

基于均相时间分辨荧光技术 (HTRF) 的 HSP90-HOP 相互作用抑制剂活性测试方法的构建及其应用

王慧洁¹, 周子涵³, 徐嘉辰¹, 姜 奋¹, 尤启冬^{1,2*}, 徐晓莉^{1,2*}

(中国药科大学 1. 药物分子设计与成药性优化重点实验室, 2. 药物化学系, 江苏 南京 210009;
3. 南京外国语学校, 江苏 南京 210008)

摘要: 热休克蛋白 90 (HSP90) 是细胞内大量表达的一类蛋白, 其主要功能是辅助细胞内其他蛋白 (客户蛋白) 的成熟。HSP90 的众多客户蛋白与肿瘤的发生发展有重要的关系, 因此抑制 HSP90 的功能可以使这些癌症相关蛋白降解, 从而诱导肿瘤细胞凋亡, 达到治疗肿瘤的目的。HSP90 在发挥功能时还需要与辅伴侣蛋白 HOP 相互作用, 因此靶向 HSP90-HOP 的相互作用开展抑制剂研发成为抑制 HSP90 伴侣系统的新策略。本文基于均相时间分辨荧光技术 (HTRF) 构建了稳定的用于测试 HSP90-HOP 相互作用抑制剂活性的方法, 并用该方法研究了 HSP90 C-端五肽 MEEVD 及其突变肽段对 HSP90-HOP 相互作用的抑制活性, 为新型 HSP90-HOP 相互作用抑制剂的筛选和发现提供了重要基础。

关键词: 热休克蛋白 90; HOP; 均相时间分辨荧光技术; 蛋白-蛋白相互作用

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0592-06

HTRF-based method for determination of HSP90-HOP inhibition activity and its application

WANG Hui-jie¹, ZHOU Zi-han³, XU Jia-chen¹, JIANG Fen¹, YOU Qi-dong^{1,2*}, XU Xiao-li^{1,2*}

(1. Jiang Su Key Laboratory of Drug Design and Optimization, 2. Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Nanjing Foreign Language School, Nanjing 210008, China)

Abstract: HSP90 is widely expressed in cells with the main function in assisting the maturation of other proteins that are called clients. Many clients play critical roles in the occurrence and development of cancer. Inhibition of HSP90 can lead to degradation of the oncogenic proteins, and result in potent anti-cancer effects. HSP90-HOP interaction is critical for the chaperone function of HSP90, thereby disruption of the HSP90-HOP interaction is a novel strategy in the inhibition of HSP90. Based on the technology of homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF), we developed a new assay for the identification of new inhibitors of HSP90-HOP interaction. This method was evaluated in the study of the HSP90-HOP inhibition activity of the pentapeptide MEEVD from HSP90 C-terminal and its derivatives. This study can provide a basis for the screening and discovery of novel HSP90-HOP disruptors.

Key words: heat shock protein 90; HSP-organizing protein; homogeneous time-resolved fluorescence; protein-protein interaction

收稿日期: 2016-12-09; 修回日期: 2017-01-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81502990, 81573346); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20150691); 江苏省博士后基金资助项目 (1501033C).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271351, E-mail: youqd@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1177

HSP90 (heat shock protein 90) 是细胞内大量表达的一类分子伴侣蛋白, 其主要功能是对细胞内的其他蛋白 (客户蛋白) 进行折叠加工, 对于客户蛋白的成熟起着非常重要的作用^[1-3]。众多的 HSP90 客户蛋白与肿瘤的发生发展有密切的关系, 抑制 HSP90 的功能可以使与癌症相关的客户蛋白通过泛素化途径降解, 诱导肿瘤细胞发生凋亡, 从而达到抗肿瘤效果^[4-9]。

HSP90 在发挥生物学功能时, 需要辅伴侣分子 (co-chaperones) 的参与, 二者相互作用后, 才能对客户蛋白进行加工。HOP (HSP-organizing protein) 作为重要的 HSP90 辅伴侣分子, 介导客户蛋白由 HSP70 向 HSP90 的转移。其主要通过 TPR2A 结构域与 HSP90 的 C-端结合, 抑制 HSP90-HOP (TPR2A) 的相互作用就可以阻断 HSP90 对客户蛋白的加工, 使其通过泛素化途径降解^[10, 11]。目前已有抑制 HSP90-HOP (TPR2A) 相互作用的小分子抑制剂被报道, 并对 Her2 高表达的乳腺癌细胞株有很好的抗增殖活性^[12]。这表明抑制 HSP90-HOP (TPR2A) 相互作用是一种有效的抗肿瘤策略。

HSP90 主要通过 C-端的 MEEVD 五肽序列与 HOP 蛋白上的 TPR2A 结构域结合, 解离常数 (K_d) 为 $11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[13]。MEEVD 五肽与 HOP (TPR2A) 的晶体复合物显示, 五肽以一个伸展的构象占据 TPR2A 结构域的凹槽^[14, 15]。因此, 可以将 MEEVD 五肽作为模板分子来开展 HSP90-HOP 相互作用抑制剂研究。

在药物研发中, 化合物的活性测试方法起着非常重要的作用, 因此构建稳定的活性测试方法是开展对 HSP90-HOP 相互作用热区探索及抑制剂开发的关键。此前, Cortajarena 等^[13]报道了利用 Alphascreen 方法筛选并得到嘧啶并三酮类抑制剂的研究, 这是目前唯一一种 HSP90-HOP 相互作用抑制剂活性测定方法。Alphascreen 方法存在一定的不足, 该方法对测试仪器要求较高、操作繁琐、检测试剂昂贵, 且反应体系对于强光或是长时间室内光比较敏感。因此, 建立操作简单、灵敏可靠的 HSP90-HOP 相互作用抑制剂活性测试方法, 实现多方法联用、多层次交叉验证的评价体系对于靶向 HSP90 系统开发药物研究至关重要。

基于以上研究现状及需求, 本研究建立了基于均相时间分辨荧光技术 (HTRF) 的 HSP90-HOP 相互作用抑制剂活性测试方法, 该方法具有稳定、经济、操作简便的特点, 可以用于 HSP90-HOP 相互作用抑制剂的活性评价。用该方法对 HSP90-HOP 相互作用的关键热区进行了探索, 结果表明电性相互作用是两个蛋白之间的主要作用力, 为进一步的

HSP90-HOP 相互作用抑制剂发现提供了研究基础。

材料与方法

药品与试剂 *Escherichia coli* BL21 (CD601-03, 广州潘峰生物科技有限公司)、TPR2A 蛋白原核表达质粒 (南京金斯瑞公司构建)、HSP90 C-端原核表达质粒 (addgene, plasmid: 22483)、Anti-GST-Cryptate (61GSTKLA, CISBIO)、Anti-6His-XL665 (61HISXLA, CISBIO)、MEEVD 及其突变肽段 (南京海星利技术有限公司)。

仪器 酶标仪 (Molecular Device)、384 孔板 (Greiner#784076)。

利用 HTRF 技术检测 HSP90 与 TPR2A 的相互作用 当带有 His 标签的 HSP90 C-端蛋白和带有 GST 标签的 HOP (TPR2A) 蛋白相互作用时 (空间距离小于 10 nm), Anti-6His-XL665 受体磁珠和 Anti-GST-Cryptate 供体磁珠也会相应靠近, 从而发生共振能量转移 (FRET) 现象。供体磁珠荧光分子的激发将诱发受体分子发出荧光, 同时供体荧光分子自身的荧光强度衰减。当抑制剂分子阻断 HSP90 和 HOP 的相互作用时, FRET 现象减弱。因此, FRET 现象的强弱可以反映抑制剂分子对两个蛋白相互作用抑制作用的强弱。

HSP90 C-端蛋白与 HOP (TPR2A) 蛋白相互作用最适浓度摸索 采用交叉滴定实验考察两个蛋白在 384 孔板中的最适反应浓度。实验体系为 20 μL , 其中包括 4 μL GST-tagged HSP90、4 μL His-tagged TPR2A、4 μL Anti-6His-XL665、4 μL Anti-GST-Cryptate 和 4 μL 缓冲液 (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KF)。HOP (TPR2A) 蛋白从 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 起梯度稀释 9 个浓度, HSP90 蛋白从 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 起梯度稀释 5 个浓度, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振摇孵育 1 h, 加入检测试剂后室温避光孵育 0.5 h, 扫板并记录荧光数值。

缓冲液中氟化钾 (KF) 浓度对 HTRF 荧光值的影响 KF 是 HTRF 实验中荧光基团钨穴状化合物的保护剂, 其浓度对荧光值有显著影响。在不影响反应有效性的前提下, 减小 KF 浓度有助于提高筛选灵敏性。将 KF 浓度从 400 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 起梯度稀释 10 个浓度, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振摇孵育 1 h, 加入检测试剂后室温避光孵育 0.5 h, 扫板并记录荧光数值, 检测 KF 浓度对反应窗的影响。

DMSO 浓度对 HTRF 荧光值的影响 DMSO 作为化合物的溶剂, 其浓度对实验结果有不可忽视的影响。为了排除 DMSO 对检测信号的影响, 将 DMSO 使用浓度设置为 10%、5%、2.5%、1.25%、0, 检测

其对反应窗的影响。

Z 因子的测定 Z-因子 (Z-factor) 是评估测试方法质量的主要参数, 为了评价所构建 HTRF 方法测试 HSP90-HOP 蛋白-蛋白相互作用抑制剂活性的稳定性, 本研究计算了该方法的 Z 因子。实验设计如下, 空白对照 (12 μL 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KF、4 μL Anti-6His-XL665、4 μL Anti-GST-Cryptate), 阴性对照 (4 μL GST-tagged HSP90、4 μL His-tagged TPR2A、4 μL Anti-6His-XL665、4 μL Anti-GST-Cryptate、4 μL 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KF), 阳性对照 (4 μL MEEVD 五肽、4 μL GST-tagged HSP90、4 μL His-tagged TPR2A、4 μL Anti-6His-XL665、4 μL Anti-GST-Cryptate)。每块 384 孔板上都含有 100 个阳性对照和 100 个阴性对照孔, 计算而得的平均值、SD 和 CV 都是作为评估均一性和稳定性的重要参数。

采用建立的 HTRF 测试方法研究 HSP90-HOP (TPR2A) 的结合热区 基于上述建立的 HTRF 测试方法, 对 HSP90-HOP (TPR2A) 的结合热区进行研究。以 HSP90 C-端的 MEEVD 五肽为模板, 对其进行氨基酸突变, 获得 9 个多肽。将其加入 384 孔板, 每个浓度 5 个复孔, 加入 HSP90 蛋白 (终浓度为 375 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 TPR2A 蛋白 (终浓度为 625 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), DMSO 浓度为 0.2%, 每孔体积共 20 μL 。每块板设置以下几种对照: 空白对照 (12 μL 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KF、4 μL Anti-6His-XL665、4 μL Anti-GST-Cryptate), 阴性对照 (4 μL GST-tagged HSP90、4 μL His-tagged TPR2A、4 μL Anti-6His-XL665、4 μL Anti-GST-Cryptate、4 μL 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KF), 阳性对照 (4 μL MEEVD、4 μL GST-tagged HSP90、4 μL His-tagged TPR2A、4 μL Anti-6His-XL665、4 μL Anti-GST-Cryptate)。

数据统计和分析 测试数据是根据两束不同波长光的信号比计算得到: $(\text{Signal } 665 \text{ nm}/\text{Signal } 620 \text{ nm}) \times 10\,000$ 。HTRF 实验数据分析使用 Prism 软件 (GraphPad 5.0, Inc. San Diego, CA), IC_{50} 数据是以 $\text{LogC}[\text{Inhibitor}]$ 为横坐标、以信号值为纵坐标进行计

算。为了确定实验的重复性, 所有的实验都设置 5 个复孔。Z 因子的计算公式如下:

$$Z = 1 - \frac{3 * \text{SD}_{\text{negative}} + 3 * \text{SD}_{\text{positive}}}{\text{Mean}_{\text{negative}} - \text{Mean}_{\text{positive}}}$$

结果与讨论

1 HSP90 C-端蛋白与 HOP (TPR2A) 蛋白相互作用最适浓度

当 HSP90 C-端蛋白浓度不变时, 荧光信号值随着 HOP (TPR2A) 蛋白浓度的变化呈现抛物线状变化。同样, 当 HOP (TPR2A) 蛋白浓度不变时, 荧光信号值随着 HSP90 C-端蛋白浓度也呈现抛物线状变化, 当 HOP 蛋白浓度达到最高时, 信号值几乎达到平衡。在 HSP90 C-端蛋白和 TPR2A 蛋白浓度分别为 375 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、625 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时信号值达到最大 1 772.83 (图 1)。在此条件下, 实验的灵敏度最高, 因此选择此蛋白浓度作为后续的实验浓度。

2 缓冲液中 KF 浓度对信号值的影响

随着缓冲液中 KF 浓度的增大, 检测信号值升高, 但在 KF 浓度为 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时信号值达到稳定。为了最大程度减少对实验结果的影响, 选择 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KF 浓度作为后续的实验浓度 (图 2A)。

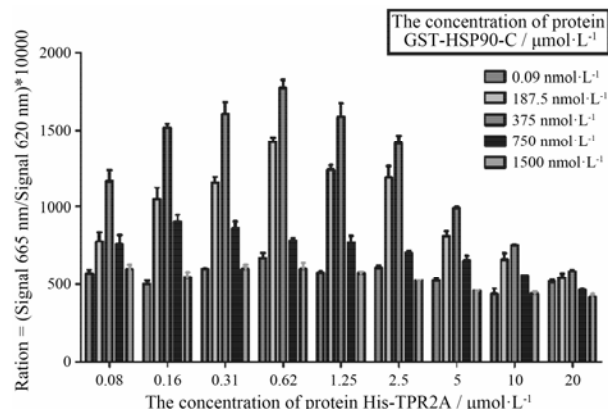


Figure 1 Effect of different concentrations of HSP90/TPR2A proteins on the homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay window

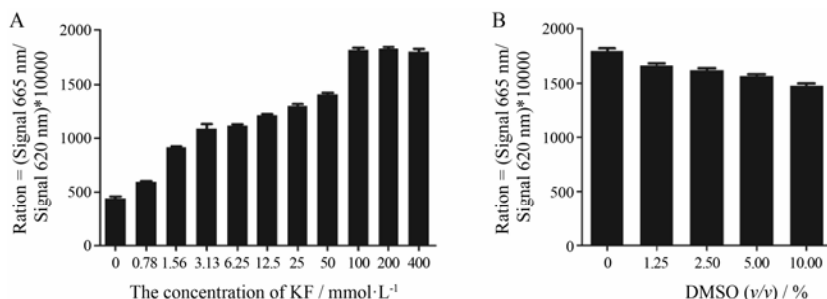


Figure 2 Effect of different concentrations of KF (A) and DMSO (B) on the assay window

3 体系中 DMSO 浓度对检测信号值的影响

如图 2B 所示, 体系中 DMSO 含量由 0 增加到 10%, 检测信号值没有明显降低, 表明该实验体系对 DMSO 的含量有较强的耐受性。

4 测试方法稳定性分析

平均值、SD 和 CV 都是作为评估均一性和稳定性的重要参数, 如图 3 所示, 阳性参照的信号平均值为 525.34, 标准偏差为 48.33, 而阴性参照的平均值为 1778.54, 标准偏差为 71.99。所有的 CV 误差值都小于 10%, 处于分子生物学检测试验可接受的范围。连续检测 2 h, Z 因子都稳定为 0.71, 这也说明了该方法是均一稳定的。

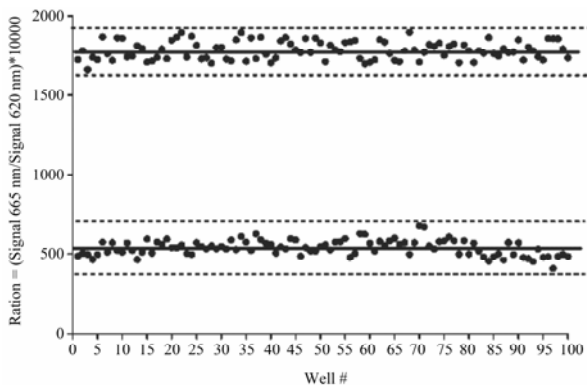


Figure 3 Intra-variance of 100 negative controls (upper layer) and positive controls (down layer) were determined. The solid line represents the mean value of the positive and negative controls and the dashed line represents 3 standard deviations. According to these data, the Z factor values were calculated

5 HSP90 C-端内源 MEEVD 五肽活性测试

MEEVD 五肽序列是 HSP90 C-端的内源性肽段, 可以与 HOP 蛋白的 TPR2A 基序结合, 因此该肽段可以与 HSP90 C-端蛋白竞争性地与 HOP 蛋白结合。本研究应用上述实验方法测试该肽段对 HSP90 C-端与 HOP 蛋白相互作用的抑制活性。如图 4 所示, 本实验

中 MEEVD 五肽对 HSP90 (CT)-HOP (TPR2A) 的蛋白-蛋白相互作用的抑制作用呈现浓度依赖性, 其 IC_{50} 值为 $14.28 \pm 1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与文献^[11]报道的亲和力 $11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处于同一数量级。随着孵育时间的延长, 信号值响应越明显。结果表明, 该实验方法可以准确地测试出 HSP90 (CT)-HOP (TPR2A) 抑制剂的活性, 可以用于后期的活性测试。

6 HSP90-HOP (TPR2A) 相互作用热区探索及 MEEVD 五肽衍生肽段构效关系研究

蛋白-蛋白相互作用热区的研究是开发蛋白-蛋白相互作用调控剂的研究基础。目前研究人员已经获得了 HSP90 C-端 MEEVD 五肽与 HOP 上 TPR2A 基序的晶体复合物 (图 5), 但 MEEVD 五肽中每个氨基酸残基对两个蛋白结合的重要性尚不清楚。

为了研究 MEEVD 五肽中每个氨基酸残基对两个蛋白结合的重要性, 指导开展基于结构的合理药物设计, 对 MEEVD 五肽序列进行了氨基酸位点突变, 设计得到了 9 个衍生肽段, 并利用上述方法对肽段进行活性测试, 结果如表 1 所示。

晶体复合物显示, MEEVD 五肽以一个伸展的构象占据 TPR2A 结构域的凹槽 (图 5)。将末端的 Asp

Table 1 Inhibition of HSP90(CT)-HOP(TPR2A) by MEEVD pentapeptide mutant peptides

No.	Peptide	Inhibition rate ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	Ac-MEEVD-COOH	99%
2	Ac-MEEVD-COO-NH2	29%
3	Ac-MEEVN-COOH	49%
4	Ac-MEEVN-COO-NH2	0%
5	Ac-MEEAD-COOH	15%
6	Ac-MEEID-COOH	90%
7	Ac-MAVD-COOH	82%
8	Ac-MAEVD-COOH	40%
9	Ac-EEVD-COOH	54%
10	Ac-LEEVD-COOH	85%

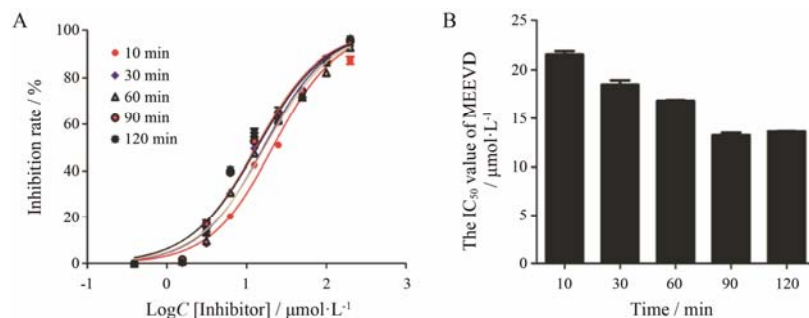


Figure 4 Competition of MEEVD with HSP90(CT) for the binding to TPR2A. MEEVD dose-response curves generated at different time (A). Time for the competition assay to reach equilibrium. IC_{50} values obtained at different time intervals were plotted using a bar graph (B)

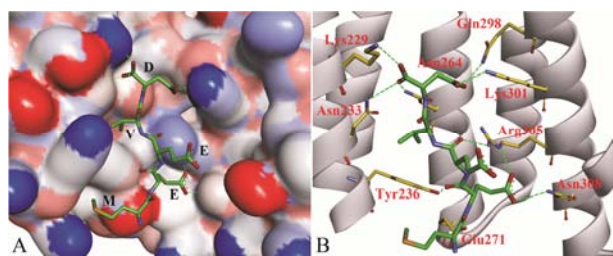


Figure 5 Crystal structure and interaction analysis of HSP90 C-terminal pentapeptide MEEVD with HOP (TPR2A)

标记为 0 位, Val、Glu、Glu、Met 顺次标记为-1 位、-2 位、-3 位、-4 位。0 位 Asp 与 HOP (TPR2A) 结构域中的 Lys229、Asn264、Gln298、Lys301 形成强的氢键网络, 可能对两个蛋白的结合提供主要作用。为了验证 0 位 Asp 的重要性, 本研究将 Asp 的两个羧基分别突变为酰胺基或者同时突变为酰胺基得到了肽段 2~4。活性测试结果表明, 0 位 Asp 末端的两个羧基分别突变为两个酰胺基 (肽 2 和肽 3) 后, 肽段的活性都大幅降低。如果将两个羧基都突变为酰胺基 (肽 4), 肽段的活性骤降至无。这表明 0 位 Asp 的两个羧基对于肽段与 HOP (TPR2A) 的相互作用具有非常重要的作用, 后期设计小分子抑制剂也需要具有此药效特征。-1 位 Val 上异丙基占据一个小的疏水性口袋, 提供部分疏水性相互作用, 将其突变为 Ala 或 Ile, 考察异丙基提供的疏水性作用的重要性。测试结果表明, 将此 Val 突变为 Ala (肽 5), 肽段的活性显著降低, 将其突变为有更大疏水性片段的 Ile (肽 6), 肽段的活性得到保持。这说明-1 位 Val 上异丙基提供的疏水相互作用对于肽段活性的保持非常重要, 后期小分子抑制剂上引入疏水性取代基占据这个小的疏水性口袋可能有助于提高化合物的活性。-2 位 Glu 伸入溶剂区, 与蛋白没有明显相互作用, 其对结合的重要性可能较小, 将其突变为 Ala (肽 7), 考察其对结合的贡献。测试结果显示肽段的活性稍有降低, 这与猜想是一致的, 后期设计小分子化合物无需保持这个药效特征。-3 位的 Glu 与 Arg305 和 Asn308 形成强的氢键网络, 对两个蛋白的结合应该有较大贡献。将其突变为 Ala 后 (肽 8), 肽段的活性大幅降低, 表明-3 位 Glu 对于肽段活性的保持很重要。-4 位的 Met 占据一个小的疏水口袋, 与蛋白形成疏水相互作用。为了考察此疏水作用对于两个蛋白结合的重要性, 设计了肽 9 和肽 10。将此 Met 去掉后 (肽 9), 肽段的活性大幅降低, 将其突变为疏水性更大的 Leu 后活性稍有降低 (肽 10), 表明-4 位 Met 提供的疏水作用对两个蛋白的结合非常重要。这些突变肽段

的构效关系可以为今后开展 HSP90-HOP (TPR2A) 小分子抑制剂的设计提供指导。

小结

本文建立了基于 HTRF 技术的 HSP90-HOP 相互作用抑制剂活性测试方法, 该方法具有灵敏度高、稳定性好、操作简便等特点, 可以用于靶向 HSP90-HOP (TPR2A) 相互作用抑制剂的高通量筛选和活性测试研究。该测试方法测试内源性 MEEVD 五肽对两个蛋白相互作用的 IC_{50} 为 $14.28 \pm 1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究对五肽序列进行氨基酸突变, 并用此方法测试了其对于 HSP90-HOP (TPR2A) 相互作用的抑制作用。结果表明, 0 位的 Asp 和-3 位 Glu 对于活性的保持至关重要, -1 位 Val 和-4 位 Met 的疏水作用也很重要, -2 位的 Glu 对于肽段活性重要性较低。这些信息可以为开展合理药物设计, 发现新型结构的 HSP90-HOP (TPR2A) 相互作用抑制剂提供指导。

References

- [1] Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the HSP90 molecular chaperone machinery [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 271–294.
- [2] Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, et al. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 537–549.
- [3] Hao H, Naomoto Y, Bao X, et al. HSP90 and its inhibitors [J]. *Curr Oncol Rep*, 2010, 23: 1483–1492.
- [4] Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 761–772.
- [5] Pratt WB. The HSP90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998, 217: 420–434.
- [6] Nardai G, Vegh EM, Prohaszka Z, et al. Chaperone-related immune dysfunction: an emergent property of distorted chaperone networks [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27: 74–79.
- [7] Pacey S, Banerji U, Judson I, et al. HSP90 inhibitors in the clinic [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, 172: 331–358.
- [8] Biamonte MA, Van de Water R, Arndt JW, et al. Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 3–17.
- [9] Wang H, Lu M, Yao M, et al. Effects of treatment with an HSP90 inhibitor in tumors based on 15 phase II clinical trials [J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 5: 326–334.
- [10] Carrello A, Allan RK, Morgan SL, et al. Interaction of the

- HSP90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70 [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 9: 167–181.
- [11] Yi F, Regan L. A novel class of small molecule inhibitors of HSP90 [J]. *ACS Chem Biol*, 2008, 3: 645–654.
- [12] Chen S, Smith DF. HOP as an adaptor in the heat shock protein 70 (HSP70) and HSP90 chaperone machinery [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 35194–35200.
- [13] Cortajarena AL, Yi F, Regan L. Designed TPR modules as novel anticancer agents [J]. *ACS Chem Biol*, 2008, 3: 161–166.
- [14] Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the HSP70-HSP90 multichaperone machine [J]. *Cell*, 2000, 101: 199–210.
- [15] Pratt WB, Dittmar KD. Studies with purified chaperones advance the understanding of the mechanism of glucocorticoid receptor-HSP90 heterocomplex assembly [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 1998, 9: 244–252.