

基于 Hsp90 ATPase 活性的抑制剂筛选模型研究

陈俊杰, 郭秋菊, 贺晓萌, 杨世新, 陈 澄, 张连茹*

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 热休克蛋白 90(Heat shock protein, Hsp90) 作为分子伴侣, 参与调控肿瘤细胞多条信号通路, 对肿瘤细胞生长有重要作用. 以 pGEX-4T-1 为载体, 构建了 Hsp90 表达载体于宿主大肠杆菌中表达. 通过孔雀绿磷钼酸铵-无机磷检测法, 测定异源表达的 Hsp90 ATPase 活性. 实验得出 Hsp90 对 ATP 的米氏常数(K_m) 为 $369.1 \mu\text{mol/L}$, 在 Hsp90 和 ATP 浓度分别为 $0.18, 1 \text{ mmol/L}$ 时转换效率常数(k_{cat}) 为 1.6 min^{-1} , 最大反应速率(V_{max}) 为 $1.0 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$. 基于该方法, 建立 Hsp90 ATPase 活性抑制剂筛选模型, 以 Geldanamycin 和 Radicicol 为阳性对照, 发现 Rifamycin, Rugulosin 及 MycoE 也有较强的 Hsp90 ATPase 抑制活性. 该方法可用于筛选抗肿瘤候选化合物的研究, 同时也可作为具有 ATPase 活性蛋白的抑制剂筛选提供参考.

关键词: pGEX-4T-1; Hsp90; ATPase 活性

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)05-0711-06

热休克蛋白(Heat shock proteins, Hsps)作为分子伴侣广泛存在于各种原核细胞及真核细胞内. 它可以在短时间内对细胞内受损而变形的蛋白进行正确的折叠, 维持其正确的构象, 因此在恶劣环境中对维持细胞正常生命活动至关重要^[1].

Hsp90 是 Hsps 家族中的一员, 在细胞的生命活动中扮演重要的角色, 其含量约占细胞蛋白总量的 $1\% \sim 2\%$ (质量分数)^[2]. 近年发现, Hsp90 广泛参与许多癌症相关蛋白如 Raf-1, ErbB-2, Src, Akt 以及 Bcr-Abl, 突变型 p53 等的代谢, 帮助其正确的折叠并行使功能. 而这些信号传导分子的过表达或过度激活是肿瘤发生发展中重要的标志^[3]. 不仅如此, Hsp90 本身在许多癌细胞中也会过量表达, 并使得肿瘤细胞比正常细胞更易适应周围恶劣的环境^[4]. 鉴于 Hsp90 特殊的生理功能, 目前已成为癌症治疗的重要靶点之一. 其抑制剂如格尔德霉素(Geldanamycin, GA)等已成为重要的抗肿瘤药物先导化合物, 其衍生物 17-AAG 和 17-DMAG 作为抗肿瘤药物, 在美国和英国已经分别进入临床 II 期和 I 期实验^[5].

Hsp90 是一种高度保守的蛋白序列, 其单体由一

个 25 ku 的 N-末端和一个 15 ku 的 C-末端通过一个约 40 ku 中间连接区相连而成^[6]. 其 N 端有一个 ATP 结合位点, 是一个核苷酸结合域. Hsp90 发挥作用依赖于 ATP 的存在, ATP 水解过程释放出能量帮助 Hsp90 行使功能^[7]. 鉴于 Hsp90 ATPase 活性特点, 对其活性的研究及在此基础上寻找和发现 Hsp90 抑制剂, 对开发靶向抗肿瘤药物研究具有重要的指导意义.

本研究自主构建 Hsp90 表达载体, 以大肠杆菌(*E. Coli*) 为宿主, 异源表达 Hsp90 融合蛋白. 通过对其 ATPase 活性进行研究, 拟建立一种 Hsp90 抑制剂筛选模型, 并对厦门大学微生物药物课题组已有化合物进行 Hsp90 抑制剂的初步筛选, 该研究将为寻找和发现抗肿瘤先导化合物提供借鉴.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

E. Coli DH5 α , BL21(DE3) 以及载体 pGEX-4T-1, 均为微生物药物实验室保存.

1.1.2 工具酶及其他试剂

PCR 用的 *rTaq* 酶、pyrobest 酶、dNTP、限制性内切酶(*Not* I, *Sal* I)、连接酶等均购于大连宝生物工程公司; Hsp90 全长序列由林天伟老师实验室惠赠; 孔雀石绿、ATP、聚乙烯醇等均购于 Sigma 公司; 四水合钼酸铵购于上海生工.

收稿日期: 2010-02-23

基金项目: 国家自然科学基金(30873148, 30973566); 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2007AA091503); 厦门市科技计划项目(3502Z20093014); 福建省自然科学基金(2010J01227)

* 通讯作者: ru898@xmu.edu.cn

1.2 实验方法

1.2.1 Hsp90 表达载体的构建及融合蛋白的表达与纯化

设计引物在 Hsp90 C 端区域添加 His 标签基因序列,以带有 Human Hsp90 α 全长序列的载体为模板 PCR 扩增 Hsp90. 设计 PCR 引物,酶切位点为 *Sal* I / *Not* I, 引物 1: 5'-ACGCGTCGACTCATGCCTGAG-GAAGTGCACCATGGA-3', 引物 2: 5'-TTGCGGC CGCTTAGTGTTGGTGGTGGTGGTGA TCGACT-TCTTCCATGCG-3'. PCR 产物经 *Sal* I / *Not* I 双酶切后与 pGEX-4T-1 载体重组得到 Hsp90-pGEX-4T-1 重组载体,载体转入 *E. Coli* DH5 α 后经广州 Invitrogen 公司测序,序列正确.

从 *E. Coli* DH5 α 提取重组质粒转入表达菌株 *E. Coli* BL21(DE3), 氨苄抗性平板培养 12 h, 挑取单克隆活化后分别接种于 1 L 的氨苄 LB 培养液中. 37 °C 下摇床培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 0.8 mmol/L IPTG 诱导. 菌液于 $5\,000 \times g$ 离心 5 min, 收集沉淀重悬于 Lysis Buffer^[8] (100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L Imidazole, 500 mmol/L NaCl, 10% (体积分数) Glycerol pH 8.0), 超声破碎 20 min. $25\,000 \times g$ 离心收集上清, 经 GST-Ni²⁺-NTA 柱分步纯化, 得到 Hsp90 融合蛋白. SDS-PAGE 检测表达纯化结果, Bradford 法测定蛋白质浓度.

1.2.2 无机磷含量分析

基于孔雀绿-磷钼酸铵法检测无机磷^[9], 建立无机磷浓度与 OD_{620} 对应关系的标准曲线. 配置 1 mL 浓度为 100 mmol/L 的 Na_3PO_3 贮存液, 将其稀释为 0, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200 μ mol/L 8 个浓度梯度. 反应在 96 孔板中进行, 每孔加入待测样 25 μ L, 反应开始先加 80 μ L Solution A 震荡反应约 5 min 后加入 10 μ L Solution B 终止反应, 15 min 后于酶标仪测 OD_{620} 的值, 每组数据 3 次平行.

Solution A: 0.081 2% (质量分数) 的孔雀绿、2.32% (质量分数) 的聚乙烯醇、5.72% (质量分数) 的钼酸铵 (含 6 mol/L HCl) 和超纯水以体积比为 2:1:1:2 比例混合. Solution B: 34% (质量分数) 的柠檬酸钠.

1.2.3 Hsp90 的 ATPase 活性测定

1) Hsp90 浓度对 ATP 水解速率的影响

反应于 96 孔板进行, 体系总体积为 25 μ L. 反应体系为 10 μ L Hsp90 (浓度依次变化为 0, 0.037 5, 0.075 0, 0.150 0, 0.300 0, 0.600 0 μ mol/L), 5 μ L

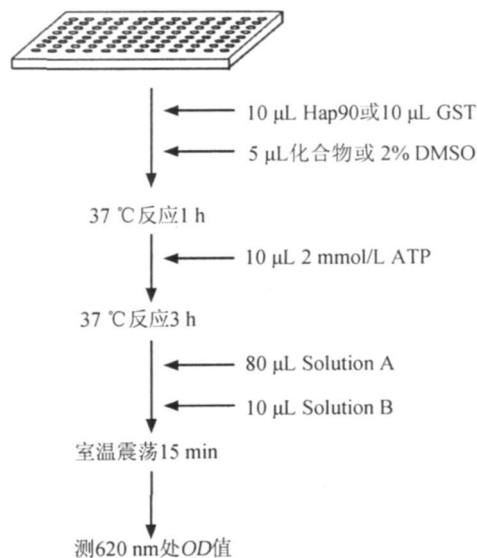


图1 Hsp90 ATPase 活性检测流程

Fig. 1 A flow chat for evaluation in ATPase activity of Hsp90

2% (质量分数) DMSO, 10 μ L 浓度为 2.5 mmol/L ATP, 以上试剂均溶于 Assay Buffer (6 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl pH 7.4). 具体流程见图 1.

ATP 水解实验于 37 °C 进行, 3 h 后加入 Solution A 和 Solution B 终止反应, 15 min 后于酶标仪测 OD_{620} 的值, 每组数据 3 次平行.

2) ATP 浓度对 ATP 水解速率的影响

参照 1.2.3 中 1), 在其他条件不变情况下, 固定 Hsp90 浓度为 0.6 μ mol/L, 改变 ATP 浓度 (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1 000, 2 500, 5 000 μ mol/L), 检测 ATP 水解情况.

1.2.4 Hsp90 ATPase 活性抑制剂筛选模型建立及抑制剂初筛

实验以 Hsp90 的已知抑制剂 GA、根赤壳霉素 (Radicicol, RDC) 检测抑制剂筛选模型可行性, 2% (质量分数) DMSO 为阴性对照, 空白对照将实验组 Hsp90 替换为 GST. 反应体系: 5 μ L 浓度为 200 μ mol/L 的 GA 和 RDC^[10], 10 μ L Hsp90 (浓度为 0.42 μ mol/L), 10 μ L ATP (浓度为 2.5 mmol/L), 以上试剂均溶于 Assay Buffer. 每组实验 3 个平行, 37 °C 反应 3 h. 具体流程见图 1.

基于以上反应体系, 对本实验室一些化合物 MycoE、Y10、Y10-4、Rugulosin、Rifamycin、Clavatul、Glt toxin、Acetylglitoxin 等进行 Hsp90 ATPase 抑制活性初筛.

抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{阴性对照 } \overline{OD}_{620} - \text{实验组 } \overline{OD}_{620}}{\text{阴性对照 } \overline{OD}_{620} - \text{空白对照 } \overline{OD}_{620}} \times 100\% . \quad (1)$$

其中 $\overline{OD}_{620}$ 是 3 组平行实验测定的 OD_{620} 平均值.

1. 2. 5 Hsp90 ATPase 活性抑制剂 IC_{50} 确定

参考 1. 2. 4, 其他条件不变, 分别检测在 MycoE、Rugulosin 和 Rifamycin 在不同浓度时(终浓度为 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 $\mu\text{mol/L}$)对 Hsp90 ATPase 活性的抑制率, 由公式(2)计算出各抑制剂的 IC_{50} .

$$\lg IC_{50} = X_m - I[P - (3 - P_m - P_n)/4]. \quad (2)$$

其中 X_m 、 I 、 P 、 P_m 及 P_n 分别代表 $\lg$ (最高浓度)、 $\lg$ (最高浓度/相临浓度)、所有浓度抑制率之和、最高浓度抑制率、最低浓度抑制率.

2 实验结果

2. 1 Hsp90 表达载体的构建

参照 1. 2. 1, PCR 扩增 Human Hsp90 α 全长序列(2 175 bp), 琼脂糖电泳检测结果如图 2a, 扩增产物经 *Sal I*/*Not I* 双酶切后与 pGEX-4T-1 载体(4 900 bp)重组, 得到重组载体 Hsp90-pGEX-4T-1(7 075 bp), 琼脂糖电泳检测结果如图 2b.

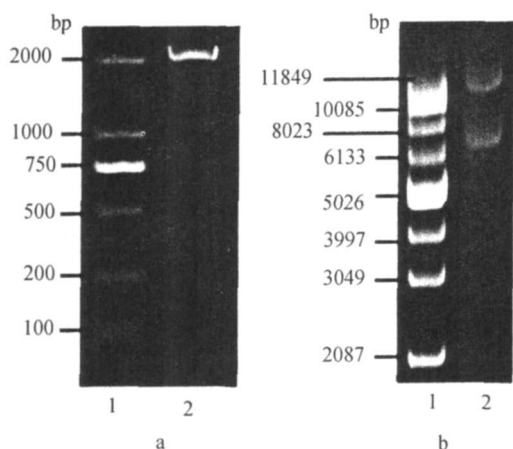


图 2 Hsp90 表达载体构建的结果

a. Hsp90 PCR 产物; b. Hsp90 PCR 产物与 pGEX-4T-1 载体重组结果. 图 a 与 b 中泳道 1 均为 Marker; 泳道 2 分别为 PCR 产物和载体 Hsp90-pGEX-4T-1

Fig. 2 The recombination result of Hsp90 with pGEX-4T-1

2. 2 Hsp90 融合蛋白表达与纯化

将重组载体转入表达菌株 *E. Coli* BL21(DE3), 参照 1. 2. 1 对菌株进行诱导表达与纯化, 得到目的蛋白-Hsp90与GST的融合蛋白(m : 109 ku), SDS-

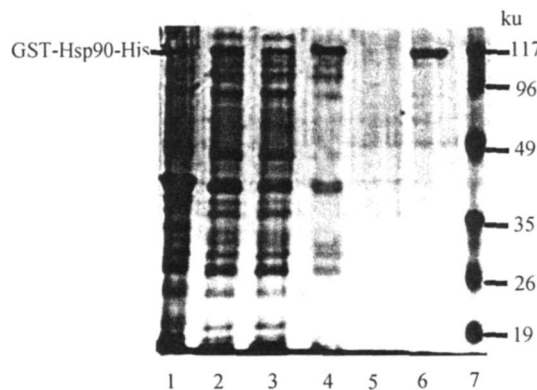


图 3 GST-Hsp90-His 融合蛋白表达与纯化

1. 菌裂解液沉淀; 2. 菌裂解液上清; 3. flow-through; 4. 经 Ni^{2+} -NTA 柱纯化蛋白; 5. GST flow-through; 6. 经 Ni 柱及 GST 柱纯化蛋白; 7. Marker

Fig. 3 Expression and purification result of GST-Hsp90-His

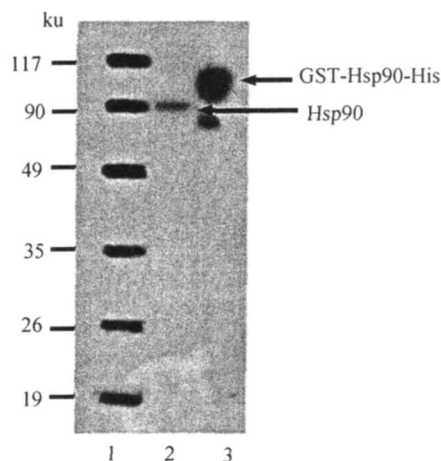


图 4 融合蛋白 Hsp90 的 Western Blot 检测

1. Marker; 2. Hela 细胞中 Hsp90; 3. 融合蛋白 Hsp90

Fig. 4 Detection of fusion protein Hsp90 by Western Blot

PAGE 检测如图 3 所示.

如图 3 所示, 裂解液上清含有较多融合蛋白 Hsp90(泳道 2), 而菌体裂解液的沉淀中融合蛋白的条带较淡(泳道 1), 说明异源表达的 Hsp90 可溶性高, 形成包涵体较少; 只经一步 Ni^{2+} -NTA 亲和纯化产物电泳检测, 除目的蛋白外杂蛋白含量仍较高(泳道 4), 经 GST 柱亲和纯化后杂蛋白含量明显减少(泳道 6).

使用 Human Hsp90 α 抗体通过 Western Blot 法鉴定纯化得到的蛋白是否为目的蛋白, 结果显示异源表达的融合蛋白是 Hsp90, 如图 4 所示.

2. 3 Hsp90 蛋白的 ATPase 活性

2. 3. 1 Hsp90 浓度对 ATP 水解速率的影响

由 1. 2. 2 得到无机磷的含量(P)与 620 nm 处

的吸收值(OD_{620})的关系: $P = 166.78 \times OD_{620}$, $R^2 = 0.9996$. 由此可以计算实验中 ATP 水解后释放的无机磷的量.

在 ATP 浓度为 1 mmol/L 条件下, 检测 Hsp90 在 $0, 0.015, 0.030, 0.060, 0.120$ 及 $0.240 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 浓度下 ATP 水解速率, 结果如图 5 所示. 由图 5 可见, 在一定的浓度范围内随着 Hsp90 浓度的升高, ATP 的水解速率加快, 与 Hsp90 浓度呈线性相关.

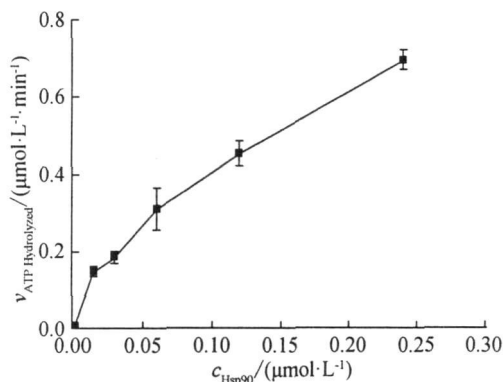


图 5 Hsp90 浓度对 ATP 水解速率的影响
37 °C 温育 3 h

Fig. 5 Relationship between ATP hydrolyzed rate and the concentration of Hsp90

2.3.2 ATP 浓度对 ATP 水解速率的影响

在 Hsp90 浓度为 $0.240 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 条件下, 检测 ATP 在 $0, 40, 80, 160, 240, 320, 400, 1000, 2000 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 浓度下 ATP 水解速率, 结果如图 6I 所示.

从图 6I 可以看出, 在一定范围内随着 ATP 浓度的增加, 其水解速率增大, 在较低浓度范围内反应速率呈直线上升. 但当 ATP 的浓度达到 $1000 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 时, 其水解速率变缓, 此时随着 ATP 浓度的增加, 水解反应速率几乎不再增大, 即反应速率达到最大值. 反应速率与 ATP 浓度的关系曲线呈现典型的双曲线图, 其酶促反应遵循米氏方程如下:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

通过双倒数作图(图 6II), 分别由横轴和纵轴的截距, 求得 Hsp90 催化 ATP 水解反应的米氏常数(K_m)为 $369.3 \text{ } \mu\text{mol/L}$, 最大反应速度($V_{\max}$)为 $1.0 \text{ } \mu\text{mol/(L} \cdot \text{min)}$. 转换常数(k_{cat})为 1.6 min^{-1} , 催化效率(k_{cat}/K_m)为 $4.3 \times 10^{-3} \text{ L/(\} \mu\text{mmol} \cdot \text{min)}$.

2.4 Hsp90 ATPase 活性抑制剂筛选模型建立及抑制剂初筛

参照 1.2.4, 在化合物浓度为 $40 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 条件下,

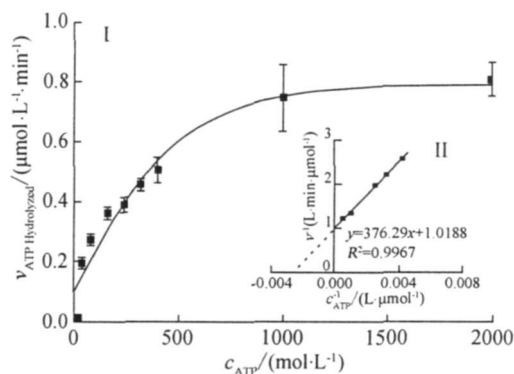
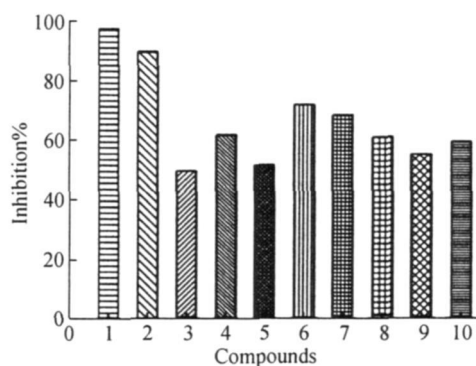


图 6 ATP 浓度对 ATP 水解速率的影响
Hsp90 的浓度为 $0.24 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 与不同浓度的 ATP, 37 °C 温育 3 h

Fig. 6 The plot of ATP hydrolysis velocity versus the concentration of ATP



1. Ridicicol; 2. Geldanamycin; 3. MycoE; 4. Y10;
5. Y10-4; 6. Rugulosin; 7. Rifamycin; 8. Acetylglutoxgn; 9. Glitoxin; 10. Glavatal

图 7 几种化合物对 Hsp90 ATPase 活性的影响
化合物的浓度为 $40 \text{ } \mu\text{mol/L}$, 反应在 $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 下进行 3.5 h. Hsp90 浓度为 $0.17 \text{ } \mu\text{mol/L}$, ATP 浓度为 $1000 \text{ } \mu\text{mol/L}$

Fig. 7 Effect of different compounds on the activity of Hsp90

检测各化合物对 Hsp90 ATPase 活性的影响. 结果如图 7 所示, GA 和 RDC 在浓度为 $40 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 时对 Hsp90 ATPase 活性表现出很强的抑制活性, 抑制率分别为 98.6% 和 89.5%. GA 和 RDC 为 Hsp90 的 N 端抑制剂, 它们结合位点位于 Hsp90N 端中 ATP 结合区域, 具有抑制 Hsp90 ATPase 的活性. 该实验结果显示 GA、RDC 对大肠杆菌中异源表达的 Hsp90 融合蛋白也具有抑制作用, 表明该筛选模型具有可行性.

如图 7 所示, Rugulosin 和 Rifamycin 对 Hsp90 ATPase 抑制率分别为 71.2% 和 68.5%, 抑制活性虽不如 GA 和 RDC, 但相对其他化合物活性仍较高. 分离自海洋真菌 *Diaporthe* sp. 的化合物真菌环氧二

烯(Mycoepoxydiene, MycoE)在实验中也表现出一定的抑制活性,抑制率为53.3%,该化合物属于结构新颖的抗肿瘤药物^[11],其抗肿瘤机制尚未见明确报道.通过本实验推测MycoE可能是通过抑制Hsp90活性而具有抗肿瘤作用.因而选择MycoE、Rugulosin和Rifamycin检测这些化合物对Hsp90 ATPase活性的 IC_{50} ,阳性对照为GA和RDC.

2.5 Hsp90 ATPase 活性抑制剂 IC_{50} 确定

在反应体系Hsp90及ATP终浓度分别为0.17, 1 mmol/L条件下,分别检测不同浓度MycoE、Rugulosin和Rifamycin(终浓度为40, 20, 10, 5, 2.5, 0 μ mol/L)对Hsp90 ATPase活性的抑制率.

如图8所示,随着化合物浓度的增加,各个化合物对Hsp90 ATPase活性的抑制作用增强.几个化合物对Hsp90 ATPase活性的抑制作用均呈浓度依赖性.经计算得知,Rifamycin、Rugulosin、MycoE的 IC_{50} 值分别为18.04, 22.77和38.45 μ mol/L.

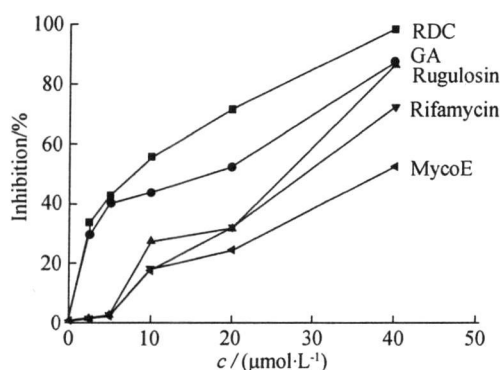


图8 不同浓度的GA、Rugulosin、RDC、Rifamycin和MycoE对Hsp90的ATPase活性的抑制活性反应在37℃下进行3.5 h. Hsp90浓度为0.17 μ mol/L, ATP浓度为1 mmol/L

Fig. 8 The inhibition rate of Hsp90 ATPase activity under the different concentration of GA, Rugulosin, RDC, Rifamycin and MycoE

3 讨论

3.1 Hsp90 表达载体的构建

本实验以pGEX-4T-1质粒为目的蛋白载体,构建Hsp90表达载体,重组载体于*E. Coli* BL21(DE3)中表达.预实验发现诱导蛋白经GST beads一步亲和纯化后,杂蛋白含量仍较多,随后实验优化了洗脱液中谷胱甘肽浓度,纯化效果依然不理想.由于Hsp90与GST融合蛋白分子量较大,推测杂蛋白大多为表达和

纯化过程中Hsp90自身降解产物,但降解蛋白仍带有GST标签,因而无法通过GST beads一步纯化得到纯蛋白.此次实验将His标签基因序列通过PCR的方式整合入目的蛋白的C端,使得目的蛋白两端分别带上GST和His标签,为蛋白的二次亲和纯化提供了可能,实验结果证实了这种纯化方法切实有效. His标签在目的蛋白的N端,第一步亲和主要除去大肠杆菌自身的杂蛋白,留下纯的目的蛋白和降解的目的蛋白混合物.第二步经GST柱纯化,可以选择性地吸附具有完整结构的Hsp90融合蛋白,特异性高纯化效果好.由于GST beads和 Ni^{2+} -NTA特异性强吸附效率高,因此两步纯化可以在短时间内(4 h)完成.传统方法通常使用分子筛^[8,12]或者离子交换柱层析^[13]等方法进行二次纯化,但耗时长、损失大,且对于易降解的蛋白容易引起再次降解.因而该方法可以为融合蛋白纯化过程中对于难纯化、易降解蛋白的纯化提供借鉴.

GST蛋白与目的蛋白中有凝血酶酶切位点,因此可以通过凝血酶切除,但反应需在16℃下经16 h的酶切.为防止长时间的酶切反应,导致蛋白的自身降解,因而本实验使用Hsp90与GST的融合蛋白进行相关的研究,酶活实验中均使用GST作为空白对照.

3.2 Hsp90 抑制剂筛选方法的研究

建立一种高效的Hsp90抑制剂体外筛选模型是筛选其抑制剂最有效的手段,2007年美国的Galani等报道用荧光素酶(luciferase)建立Hsp90高通量筛选模型^[14],他们利用Hsp90分子伴侣的机制对变性的荧光素酶复性,在复性过程中加入抑制剂阻止荧光素酶复性,最终使用其底物荧光素(luciferin)检测荧光素酶复性程度.除了对Hsp90分子伴侣功能抑制剂的研究之外,另外还有一类是基于其ATPase活性建立的Hsp90抑制剂筛选模型,双酶偶联法^[15]及美国的Owen等同位素示踪法^[16].

本研究以Hsp90 ATPase活性为基础,建立Hsp90抑制剂筛选模型.实验采用孔雀绿-磷钨酸铵显色法,特异性地检测体系中无机磷的变化,从而间接反映ATP的水解情况.与双酶偶联法和同位素示踪法相比,前者操作步骤相对繁琐,难以推广高通量筛选,后者具有放射性,实验操作起来难度高,危险性大,因此本方法更适用于适用于Hsp90抑制剂的高通量筛选.此外,孔雀绿-磷钨酸铵显色法是建立在紫外可见吸收光谱基础上,所用的仪器设备简单,且实验中所用的试剂价格低廉等特点,使其不失为高通量筛选Hsp90抑制剂的首选方法.除了应用于Hsp90抑制剂筛选,由于该方法是以检测ATPase活性为基础,同样适用于一些具有ATPase活性蛋白抑制剂的筛选.

参考文献:

- [1] Wu W C, Kao Y H, Hu P S, et al. Geldanamycin, a Hsp90 inhibitor, attenuates the hypoxia induced vascular endothelial growth factor expression in retinal pigment epithelium cells in vitro[J]. *Exp Eye Res*, 2007, 85(5): 721-731.
- [2] Chen B, Zhong D, Monteiro A. Comparative genomics and evolution of the Hsp90 family of genes across all kingdoms of organisms[J]. *BM C Genomics*, 2006, 7: 156.
- [3] Taldone T, Gozman A, Maharaj R, et al. Targeting Hsp90: small molecule inhibitors and their clinical development[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(4): 370-374.
- [4] Li Y, Zhang T, Schwartz S J, et al. New developments in Hsp90 inhibitors as anticancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential[J]. *Drug Resist Updat*, 2009, 12(1/ 2): 17-27.
- [5] Georgakis G V, Li Y, Rassidakis G Z, et al. The Hsp90 inhibitor 17 AAG synergizes with doxorubicin and U0126 in anaplastic large cell lymphoma irrespective of ALK expression[J]. *Exp Hematol*, 2006, 34(12): 1670-1679.
- [6] Muranaka K, Sano A, Ichikawa S, et al. Synthesis of Hsp90 inhibitor dimers as potential antitumor agents[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(11): 5862-5870.
- [7] Panaretou B, Prodromou C, Roe S M, et al. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo[J]. *EMBO J*, 1998, 17(16): 4829-4836.
- [8] Jez J M, Chen J C, Rastelli G, et al. Crystal structure and molecular modeling of 17 DMAG in complex with human Hsp90[J]. *Chem Biol*, 2003, 10(4): 361-368.
- [9] Chang L, Bertelsen E B, Wisen S, et al. High throughput screen for small molecules that modulate the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK[J]. *Anal Biochem*, 2008, 372(2): 167-176.
- [10] Rowlands M G, Newbatt Y M, Prodromou C, et al. High throughput screening assay for inhibitors of heat shock protein 90 ATPase activity[J]. *Anal Biochem*, 2004, 327(2): 176-183.
- [11] 王若宇, 黄耀坚, 郑忠辉, 等. 海洋真菌 *Diaporthe* sp. 产真菌环氧二烯发酵条件的优化[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(5): 611.
- [12] Vaughan C K, Gohlke U, Sobott F, et al. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex[J]. *Mol Cell*, 2006, 23(5): 697-707.
- [13] Huai Q, Wang H, Liu Y, et al. Structures of the N terminal and middle domains of *E. coli* Hsp90 and conformation changes upon ADP binding[J]. *Structure*, 2005, 13(4): 579-590.
- [14] Galam L, Hadden M K, Ma Z, et al. High throughput assay for the identification of Hsp90 inhibitors based on Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase[J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(5): 1939-1946.
- [15] Avila C, Kornilayev B A, Blagg B S. Development and optimization of a useful assay for determining Hsp90's inherent ATPase activity[J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(4): 1134-1142.
- [16] Owen B A, Sullivan W P, Felts S J, et al. Regulation of heat shock protein 90 ATPase activity by sequences in the carboxyl terminus[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(9): 7086-7091.

Study on a Screening Model for Inhibitor of Hsp90 ATPase Activity

CHEN Jur jie, GUO Qir ju, HE Xiao meng, YANG Shi xin,
CHEN Cheng, ZHANG Lian ru*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: As a molecular chaperone, Hsp90 regulates multiple signaling pathways of tumor cells and plays an important role in the growth of tumor cells. In this paper, recombinant vector of Hsp90-pGEX-4T-1 was constructed for Expression of Hsp90, and fusion protein was expressed in *E. coli* (DE3). A colorimetric assay for inorganic phosphate which based on the formation of a phosphomolybdate complex and subsequent reaction with malachite green were used for determination of Hsp90 ATPase activity. The K_m for ATP determined in this assay was $369.1 \mu\text{mol/L}$, the V_m and k_{cat} were $1.0 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ and 1.6min^{-1} , when the concentration of Hsp90 and ATP were $0.18 \mu\text{mol/L}$ and 1mmol/L respectively. Based on this method, a screening model for inhibitor of Hsp90 ATPase activity was established. Later study found that Rifamycin, Rugulosin and MycoE showed inhibition of Hsp90 ATPase activity, with the IC_{50} values were 18.04 , 22.77 and $38.45 \mu\text{mol/L}$, but the IC_{50} values were higher than the IC_{50} of GA and RDC. This method can not only be used to discover anticancer drug, but also to screen inhibitor of protein with ATPase activity.

Key words: pGEX-4T-1; Hsp90; ATPase activity