key words** protein folding, molecular chaperone, positive unfolding, GroEL, GroES

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2014.0143

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31370743), Zhejiang Natural Science Foundation (LR12C05001) and Jiaxing Science and Technology Program (2012AZ1050).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-573-82582761, E-mail: linzong@tsinghua-zj.edu.cn

Received: May 21, 2014 Accepted: May 28, 2014