

## 基于多肽衍生物的HSP90功能位点识别机制研究

张立晓<sup>1,2</sup>, 尤启冬<sup>1,2\*</sup>, 王磊<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国药科大学, 江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 江苏 南京 210009;

2. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009)

**摘要:** HSP90 (heat shock protein 90) 是一种重要的分子伴侣蛋白, 负责客户蛋白的激活和成熟。靶向HSP90可通过竞争性占据ATP位点或者干扰HSP90与共伴侣蛋白之间的蛋白互作位点, 进而有效抑制癌细胞增殖。因此, HSP90的位点识别与功能的研究对于分子发现至关重要。本研究聚焦于多肽P1, 揭示了其与HSP90之间的双重结合机制, P1能够同时作用于HSP90的ATP结合位点和共伴侣蛋白CDC37 (cell division cycle 37) 结合界面。通过ATPase实验和Co-IP实验, 发现P1具有同时抑制ATP的活性和HSP90-CDC37之间的蛋白互作的能力, 这为靶向HSP90伴侣系统的新型抑制剂提供了新思路。

**关键词:** HSP90; 分子伴侣系统; 双功能作用位点; ATP; 蛋白-蛋白相互作用

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-2975-06

## HSP90 functional site recognition mechanism based on peptide derivatives

ZHANG Li-xiao<sup>1,2</sup>, YOU Qi-dong<sup>1,2\*</sup>, WANG Lei<sup>1,2\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009,

China; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Heat shock protein 90 (HSP90) is a crucial molecular chaperone responsible for the activation and maturation of client proteins. Targeting HSP90 can effectively inhibit cancer cell proliferation by either competitively occupying the ATP-binding site or disrupting the protein-protein interaction sites between HSP90 and its co-chaperones. Therefore, studying the recognition and function of HSP90 binding sites is essential for molecular discovery. This study focuses on peptide P1, revealing its dual binding mechanism with HSP90. P1 is capable of simultaneously interacting with both the ATP-binding site of HSP90 and the binding interface with the co-chaperone CDC37 (cell division cycle 37). Through ATPase and Co-IP assays, we found that P1 effectively inhibits both ATP activity and the protein interaction between HSP90 and CDC37, providing a novel approach for developing new inhibitors targeting the HSP90 chaperone system.

**Key words:** HSP90; molecular chaperone system; the dual functional site; ATP; protein-protein Interaction

分子伴侣在维持蛋白稳态中扮演着重要角色, 负责调控众多客户蛋白 (如蛋白激酶、转录因子和激素

受体等) 的成熟折叠与翻译后修饰, 从而在细胞生长、分化和存活中发挥关键作用<sup>[1-3]</sup>。分子伴侣系统主要由热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 及其共伴侣蛋白组成, 热休克蛋白家族成员包括HSP100、HSP90、HSP70、HSP60和小分子热休克蛋白。无论在细胞的正常或应激状态下, 这些分子伴侣都能发挥作用, 以维持细胞的稳定状态<sup>[4]</sup>。HSP90与其多种共伴侣蛋白共

收稿日期: 2024-06-27; 修回日期: 2024-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173741); 江苏省自然科学基金-优秀青年基金 (BK20230103).

\*通讯作者 Tel: 15261483858,

E-mail: youqd@cpu.edu.cn; leiwang.91@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0602

同构成分子伴侣循环,协助底物蛋白完成折叠、成熟与翻译后修饰。在这过程中,共伴侣蛋白 CDC37 (cell division cycle 37) 主要负责特异性地招募激酶蛋白,并与 ATP 共同调控分子伴侣循环过程中 HSP90 二聚体的构象转变<sup>[3,5]</sup>。HSP90 分子伴侣循环主要包括以下过程:在 CDC37 的协助下,客户蛋白结合到 HSP90 N 端;ATP 结合到 HSP90 N 端,HSP90 复合物由“开放”变为“封闭”构象;同时,CDC37-激酶复合物转移到 HSP90 M 端;最后,在 ATP 被充分水解后,HSP90 再次变成开放构象,为激酶蛋白的成熟和折叠提供机会<sup>[3,6,7]</sup>。HSP90 通过依赖 ATP 发生的构象转变及与共伴侣蛋白相互作用,构成复杂的蛋白调控网络,进而实现对众多底物蛋白的折叠和翻译后修饰。因此,阐明 HSP90 不同位点所对应的生物学功能对药物发现及后续药理学研究极其重要。

天然产物 格尔德霉素被确证为首个 HSP90 ATPase 抑制剂后,科学家们积极地投身于靶向 HSP90 N 端 ATP 结合位点小分子药物设计中。基于 4 种结构母核(格尔德霉素类、嘌呤骨架类、间苯二酚类和苯甲酰胺类),已经陆续开发了上千种 ATPase 抑制剂。截至目前,超过 30 种 HSP90 ATPase 抑制剂进入临床试验阶段。这类抑制剂通过竞争性地结合到 ATP 口袋,阻断 HSP90 的构象转变,从而干扰底物蛋白的正确折叠和成熟<sup>[8]</sup>。同时,针对 HSP90 与其共伴侣蛋白(如 CDC37、HOP、AHA1 和 p23) 相互作用的小分子药物设计也取得了进展<sup>[8-12]</sup>。本课题组首次报道了靶向 HSP90 非 ATP 位点的 HSP90-CDC37 蛋白互作小分子抑制剂 DDO-5936<sup>[11]</sup>。此类抑制剂可特异性地干扰 HSP90-CDC37 蛋白互作界面,而不会对 HSP90 正常的 ATP 功能产生影响。

过去数年中,本课题组基于化合物 DDO-5936 的结构,进行了结构优化研究,成功获得了多个活性更强、性质更优的 HSP90-CDC37 PPI 抑制剂。同时,也有研究发现了多个天然产物通过干扰 HSP90-CDC37 PPI 从而实现抗肿瘤细胞增殖<sup>[13,14]</sup>。然而,目前鲜有化学分子能够同时针对 HSP90 的多个作用位点对其生物学功能进行有效干预,限制了对 HSP90 不同作用位点和功能之间潜在的对应关系的深入理解。

本研究以 Kaza Suguna 团队<sup>[15]</sup>报道的 7 肽 **P1** (Gly14-Arg13-Asp12-Leu11-Tyr10-Asp9-Asp8) 为基础,该多肽能够有效与 HSP90 NTD 的 ATP 口袋结合。基于此,深入探讨了 HSP90 NTD 两个结合位点之间的相互作用及其在生物学功能中的重要作用。通过分子对接和分子动力学模拟分析,揭示了 **P1** 与 HSP90 NTD 的结合模式,**P1** 能够同时结合于 ATP 和 CDC37 的结合口

袋。**P1** 中的 Arg 残基对于识别 CDC37 口袋至关重要,而 Tyr 则是识别 ATP 结合口袋的关键氨基酸。此外,Asp 残基对于多肽与 HSP90 NTD 的结合贡献显著。在体外活性评价中,**P1** 不仅表现出对 HSP90 ATPase 活性的抑制作用,还可以有效干扰 HSP90-CDC37 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI)。为了进一步了解多肽如何影响其在 HSP90 上的功能位点相互作用,对 **P1** 进行了结构修饰。实验结果表明,Arg13 残基甲基化后,ATP 结合活性得以保留;然而,Tyr9 残基甲基化导致 ATP 结合活性丧失。Asp8 残基甲基化时,ATPase 活性仍然存在。综合分析,**P1** 能够结合至 HSP90 NTD 的双结合位点,其中 Arg13、Tyr9 和 Asp8 对结合效果至关重要。这项研究为开发靶向 HSP90 的双位点多肽抑制剂提供了新策略,预期能研发出更短、活性更高且具有药物潜力的多肽分子。

## 结果与讨论

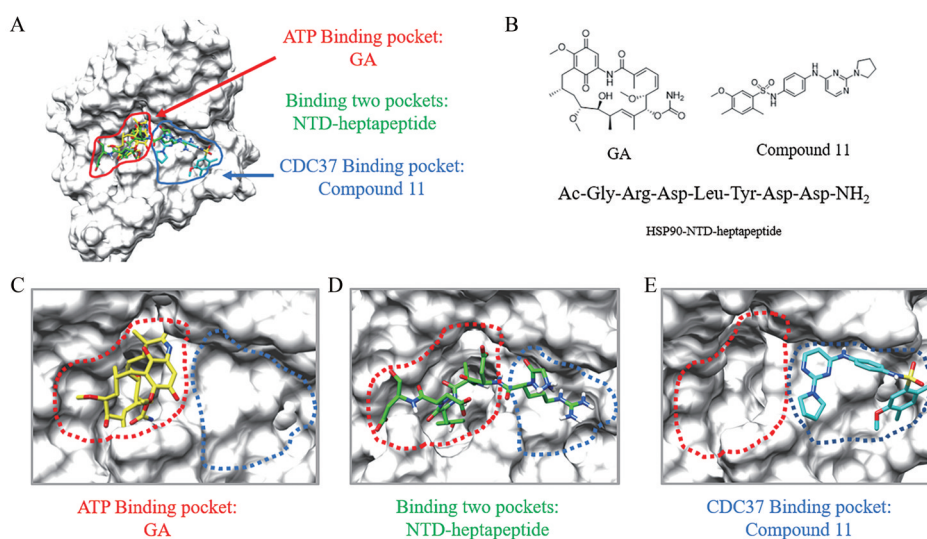
### 1 HSP90 差异化的功能位点分析

基于文献<sup>[15]</sup>报道的多肽 **P1**,详细探究了 **P1** 与 HSP90 NTD 的结合模式和结合位点。同时对 ATP 抑制剂 (geldanamycin, GA) 和 HSP90-CDC37 PPI 抑制剂 (化合物 **11**) 一起进行叠合分析。结果发现,GA 和化合物 **11** 与之前文献<sup>[15]</sup>报道的结果一致,分别作用于 ATP 口袋和 CDC37 结合界面,但是 **P1** 可以占据 HSP90 的两个功能结合位点 (图 1)。上述研究结果有助于更深入地理解 **P1** 对 HSP90 的新型和更有效地抑制活性所依赖的结构基础。

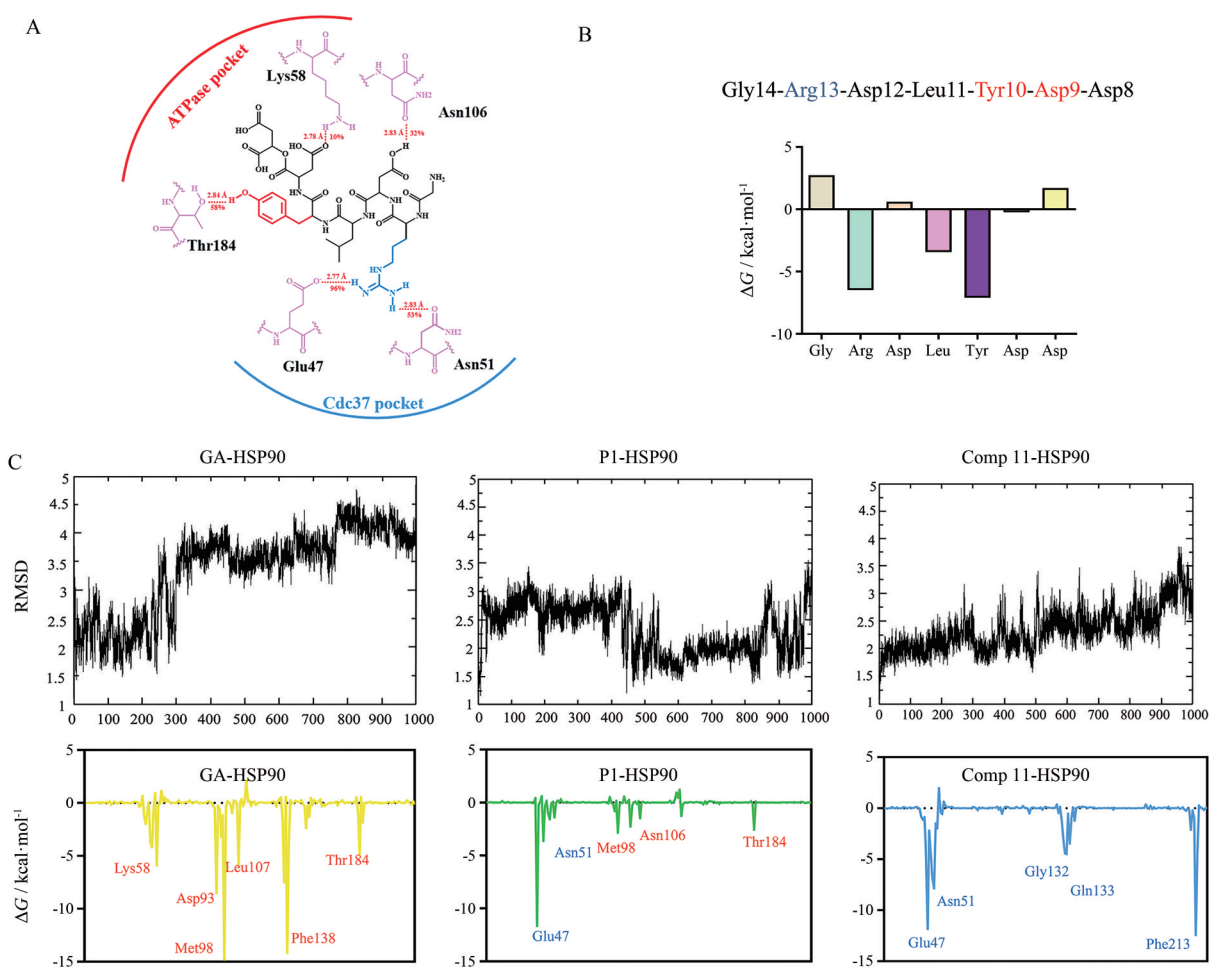
### 2 **P1** 与 HSP90 的动态结合模式

为了全面地探究 **P1** 与 HSP90 之间相互作用位点和结合模式,选用了 HSP90 和 **P1** 进行了 10 ns 的分子动力学模拟,对其结合模式进行了研究。**P1** 可以与 HSP90 的两个功能结合位点的残基同时发生氢键相互作用。其中,**P1** 中的 Tyr10 可以与 HSP90 NTD 中 ATP 口袋的 Thr184 发生氢键相互作用;Arg13 与 HSP90 NTD 中 CDC37 结合界面的 Glu47 形成了重要的氢键作用 (图 2A)。在 10 ns 模拟轨迹中,Arg13 侧链的胍基在 96.0% 的模拟时间内可以与 Glu47 形成氢键,53% 的时间可以与 Asn51 形成氢键。Arg13 和 Glu47 之间的氢键可能是 **P1** 破坏 HSP90-CDC37 PPI 的主要驱动力。Tyr10 的侧链在 58.0% 的模拟时间内可以与 Thr184 形成氢键,这可能是多肽抑制 ATP 活性的主要原因。

通过轨迹分析计算了 **P1** 上每个残基的有效结合能,以提供每个残基对 HSP90 NTD 结合的能量贡献,贡献大于  $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  结合能的残基包括 Arg13、Tyr10 和 Asp9 (图 2B)。在这个结合模型中,Asp9 也显



**Figure 1** Structure of the HSP90 NTD in complex compared with the potential binding modes of different molecules. A: Overview of the GA, P1 and compound 11 bound to HSP90 NTD colored grey; B: Chemical structure of GA, P1 and compound 11; C: The red line defines ATP binding pocket; D: P1 binds to two binding pockets; E: The blue line defines potential CDC37 binding interface. NTD: N terminal domain; GA: Geldanamycin; P1: Gly14-Arg13-Asp12-Leu11-Tyr10-Asp9-Asp8



**Figure 2** Analysis of MD simulations and binding energy calculation. A: A schematic of detailed P1 atom interactions with the protein HSP90 NTD residues; B: Per-residue of P1 energy decomposition; C: Backbone RMSD values of GA, P1 and compound 11 (Comp11) are shown separately for the compare. MD: Molecular dynamics; RMSD: Root mean square deviation

示出较强的结合贡献,说明它在两者结合过程中发挥了重要作用。在长距离轨迹中, **P1** 表现出比 **GA**、化合物 **11** 更稳定的构象(图 2C),说明 **P1** 具有更好的结合稳定性和配体性质。

### 3 **P1** 结合在 HSP90 不同功能位点

为了进一步证明 **P1** 可以具有同时抑制 HSP90 不同功能位点的活性,对多肽 **P1** 进行了结构修饰,设计并合成了 3 个肽段 (**P2**~**P4**),其中 **P2** 用两个甲基修饰 Arg13, **P3** 用甲氧基修饰 Try10, **P4** 用甲氧基修饰 Asp9。采用 ATPase、BLI assay (biolayer interferometry) 和 HSQC (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) 实验进行结合活性测试,结果如表 1 所示。

首先,运用 ATPase 实验测试这些多肽的 ATP 活性(图 3A),其中 **P1** 表现出对 ATP 的抑制活性为  $1.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , **P2** 和 **P4** 保持了相似的活性,分别为  $3.62$  和  $6.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,但是 **P3** 的 ATP 活性完全丧失;随后,进行 Co-IP 实验以证明多肽可以干扰 HSP90-CDC37 PPI,将外源性的 HSP90 和 CDC37 质粒转染进入细胞,在不同浓度的 **P1** 处理下,利用 Flag 抗体将 Flag-CDC37 蛋白及 Myc-HSP90 沉淀下来,Western blot 检测 HSP90 和 CDC37 相互作用(图 3B)。结果表明,随着 **P1** 浓度的增高,HSP90-CDC37 相互作用减弱,说明 **P1** 可以在体外有效地干扰 HSP90-CDC37 PPI。

### 4 多肽衍生物的靶标结合活性测试

BLI 实验得到与 ATPase 实验相似的结果,相比于 **P1** 结合活性来说, **P2** 和 **P4** 都表现出了相似的结合亲和力,  $K_D$  值分别  $6.58$  和  $5.79 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 4A)。同时,HSQC 实验结果也表现出了相同的结论(图 4B),通过与 HSP90 N<sup>90D</sup> 对比,加入 **P1**, **P2** 和 **P4** 后,发现 T184 和 E47 这两个氨基酸的化学位移发生明显的扰动,但是加入 **P3** 后对蛋白的氨基酸化学位移没有影响。因此,

用甲氧基修饰 Try10 后,导致 **P3** 的所有活性丧失,表明 Try10 对保持多肽的结合活性具有重要意义。

虽然轨迹分析有效结合能时,Asp9 贡献了大于  $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  结合能,但是根据以上实验结果, **P4** 在所有实验中都保持了与 **P1** 同等的结合活性,表明 Asp9 不是对结合发挥关键作用的氨基酸。

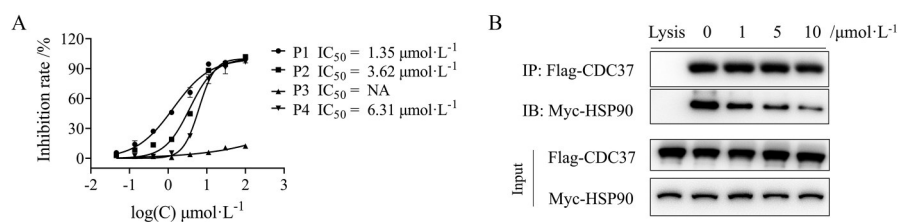
### 5 讨论

分子伴侣系统长期以来都是极具有吸引力的靶标,并且被认为是治疗多种疾病的理想靶标。随着对 HSP90 分子伴侣系统作用机制研究的深入,大约 30 余种 HSP90 抑制剂进入临床研究阶段,但是这类抑制剂存在不可避免的热休克副反应,大大限制其临床应用。近些年,多个靶向 HSP90 共伴侣蛋白的 PPI 抑制剂被报道,它们作用在全新的结合位点,不会影响 HSP90 的 ATPase 活性从而有效避免热休克效应。然而,这些抑制剂普遍面临活性欠佳及生物学机制不清晰的挑战。目前,尚未发现同时靶向 ATP 结合位点和共伴侣蛋白的 PPI 作用位点的化学分子,这一局限性阻碍了对 HSP90 蛋白不同作用位点和生物学功能之间联系的深入探索。因此,开发靶向 HSP90 双作用位点的分子,有望成为癌症治疗的又一创新策略。

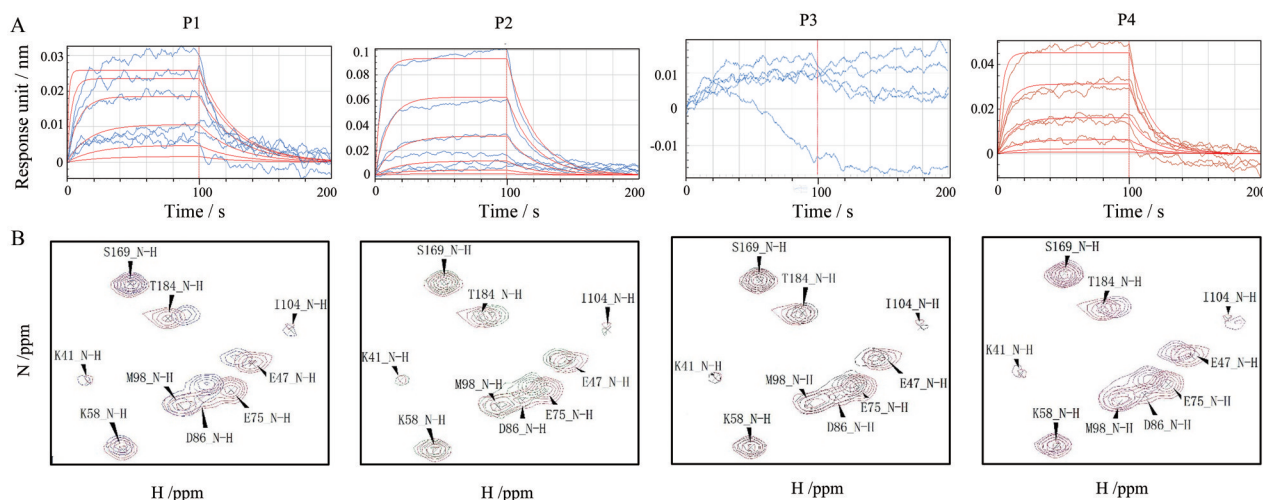
基于在 Kaza Suguna 团队<sup>[15]</sup>报道的短肽 **P1**,本课题组前期对 **P1** 和 HSP90 NTD 的结合模式进行了预测,分解氨基酸残基在结合过程中的能量贡献,确定了多肽上在结合过程中的关键氨基酸,结果表明 **P1** 中 Arg13 和 Try10 能够分别与 HSP90 的 Glu47 和 Thr184 形成氢键。这说明 **P1** 能够同时占据双功能位点,具有调控 ATP 活性和 HSP90-CDC37 PPI 的潜力。后期采用 ATPase 和 BLI 实验进行的活性评价,结果验证 **P1** 可以同时抑制 ATP 活性和 HSP90-CDC37 PPI 的能力。这部分研究工作对同时占据 HSP90 的双功能位点的生物功能进

**Table 1** **P1**-derived peptides binding capacity and inhibition rate of HSP90 ATPase

Peptide No.	Sequence	$K_D/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>P1</b>	Ac-Gly-Arg-Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-NH <sub>2</sub>	2.63	1.35
<b>P2</b>	Ac-Gly-Arg(Me) <sub>2</sub> -Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-NH <sub>2</sub>	6.58	3.62
<b>P3</b>	Ac-Gly-Arg-Asp-Leu-Tyr(OMe)-Asp-Asp-NH <sub>2</sub>	NA	NA
<b>P4</b>	Ac-Gly-Arg-Asp-Leu-Tyr-Asp(OMe)-Asp-NH <sub>2</sub>	5.79	6.31



**Figure 3** **P1** binding to the HSP90 NTD double binding site. A: Dose dependence of peptides inhibition of HSP90 ATPase activity; B: Flag-CDC37 and Myc-HSP90 were transferred to 293T after treatment with dose-dependent **P1** (0, 1, 5 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for Co-IP. Western blots were performed with anti-Flag and anti-Myc. Co-IP: Co-immunoprecipitation



**Figure 4** Binding affinities of HSP90 NTD proteins for **P1**, **P2**, **P3** and **P4**. A: BLI assay results of target compound **P1**, **P2**, **P3** and **P4**; B: HSQC spectra of  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $^{15}\text{N}$ -labeled HSP90 NTD in the absence and presence of  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  **P1**, **P2**, **P3** and **P4**. BLI: Biolayer interferometry; HSQC: Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy

行了探索, 不仅在体外可以同时展现出对两个位点的有效抑制, 而且可能为疾病的治疗提供了新思路。

## 实验部分

**细胞培养** 人结肠癌细胞 HCT116 和人胚肾细胞 HEK-293T 购自上海 ATCC 细胞库, 细胞分别培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 和 DMEM 完全培养基中, 所有细胞培养在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱。

**预测结合模式** 使用 Discovery Studio (DS) 4.0 进行对接研究, HSP90 的晶体结构是从 PDB (PDB: 1US7) 中获得, 去除蛋白附近的水分子, 对受体蛋白加氢, 加电荷等预处理。分别以 HSP90 N 端 ATP 口袋和 CDC37 结合界面的氨基酸序列为中心, 将其周围  $10 \text{ \AA}$  范围定义为“SBD Site Sphere”。将所要对接的目标化合物导入 DS 4.0 软件, 利用“Prepare Ligands”模块使化合物产生 3D 构象, 通过 CHARMM 力场使对接分子能量最小化, 通过“CDOCKER”模块进行对接。选取打分最高的构象作为对接结果, 并用于后续分子动力学模拟。

应用 AMBER 12 程序对目标化合物和 HSP90 进行分子动力学模拟, 以分子对接生成的复合物的构象为起始结构, 进行 10 ns 的分子动力学模拟。在进行动力学模拟过程前分两步进行系统体系能量最小化, 在整个模拟过程中, 采用 Ewald 法计算远程静电相互作用。整个系统从  $0\sim 300 \text{ K}$  进行加热, 同时在恒定体积下运行 50 ps 的分子动力学模拟。随后进行等温-等压系统 (NPT) 分子动力学模拟, 时间常数为 1.0 ps, 持续 1 000 ps, 以调整溶剂密度。最后, 在恒压下使用 10 ns 的分子动力学模拟。利用 AMBER 12 中的“ptraj”工具分析蛋白和配体的 RMSD, 研究模拟过程中复合物的

稳定性。使用 MM-PBSA 方法分析各个氨基酸残基的自由能和每个残基的能量贡献和关键原子间的距离。

**HSP90 NTD 蛋白表达和纯化** 将 His 标记的 HSP90 NTD 的序列克隆到 pET28a 载体中, 完成质粒转化过程。挑取适宜的单克隆菌群, 扩增在包含卡那霉素 ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的 LB 培养基中, 培养于  $37^\circ\text{C}$ 、 $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件的摇床中, 至 OD 值到  $0.4\sim 0.6$  时, 加入  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG,  $16^\circ\text{C}$  诱导表达 12 h, 随后收集含有过表达蛋白质的大肠杆菌。然后, 通过超声破碎,  $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min, 取上清。采用 AKTA-pure (GE healthcare) 纯化系统, 在镍柱上进行纯化, 最后在 HiLoad 60 Superdex200 柱 (GE Healthcare) 上进行凝胶过滤, 得到纯度达 95% 以上的 HSP90 NTD。所有蛋白均在用考马斯蓝染色的 12% SDS-PAGE 凝胶上进行验证。最终, 将蛋白存储在 PBS 缓冲液中并分装, 在液氮中速冻, 储存在  $-80^\circ\text{C}$ 。

**ATPase 实验** 使用 DiscoverX ADP Hunter Plus Assay Kit (DiscoverX, Fremont, CA) 测试 HSP90 ATP 活性, 所有实验在 384 孔板上进行, 每个孔含有  $20 \mu\text{L}$  化合物 (对照组用缓冲液代替化合物体系),  $20 \mu\text{L}$   $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HSP90 NTD 蛋白和  $20 \mu\text{L}$   $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP, 在  $37^\circ\text{C}$  温度下孵育 1 h。随后, 分别加入  $10 \mu\text{L}$  检测试剂 A 和  $20 \mu\text{L}$  检测试剂 B, 室温孵育 30 min。然后, 通过 Varioskan 多模微孔板酶标仪 (Thermo Scientific; 激发波长 540 nm, 发射波长 620 nm) 检测 ADP 的生成。同时, 在不含蛋白和化合物的情况下测定背景值, 阴性对照只含蛋白, 并以 100% ATP 酶活性为标准。

**BLI 实验** 使用 Octet RED96 (ForteBio) 测定化合物对 HSP90 NTD 的结合亲和力。本实验中所有

蛋白使用 EZ-Link NHS-Biotin (20217, Thermo Fisher Scientific) 进行生物素化, 实验组设置在室温下按照 1:1 的比例将化合物与蛋白进行孵育。Super Streptavidin (SSA) 生物传感器 (ForteBio, Menlo Park, CA) 在 PBS 中平衡 60 s 后, 将 SSA 生物传感器装载 HSP90 蛋白 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 同时设置空白对照组, 选取新的 SSA 生物传感器, 传感器在不含蛋白的缓冲液进行孵育, 其余过程与实验组完全一致。本实验在 96 孔聚丙烯微孔板黑板 (Greiner; 655209) 上进行, 每孔设置体积为  $200 \mu\text{L}$ , 温度为  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。所有数据在 Octet data analysis software 进行分析。使用双扣除方法对信号进行分析, 排除背景和非特异性信号对实验结果的影响。研究采用结合和解离速率为 1:1 的结合模型。通过  $K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$  比值计算出平衡解离常数  $K_{\text{D}}$ 。

**$^{15}\text{N}$ -HSQC 实验** 在 Bruker 800-MHz 核磁共振波谱仪上进行  $^{15}\text{N}$ -HSQC 实验。 $^{15}\text{N}$  标记的 HSP90 NTD 在含有  $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸钠 (pH 7.4)、 $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 和 5% DMSO 的缓冲液中, 与  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的化合物混合均匀, 放入核磁共振波谱仪中使用超低温探头进行扫描。所有光谱信息使用 SPARKY 程序 (T. D. Goddard 和 D. G. Kneller, SPARKY 3) 分析。

**Co-IP 实验** 取对数生长期的 HCT116 细胞, 接种适量细胞到细胞培养板中, 待细胞密度达到 80%, 加入待测的化合物至所需的终浓度, 同时对照组加入与化合物等量的 DMSO, 共孵育 24 h。随后使用 WB 及 IP 裂解液裂解细胞, 每管加入  $200 \mu\text{L}$ , 冰上裂解 45 min, 然后  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $2000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清。从样品中吸出  $50 \mu\text{L}$ , 加入  $5\times$  Loading Buffer 混匀后  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  煮 10 min,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 作为 Input 组。剩下的样品按照 1:50 的体积比, 加入 HSP90 抗体混合均匀,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  翻转摇床孵育过夜。第二天加入磁珠后继续在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  翻转摇床上孵育 4 h, 孵育完成后, 使用磁力架把磁珠和蛋白样品分离后, 弃去液体, 之后用磁珠洗涤液洗涤磁珠 3 遍。洗涤完成之后, 加入  $2\times$  Loading Buffer 混匀后  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  煮 5 min, 为 IP 组。在进行 SDS-PAGE 电泳前把 IP 组样品加热 2 min,  $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min。配置 12% 分离胶进行电泳, 先恒压 60 V 电泳 40 min, 再调高电压至 120 V 直到样品完全分离, 然后于冰浴中利用 PVDF 膜  $300 \text{ mA}$  恒流转移膜 2 h。将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗 (按说明书比例稀释)  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜; 第二天  $1\times$  TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入对应的二抗 ( $1:20000$  稀释) 室温孵育 1 h 后; 再次利用  $1\times$  TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 洗涤结束后将膜转移到曝光仪中分析条带。

**作者贡献:** 张立晓负责蛋白和细胞实验、数据分析及文章的撰写工作; 王磊负责分子对接实验及课题设计、指导和论文审阅; 尤启冬负责课题设计、指导和论文审阅。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis [J]. Nature, 2011, 475: 324-332.
- [2] Kim YE, Hipp MS, Bracher A, et al. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis [J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 323-355.
- [3] Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18: 345-360.
- [4] Leach MD, Klipp E, Cowen LE, et al. Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs [J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10: 693-704.
- [5] Wang L, Xu XL, Jiang ZY, et al. Modulation of protein fate decision by small molecules: targeting molecular chaperone machinery [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 1904-1925.
- [6] Vaughan CK, Gohlke U, Sobott F, et al. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex [J]. Mol Cell, 2006, 23: 697-707.
- [7] Chiosio G, Digwal CS, Trepel JB, et al. Structural and functional complexity of HSP90 in cellular homeostasis and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24: 797-815.
- [8] Wang L, Zhang QY, You QD. Targeting the HSP90-CDC37-kinase chaperone cycle: a promising therapeutic strategy for cancer [J]. Med Res Rev, 2022, 42: 156-182.
- [9] He YD, Peng SH, Wang JH, et al. Ailanthone targets p23 to overcome MDV3100 resistance in castration-resistant prostate cancer [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13122.
- [10] Ihrig V, Obermann WMJ. Identifying inhibitors of the Hsp90-Aha1 protein complex, a potential target to drug cystic fibrosis, by Alpha technology [J]. SLAS Discov, 2017, 22: 923-928.
- [11] Wang L, Zhang LX, Li L, et al. Small-molecule inhibitor targeting the Hsp90-Cdc37 protein-protein interaction in colorectal cancer [J]. Sci Adv, 2019, 5: eaax2277.
- [12] Yi F, Regan L. A novel class of small molecule inhibitors of Hsp90 [J]. ACS Chem Biol, 2008, 3: 645-654.
- [13] Bai HS, Lyu JH, Nie XY, et al. Ginsenoside Rg5 enhances the radiosensitivity of lung adenocarcinoma via reducing HSP90-CDC37 interaction and promoting client protein degradation [J]. J Pharm Anal, 2023, 13: 1296-1308.
- [14] Zhang QY, Yan L, Zhang YX, et al. Rational design of peptide inhibitors targeting HSP90-CDC37 protein-protein interaction [J]. Future Med Chem, 2024, 16: 125-138.
- [15] Raman S, Singh M, Tatu U, et al. First structural view of a peptide interacting with the nucleotide binding domain of heat shock protein 90 [J]. Sci Rep, 2015, 5: 17015.