

復旦大學

本科毕业论文（设计）



论文题目：基于内质网 E3 连接酶的小分子靶向蛋白降解

姓 名：卫镭恺

学 号：21307110041

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学

指导教师：鲁伯坝

职 称：研究员

单 位：生命科学学院

完成日期：2025 年 5 月 13 日

基于内质网 E3 连接酶的小分子靶向 蛋白降解

完成人

卫镭恺

指导小组成员

鲁伯埧 教授

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 研究目的和意义	1
1.2 研究背景	1
1.3 主要研究内容	4
二、材料与amp;方法	6
2.1 核心材料，试剂，仪器与软件	6
2.2 核心实验仪器	7
2.3 实验方法	7
三、研究结果	11
3.1 内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）亲和的小分子筛选与分析	11
3.2 细胞水平表型验证与靶点鉴定	13
3.3 小分子-蛋白结合位点预测与结构解析	16
四、讨 论	20
参考文献	23
致谢	25

摘 要

靶向蛋白降解技术（TPD）为传统药物研发带来突破，但跨膜蛋白的靶向降解仍具挑战。基于内体-溶酶体和转录因子调控的间接靶向策略虽可解决部分问题，但其降解效能不够理想或具不可控的脱靶效应。由于跨膜蛋白在合成时需经内质网（ER）膜折叠后分泌，因此可以被内质网膜上的 E3 泛素连接酶通过内质网相关降解通路（ERAD）识别。新型 TPD 技术通过靶向 ERAD 通路，高效降解跨膜靶标，但其内质网 E3 泛素连接酶配体仍存在较大的优化空间。

基于此，本课题对基于内质网 E3 泛素连接酶的靶向蛋白降解配体小分子进行了开发和优化。本课题报道了一批高亲和力小分子的开发，其解离常数均在纳摩尔至微摩尔浓度水平。这些小分子能够改变并抑制癌细胞的生存表型，这可能可以被其降解靶点所解释，并且影响具有内质网 E3 泛素连接酶依赖性。EJH-1 和 EJH-2 官能团在小分子-E3 互作中起到决定性作用，且存在证据支持它们通过跨膜结构域 5-8 的活性口袋与 Y227 有关氢键和内质网 E3 泛素连接酶结合。综上，本研究进一步开发优化了基于内质网 E3 泛素连接酶和内质网相关降解通路（ERAD）的靶向蛋白降解（TPD）平台，拓宽了可被用于靶向降解技术（TPD）的 E3 连接酶库，并为未来针对内质网 E3 泛素连接酶的开发提供参考与帮助。

关键词： 内质网相关降解系统，分子胶，蛋白水解靶向嵌合体，内质网 E3 泛素连接酶，高亲和力配体

Abstract

Targeted protein degradation (TPD) technology has brought unprecedented opportunities to traditional drug discovery, yet the degradation of transmembrane proteins remains challenging. Though indirect strategies including the endosome-lysosome system or transcription factor regulation partially address the issue, their degradation efficacy remains suboptimal or exhibits uncontrollable off-target effects. Transmembrane proteins are folded through the endoplasmic reticulum (ER) membrane during biosynthesis, and they are recognized by ER membrane-localized E3 ubiquitin ligases via the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway. Emerging TPD technologies hijacking ERAD pathway achieve efficient degradation of transmembrane targets, but there is still a good room for the ligands for ER-resident E3 ubiquitin ligases to optimize.

In this study, we developed small-molecule ligands targeting ER-localized E3 ubiquitin ligases for protein degradation. We report the discovery of a series of high-affinity small molecules with dissociation constants ranging from nM to μ M concentrations. These molecules suppress cancer cell survival phenotypes with ER-E3 dependence, which may be explained by their degradation of specific target proteins. Structural analysis revealed molecular function groups that play decisive roles in small molecule-E3 interactions, with evidence supporting their binding to the ER-E3 ligase through hydrogen bonding with Y227 within the active pocket formed by transmembrane domains 5-8. In summary, this study further develops an ERAD-based TPD platform, expands the repertoire of E3 ligases applicable for TPD technologies, and provides valuable references for future development targeting ER-resident E3 ubiquitin ligases.

Key words: ERAD, Molecular glue, PROTAC, ER-E3, High-affinity ligand

一、前言

1.1 研究目的和意义

在基于泛素化降解途径 E3 连接酶设计的小分子胶或分子化合物中，目前比较成熟、得到充分开发的 E3 连接酶数量非常有限。这些 E3 连接酶普遍定位于细胞质，因此它们靶向并降解分泌蛋白或跨膜蛋白的能力受限。本课题旨在筛选并设计基于内质网蛋白质质量控制系统中的内质网 E3 泛素连接酶的小分子胶或分子化合物，拓宽可以用于靶向跨膜或分泌蛋白的 E3 连接酶库，并利用基于内质网 E3 泛素连接酶的靶向小分子为膜蛋白提供降解方案。

1.2 研究背景

靶向蛋白质降解（TPD, targeted protein degradation）是一种基于细胞内的天然蛋白质降解系统的蛋白质降解技术。这项技术通过理性设计的小分子提高目的蛋白（Protein of interest, POI）和降解通路中的靶向蛋白（target protein）的亲和力，从而实现目的蛋白的降解^[1]。靶向蛋白质降解技术以一种与传统的化学小分子或生物大分子抑制剂不同的方式，为特定的疾病相关蛋白提供了药物开发的可能^[2]。相比于对结合位置和结合能力都有一定要求、因而在许多情况下难以成药的传统抑制剂，TPD 技术设计的小分子对目标蛋白的亲和力要求较低，对结合位置也更加宽容。同时，由于其催化型作用机制（MoA），这些小分子无需与蛋白质 1:1 结合，因此往往相比传统的小分子抑制剂在降解效率上也更加理想。

靶向蛋白质降解最广泛利用的蛋白质降解系统是泛素化-蛋白酶体降解途径（UPS, Ubiquitin-proteasome pathway）。^[1]基于泛素化-蛋白酶体途径设计的分子包括两大类：分子胶（Molecular Glue）小分子或蛋白水解靶向嵌合体

（PROTAC）小分子化合物。通过诱导特定的 E3 连接酶复合物为目的蛋白打上泛素化修饰标签，这些小分子将目的蛋白引导向蛋白酶体并促成它们的降解，从而实现病理蛋白的消除。其中，分子胶小分子一般本身具有双功能性，同时具有 E3 泛素化酶和目的蛋白的亲和能力。由于其分子量较小，分子胶小分子也具有更好的药理学特性。而蛋白水解靶向嵌合体小分子化合物一般通过特定

的连接子（Linker）将分别具有 E3 泛素化酶亲和力和目的蛋白亲和力的两个不同的小分子接头（Ligand）连接，组成异双功能分子化合物。这种模块化的理性设计思路使得对于同一个 E3 泛素连接酶配体设计针对不同目的蛋白的靶向蛋白降解化合物变得可能^[3,4]，大大降低了药物开发中配体筛选的随机性和依赖性，使得成本更加可控。

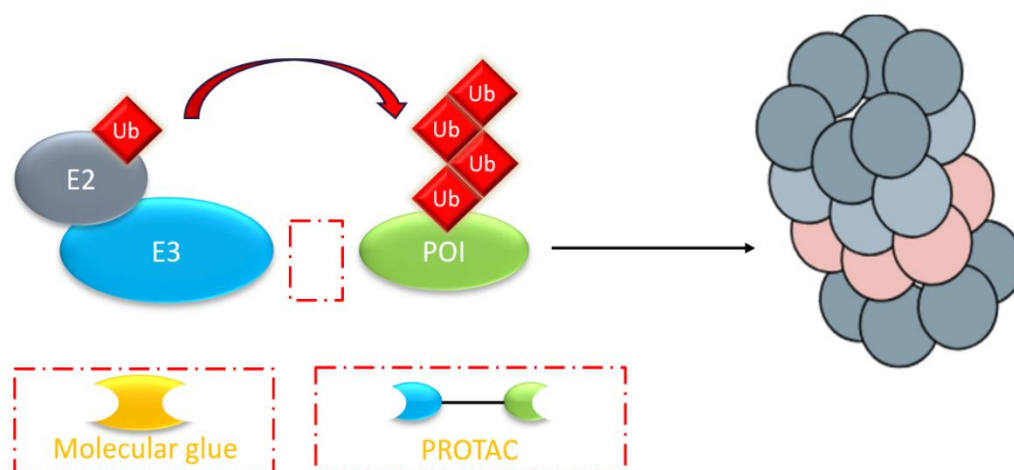


图 1 基于泛素化-蛋白酶体降解的分子胶（Molecular glue）与蛋白水解靶向嵌合体（PROTAC）药物作用机制

具有 E3 泛素连接酶（E3）和目的蛋白（POI）亲和力的小分子（分子胶（Molecular Glue）或蛋白水解靶向嵌合体（PROTAC））促进目的蛋白与 E3 泛素连接酶的蛋白互作，诱导目的蛋白被打上泛素标签（Ub），并被蛋白酶体降解

与巨大的成药潜力形成对比，在目前人类蛋白质组已知的 600 多种 E3 泛素连接酶中，仅有少数 E3 泛素连接酶被尝试用于靶向蛋白质降解设计。由于具有高亲和力和成药性的 E3 泛素连接酶配体小分子的匮乏，分子胶和蛋白水解靶向嵌合体的设计均受到限制。同时，由于泛素化蛋白酶体系统（UPS）定位于细胞质中，利用该系统的细胞跨膜蛋白和分泌蛋白的靶向蛋白降解方案效果并不理想。近年来，一些替代性的方案被开发，包括介导膜蛋白形成内体回收并引导到溶酶体降解途径的 LYTAC 技术^[5]和通过降解关键转录因子调低膜蛋白表达的间接转录调控技术^[6]。然而，相关研究人员均在文章中指出这些方案均存在降解效率限制或具有无法接受的脱靶效应等问题，尚无法达到理想的膜蛋白降解效果、进入临床水平的运用。

内质网相关蛋白降解系统（ERAD, Endoplasmic Reticulum-Associated

Protein Degradation) 是一种与泛素化-蛋白酶体途径非常相似的蛋白质质量控制系统。大多数跨膜蛋白或分泌蛋白的生物发生定位在内质网中, 而内质网质量控制系统负责降解其中错误折叠或未完全折叠的蛋白。基于酵母作为实验系统的研究指出, 这些错误折叠或未完全折叠的蛋白首先在内质网膜被内质网 E3 泛素连接酶复合物捕捉并打上泛素化修饰标签。这些泛素标签随后作为信号, 促进蛋白转膜到细胞质侧, 并被引导到蛋白酶体中降解^[7,8]。

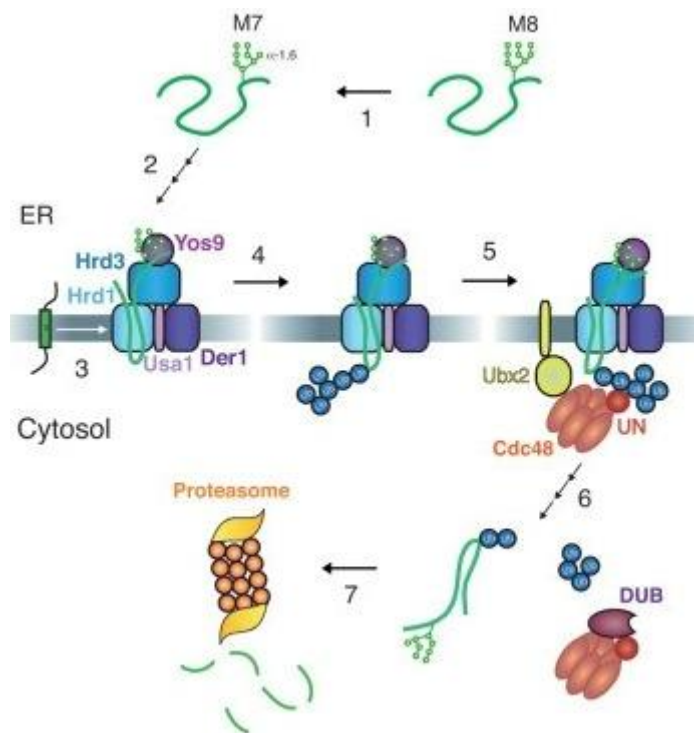


图 2 内质网相关蛋白降解系统 (ERAD) 模式图

图片摘自 Wu X et al. (2018) ^[8]。内质网相关的错误折叠或未完成折叠的蛋白经过一系列的调控。在被 E3 连接酶泛素化修饰后, 这些蛋白转膜进入胞质侧并通过蛋白酶体降解, 实现内质网相关蛋白的质量控制。其详细步骤包括: 1, 通过糖苷酶将错误折叠的糖蛋白 N 端糖链从 8 个甘露糖修剪到 7 个; 2-3, 错误折叠片段被内质网 E3 泛素连接酶复合物识别并进入; 4, 蛋白被内质网 E3 泛素连接酶复合物多泛素化; 5, Cdc48 ATP 酶被募集到 ER 膜上; 6, 蛋白在 Cdc48 帮助下转膜并进入细胞质, 去泛素化酶修剪泛素链, 允许底物从 Cdc48 中释放; 7, 底物被蛋白酶体降解

这种高度相似性使得靶向内质网 E3 泛素连接酶成为可能的跨膜或分泌蛋白降解方案。有趣的是, 近期一项研究通过解析 PD-L1 降解剂的作用机制 (MoA), 发现其小分子基于内质网 E3 泛素连接酶来靶向其目的膜蛋白降解^[9]。为了进一步验证内质网 E3 泛素连接酶的靶向可行性、拓宽可用于靶向的 E3 连接酶库, 筛选令人满意的内质网 E3 泛素连接酶的配体小分子是必要的。

优秀的配体小分子应该具有与内质网 E3 泛素连接酶的良好亲和力。

对可作为分子胶和的蛋白水解靶向嵌合体（PROTAC）的小分子筛选往往基于对 E3 泛素连接酶配体的筛选^[10]；在此基础上，这些小分子的分子量

（MW）不应该超过 1000，拥有充足的氢离子供体和受体并能够与内质网 E3 泛素连接酶形成相互作用。在后续成药过程中，配体小分子的活泼氢数量决定了其是否可以作为蛋白水解靶向嵌合体（PROTAC）的可选配体，而配体小分子的溶解性则决定了加药时是否能够达到有效治疗剂量^[11]。得到合适的配体小分子后，则可以在此基础上进步寻找其作为分子胶小分子的潜力，并探究这些小分子成为蛋白水解靶向嵌合物（PROTAC）的接头的可能。对于一个可行的分子胶或蛋白水解靶向嵌合体（PROTAC）接头，其衍生物也往往具有成为分子胶或接头的潜质^[10]，这是由于它们经常具备相似或相同的互作模式：著名的沙利度胺及其衍生物就通过相同的戊二酰胺环与细胞质 E3 泛素连接酶 CRBN 形成互作，插入浅三色氨酸活性口袋并进一步诱导底物-小分子-E3 泛素连接酶的三元复合物形成^[12]。

1.3 主要研究内容

基于不同 E3 泛素连接酶进行设计的分子胶小分子和蛋白水解靶向嵌合物（PROTAC）小分子化合物已经得到了广泛的实验和临床验证，其中部分已经上市。

本课题首先在体外模型中，利用纯化的内质网 E3 泛素连接酶蛋白，对具有结合可能的小分子库进行筛选。通过微量热泳动技术（MST, Microscale Thermophoresis）和表面等离子共振技术（SPR, Surface Plasmon Resonance），分别从结合动力学和热力学对配体小分子-内质网 E3 泛素连接酶蛋白偶联体的互作进行检测，鉴定其亲和力水平，并从其中挑选理想的小分子。

对于体外模型纯化蛋白实验中表现良好的小分子，基于野生型（WT）和内质网 E3 泛素连接酶基因敲除型（KO）的 U251-MG 人类星型胶质细胞瘤细胞，进一步进行细胞表型的确认并对可能的靶点进行探索。通过加药后细胞死亡的表型初步筛选可能存在癌细胞靶点和对应药效的潜在分子胶小分子。将这些小分子通过蛋白质液相二级质谱（LS-MS/MS）进行定量分析，比较加药组蛋白丰度在野生型（WT）和敲除型（KO）细胞中的差异，确认潜在分子胶小

分子的可能降解靶点。随后，通过细胞内外源过表达携带荧光标签的潜在目的蛋白，通过对加药前后荧光强度的定量分析进一步验证质谱得到的潜在靶点可靠性。

目前内质网 E3 泛素连接酶的结构没有精度足够的冷冻电镜解析结果，这为确定小分子和内质网 E3 泛素连接酶的具体结合模式造成了困难。此外，由于小分子会诱导目的蛋白的降解，这可能对细胞内验证内质网 E3 泛素连接酶和目的蛋白的互作验证造成干扰。为了进一步确定配体小分子和内质网 E3 泛素连接酶可能的结合位点，本课题首先通过分子对接模型预测，对体外模型纯化蛋白检测中具有亲和力的配体小分子进行分析。进一步地，结合内质网 E3 泛素连接酶截短蛋白和氨基酸点突变蛋白的体外模型纯化蛋白检测结果，本课题进行结合规律的迭代验证。

本课题靶向的内质网 E3 泛素连接酶是一种全新的 E3 连接酶，筛选并寻找它的高亲和力配体小分子将使得基于它进行分子胶或蛋白水解靶向嵌合体

（PROTAC）设计变的可能。由于内质网 E3 泛素连接酶本身的特点，基于它开发的靶向蛋白质降解技术对跨膜蛋白和分泌蛋白的降解能力相比其他 E3 连接酶库具有优越性，提供全新且高效的蛋白降解方案。基于针对筛选的配体小分子进行分子对接得到的内质网 E3 泛素连接酶和配体小分子结合位点的分子模型对未来针对内质网 E3 泛素连接酶的开发具有一定的参考意义，并能够对相关的配体小分子筛选提供帮助。

二、材料与amp;方法

2.1 核心材料，试剂，仪器与软件

表 1 核心材料&试剂，其来源，识别码与货号

材料或试剂	来源	货号	识别码 (RRID/CAS)
细胞培养相关			
Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11965	N/A
Fetal bovine serum	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10082-147	N/A
Penicillin-streptomycin	Thermo Fisher Scientific	Cat# 15140-122	N/A
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific	Cat# 12605028	N/A
Phosphate buffer saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10010049	N/A
试剂			
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	Cat# D2650	CAS: 67-68-5
MG132	Selleck	Cat# S2619	CAS: 1211877-36-9
WZ8040	Selleck	Cat# S1179	CAS: 1214265-57-2
Lipofectamine 3000	Thermo Fisher Scientific	Cat# L3000075	N/A
Protein marker	Thermo Fisher Scientific	Cat# 26616	N/A
DNase I	Sigma-Aldrich	Cat# DN25	N/A
实验小分子			
#1	本课题		
#97	本课题		
#97-1	本课题		
#120	本课题		
#120-1	本课题		
#VH-4	本课题		
#VH-5	本课题		
#VH-6	本课题		
#V-3	本课题		
#V-4	本课题		
#V-5	本课题		
#H-1	本课题		
实验模型：细胞			
人 U-251MG 细胞系	HyCyte	Cat# TCH-C366	

重组 DNA		
质粒: N20-muGFP-TTR-mCherry	This paper	N/A
质粒: TTR-muGFP-mCherry	This paper	N/A
质粒: ER-E3 C _{terminal} Delete	This paper	N/A
质粒: ER-E3 TM5-8	This paper	N/A
质粒: ER-E3	This paper	N/A
质粒: ER-E3-Y227F	This paper	N/A
实验软件与算法		
GraphPad Prism v10.1.1	GraphPad Software	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
Excel	Office	SCR_002285
AutoDock Vina-v1.5.7	CCSB	SCR_011958
AutoDockTools	CCSB	SCR_012746
PyMOL	Schrödinger	SCR_000305

部分未发表的小分子货号与名称使用编号替代，对货号 and 识别码进行保密处理。无效信息使用 N/A 表示。

2.2 核心实验仪器

表 2 核心实验仪器与型号

仪器名称	型号
高灵敏微量热泳动仪	Monolith X
高通量 SPR 生物分子互作系统	Biacore 8K
流式细胞分析仪	CytoFlex LX
活细胞分析系统	Incucyte® S3
液相色谱质谱仪	Q Exactive™ HF-X

2.3 实验方法

细胞培养

所有细胞均于 37°C、5% CO₂湿润培养箱中常规传代培养。U-251MG 细胞购自海星生物科技有限公司（中国苏州），使用补充 10% FBS 和 1% P/S 双抗的 DMEM 培养基培养，每 4 天传代，

微量热泳动技术（MST）

准备试剂：蛋白 Buffer（SEC 缓冲液（150 mM NaCl（sigma）、20 mM HEPES pH 7.5（sigma）、0.01% LMNG + 0.002% CHS、0.5 mM TCEP），小分子, 5%DMSO Buffer，ER-E3 蛋白(纯化的重组蛋白根据 Protein labelling kit RED-NHS（Nanotemper，货号 L001）说明书进行荧光标记。），DMSO。如果

蛋白有部分沉淀，为避免聚集或者吸附，可离心（12000rpm，4°，10min）去除可能的沉淀防止遇到聚集或者吸附。

配置对应浓度的各准备液，小分子最高浓度稀释到 40 μ L（注意此时溶液 DMSO 浓度应为 5%），蛋白根据浓度和 Cy5 标签量决定，一般稀释到 30nM（终浓度 15nM）。配置浓度梯度，在 2-16 号管各添加 10 μ L 5%DMSO，1 号管添加 10 μ L 小分子，随后向 2 号管添加 10 μ L 小分子，梯度稀释，每次需充分吹打（一般每孔至少吹打 30 次）。向 1-16 号管添加 10 μ L 蛋白液，混匀，避光孵育 5-10 分钟。按序吸收样品，使用 Monolith X 仪器（NanoTemper Technologies）进行微量热泳动（MST）实验，数据通过 Nanotemper 分析软件（v.2.6.3）处理并计算解离常数（ K_d ）。

表面亲和力共振（SPR）

表面等离子体共振（SPR）实验使用 Biacore 8000 仪器（Cytiva）完成，数据经 Biacore Insight Evaluation 软件 4.08（Cytiva）分析。运行缓冲液为反应缓冲液（300 mM NaCl（sigma）、20 mM HEPES pH 7.5（sigma）、0.01% LMNG + 0.002% CHS、0.5 mM TCEP、2% DMSO）。纯化重组蛋白（0.2 毫克/毫升）用 10 mM NaAc（pH 4.5，Cytiva，货号 BR100350）稀释后，通过标准胺偶联法（Cytiva，货号 BR100050）固定至 CM7 传感器芯片（Cytiva），表面密度约 40000 共振单位。所有待测化合物母液（溶解于 DMSO）经反应缓冲液稀释后用于检测。稀释样品采用多周期动力学/亲和力模式分析，化合物接触时间为 120s。以 30 μ L/min 流速依次注入稀释样品，每次进样后设置 60s 解离时间使化合物-蛋白复合体解离。获得的传感图通过 Biacore Insight Evaluation 软件 4.08（Cytiva）拟合多周期亲和力模型。

LC-MS/MS 无偏蛋白质质谱

为进行蛋白质组学分析，各样品取 20 μ g 蛋白裂解液，分析前，样品以含 0.1% 甲酸的水溶液复溶并经肽段定量后，进行液相色谱-串联质谱分析（LC-MS/MS）。

针对蛋白质组谱分析的样品，肽段通过 Q Exactive HF-X 混合四极杆-静电

场轨道阱质谱仪（Thermo Fisher Scientific）进行分析。冻干肽段样品以溶剂 A（0.1%甲酸水溶液）复溶后，加载至 2cm 自填充捕获柱（内径 100 μ m，填充 3 μ m ReproSil-Pur C18-AQ 填料，Dr. Maisch GmbH），并以溶剂 A 平衡。随后，肽段在 15cm 长、内径 150 μ m 的分析柱（填充 1.9 μ m ReproSil-Pur C18-AQ 填料，Dr. Maisch GmbH）中以 600 nL/min 恒定流速进行 75min 梯度分离（溶剂 A：0.1%甲酸水溶液；溶剂 B：0.1%甲酸/80%乙腈；梯度程序：0–75min，0min，4% B；0–10min，4–15% B；10–60min，15–30% B；60–69min，30–50% B；69–70min，50–100% B；70–75min，100% B）。洗脱肽段经 2 kV 电压电离后进入质谱仪。

质谱检测采用数据依赖性采集模式：MS1 全扫描：通过静电场轨道阱质量分析器（分辨率 120,000）采集 m/z 300–1400 范围内的离子，自动增益控制（AGC）目标值设为 3E+06，最大离子注入时间 80ms；MS/MS 碎裂：选择丰度前 60 的前体离子，在 HCD 池中以标准化碰撞能量 27%进行碎裂，碎片离子经静电场轨道阱分析器（分辨率 7,500）检测，MS/MS 的 AGC 设为 5e4，最大离子注入时间 20ms；动态排除：已采集前体离子在 12s 内排除重复碎裂。

质谱数据分析及筛选标准见图 6。

流式细胞术

将 U251-MG 及 U251-MG-ER-E3-KO 细胞以每孔 50,000–100,000 个的密度接种于 12 孔板中，使用 lipo3000（Thermo Fisher Scientific）按照说明书转染质粒 N20-TTR-muGFP-mCherry 或 TTR-muGFP-mCherry，转染 8h 后换液并分别用 DMSO 或配体小分子#1 处理 48h。处理后，用 0.5 mM TrypLE（每孔 200 μ L）于 37°C 孵育 10min 消化细胞，滤去细胞粘连。使用 CytoFlex LX 流式细胞仪检测，数据经 FlowJo 软件分析。细胞表面 TTR 表达水平以 muGFP 荧光强度中位数计算，并以 mCherry 荧光强度中位数作为转染效率校准内参，记 muGFP/mCherry 为（MM）公式为：（处理组 MM -背景 MM）/（未处理组 MM - 背景 MM） $\times$ 100。结果通过 GraphPad Prism 10 软件绘图。

配体小分子#120 与内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）分子对接

ER-E3-#120 复合物结构预测通过 AutoDock Vina 完成。将 AlphaFold 预测

的 ER-E3 结构与#120 结构分别作为受体和配体，使用 AutodockTools 去除水分子并添加氢原子。可旋转键根节点（Torsion Tree root）采用默认参数检测。通过 AutodockTools 设定 Vina 对接的 ER-E3 网格框（Grid box），覆盖其全部序号为 5-8 的跨膜结构域（TM），排除 RING 结构域及后续 C 端无序区域（因 AlphaFold 预测该区域为低置信度的无规则卷曲）。使用 PyMOL 可视化模型并分析#120 与 ER-E3 间的氢键相互作用，相关残基被列为潜在结合位点及突变候选位点。

细胞杀伤

将 U251-MG 及 U251-MG-ER-E3-KO 细胞以每孔 500 个的密度接种于 96 孔板中，充分贴壁后分别用 DMSO 或配体小分子处理。处理后，通过 Incucyte® S3 细胞活性分析仪持续检测其每孔细胞覆盖率，参数设定为默认，每孔 4h 记录一次，每次记录 3 次重复。细胞覆盖率以每次记录的平均值计算，结果通过 GraphPad Prism 10 软件绘图。

统计学分析

两组间统计学比较采用非配对双尾 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）及标明的事后多重比较检验。针对不同时间点采集的连续性数据，采用双因素方差分析（two-way ANOVA）进行统计学比较。使用 GraphPad Prism 进行统计分析时均检验比较组间方差齐性。默认数据服从正态分布，并通过夏皮罗-威尔克检验（Shapiro-Wilk test）验证；若数据显著偏离正态分布，则采用非参数检验。

数据与代码可及性

本文及补充材料中已提供相关数据。本研究使用的开源代码与软件包括：AutoDock Vina（v1.5.7）、AutoDockTools（v4.2）、PyMOL（v3.1）。其他软件包括：Prism（v10.1.1）。

三、研究结果

内质网相关降解系统（ERAD）是一种哺乳动物中高度保守的胞内内质网蛋白质量控制系统。通过作为系统核心调控因素的 E3 泛素连接酶（ER-E3），ERAD 对经过内质网的蛋白实施质控，在内质网膜上为折叠错误或未完全折叠的分泌蛋白和跨膜蛋白进行泛素化标签修饰。这些蛋白随后被转位（Translocation），并在运输到蛋白酶体后降解。由于其与细胞内泛素化-蛋白酶体途径的高度相似性，我们希望开发一种新型靶向蛋白质降解技术，基于这种尚未被开发的内质网相关降解系统（ERAD）实现对靶蛋白的降解。我们先前的研究已经通过理性设计的双功能嵌合小分子化合物（PROTAC）靶向提高复数种目标蛋白和内质网 E3 泛素连接酶（E3-ER）之间的亲和力，并进一步在细胞、动物和体外纯化蛋白模型中验证了小分子化合物诱导的目的蛋白降解。我们验证了这种降解是蛋白酶体和 ERAD 通路依赖的。值得注意的是，由于内质网相关降解系统（ERAD）本身对于跨膜蛋白的选择性，基于这种系统设计的小分子化合物在传统小分子化学降解剂或抑制剂难以处理的膜蛋白领域显示出具有重要潜力。

在先前工作中，我们意外发现了内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的第一代配体小分子。目前，用于构建这些小分子化合物的配体小分子，尤其是更加重要的内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）配体小分子仅具有毫摩至微摩级别的低亲和力。这意味着，通过优化配体小分子的亲和力，基于内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的蛋白降解效能可以得到进一步优化。基于我们先前工作，在这里我们进一步对更加广泛的小分子库进行筛选，以优化具有 E3 泛素连接酶（ER-E3）亲和力的小分子配体，并基于这些小分子开发更多的潜在降解靶点。

3.1 内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）亲和的小分子筛选与分析

我们先前开发了基于小分子微阵列芯片（SMM）的扫描斜入射反射率差异（OI-RD）显微镜映像检测化合物-蛋白质相互作用的技术^[13]。基于这项技术，我们在芯片上印记了 3375 种化合物。然后我们纯化了人源内质网 E3 泛素连接酶蛋白（ER-E3），并将其在 SMM 上孵育。基于 SMM 的筛选和验证，我们初步鉴定潜在的内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的配体小分子并获得了包含 224 个小分子的候选库。

通过微量热涌动技术 (MST) 和表面亲和力共振 (SPR), 我们对候选库进行了筛选, 以寻找拥有最佳的亲和力的配体小分子。在经过了大量的筛选后, 我们得到了一系列的亲和力检测结果, 并从中注意到了多个有潜力的配体小分子。他们和内质网 E3 泛素连接酶 (E3-ER) 的亲和力 (K_d) 大多在 10^{-7} - 10^{-5} M 水平。其中, 我们注意到了三个表现最优异的配体小分子: #1、#97 和 #120。

我们最早发现了 #1。与我们先前工作中使用的接头相比, #1 的表现更加优秀, 在微量热泳 (MST) 和表面亲和共振 (SPR) 中均表现了与内质网 E3 泛素连接酶 (E3-ER) 良好的亲和力, 并且测定得到的解离常数 (K_d) 交叉验证 (图 3A&3B)。为了进一步确定 #1 的结合特异性, 我们进一步测试了 #1 小分子的衍生物 N4127 和 N0155 的表现, 它们的核心官能团结构与 #1 相同, 而将 #1 的部分酚基替换为了甲基。与 #1 相似的, 这些衍生物的测定解离常数 (K_d) 大约为 $10\mu\text{M}$ (图 3C&3D)。

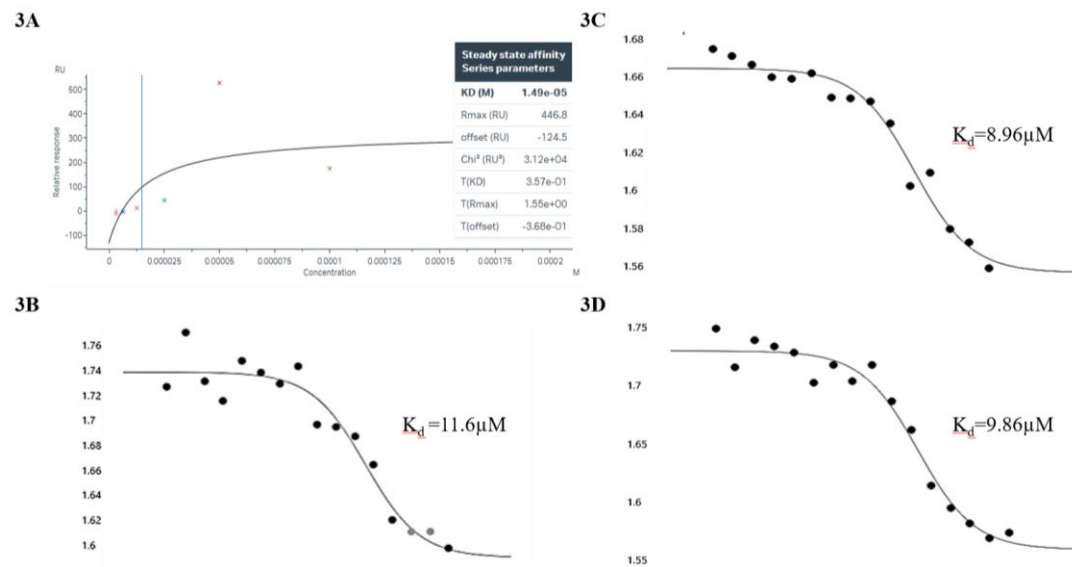


图 3 配体小分子#1 及其衍生物的解离常数 (K_d) 检测测结果 (n=2)

具有代表性的配体小分子 #1 及其衍生物的表面亲和力共振 (SPR) 和微量热泳 (MST) 检测图。3A (SPR) 和 3B (MST): #1 配体小分子与内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 特异性结合, 测定的解离常数 (K_d) 分别为 $14.9\mu\text{M}$ (3A) 和 $11.6\mu\text{M}$ (3B); 3C 和 3D: #1 的衍生物 N4127 (3C) 和 N0155 (3D) 与内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 特异性结合, 测定的解离常数 (K_d) 均在 $10\mu\text{M}$ 水平

在随后的筛选中我们得到了 #97 和 #120。他们的亲和力表现更加优异, 微量热泳 (MST) 测定的亲和力在 μM – nM 级别, 并且具有良好的可重复性。(图 4C&4D), 表面亲和共振 (SPR) 的交叉验证获得了一致的结果。(图 4A&4B) 有

有趣的是，在分子结构上，它们具有高度的相似性，具有相同的 EWJ-1 和 EWJ-2 这两个官能团，并不具有其他可能和内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的氨基酸残基相互作用形成氢键的吸电子基团。我们认为这些官能团中的某一个或二者对于#97 和#120 配体小分子与内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的高亲和力具有决定性的作用。

根据对于#1，#97 和#120 小分子的体外纯化蛋白互作检测的交叉验证结果，我们认为他们是有潜力的内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）配体。

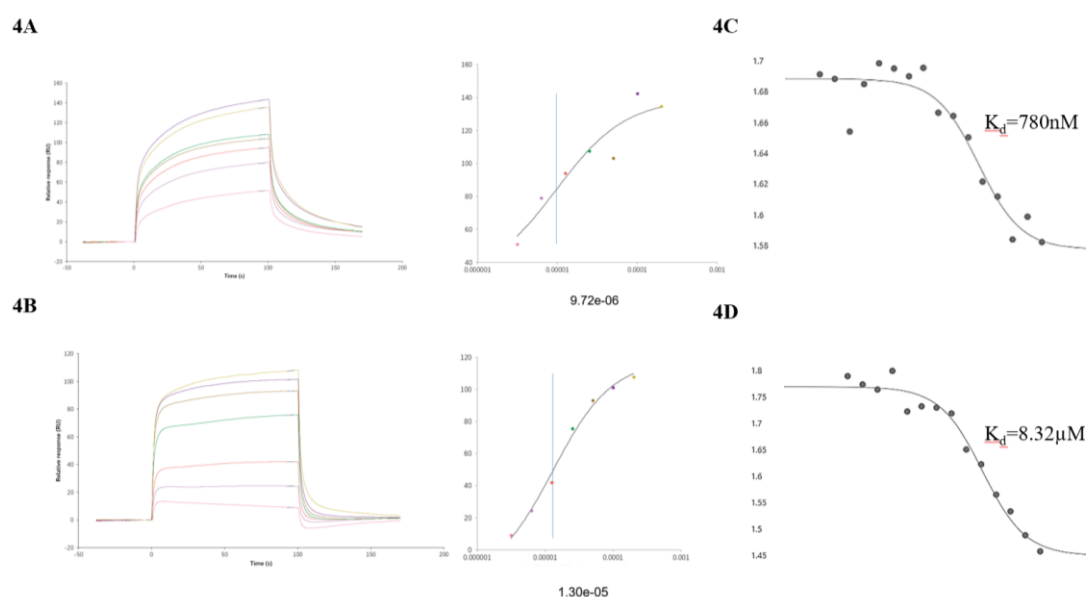


图 4 配体小分子#97 和#120 的微量热涌动技术（MST）和表面亲和力共振（SPR）检测结果（n=2）

具有代表性的配体小分子#97 和#120 的表面亲和力共振（SPR）和微量热泳（MST）检测图。4A 和 4B（SPR）：#97 测定的解离常数（ K_d ）为 9.72μM（4A），#120 测定的解离常数（ K_d ）为 13.0μM（4B）；4C 和 4D（MST）：#97 测定的解离常数（ K_d ）为 780nM（4C），#120 测定的解离常数（ K_d ）为 8.32μM（4D）

3.2 细胞水平表型验证与靶点鉴定

根据体外纯化蛋白模型中小分子检测的结果，接下来我们在细胞中对小分子进行加药，测试这些小分子是否如我们预料的那样通过内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）调控细胞表型。我们首先在 U251-MG 细胞的野生型（WT）和作为对照的内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）敲除型（KO）中，进行了持续性的 10 μM 给药（每 48h 进行换液补药，保证培养基中药物浓度），并通过细胞延时显微镜对细胞数量进行持续性跟踪。

我们选择了一种在已知文献中杀伤效果不依赖内质网相关降解系统（ERAD）

的 EGFR 抑制剂 WZ8040 作为非特异性杀伤对照。与其他的 EGFR 抑制剂相似的^[14]，WZ8040 具有对 U251-MG 细胞的内质网相关降解系统（ERAD）非依赖性杀伤，野生型（WT）和敲除型（KO）细胞的生存效果没有显著区别（图 5A）。相对的，三个小分子加药组均表现出了对野生型细胞的杀伤，而对敲除型则没有类似的杀伤，差异具有显著性（ $p < 0.05$ ）（图 5B, 5C&5D）。值得注意的是，#97 和 #120 在 7day（100h）的持续时间内都有效的抑制了野生型细胞的生长。

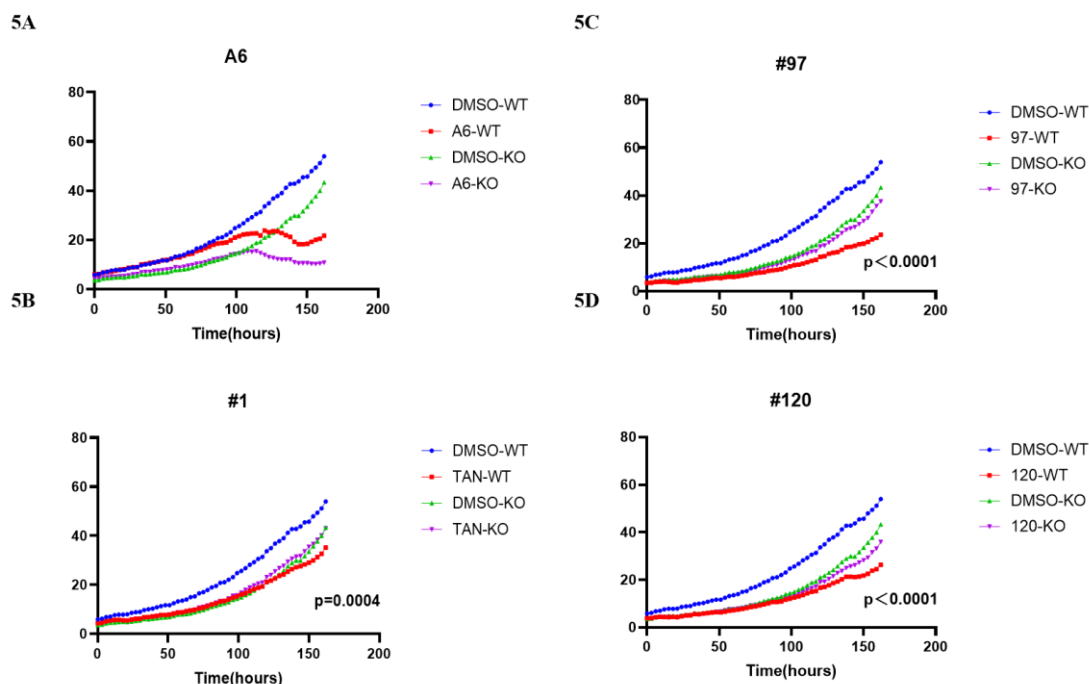


图 5 小分子加药处理下的野生型（WT）和内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）敲除型（KO）U251-MG 细胞杀伤结果（n=3）

横坐标为 10 μ M 加药处理后的持续时间（h），纵坐标为细胞覆盖率（%）。5A：作为对照的非特异性杀伤药物；5B, 5C 和 5D：#1（5B）、#97（5C）和 #120（5D）的杀伤表现， $p < 0.001$

小分子处理下的细胞表型的杀伤结果提示了它们可能通过内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）影响了某些底物水平，从而诱导 U251-MG 细胞死亡。为了进一步确认这些小分子影响细胞生存的可能通路或靶点，我们选择了最先从体外纯化蛋白筛选中得到的 #1 配体小分子，对野生型（WT）和敲除型（KO）的细胞进行了 48h 的 10 μ M 给药，并将获取到的细胞样品进行了无偏的 LC-MS/MS 质谱分析。对于野生型（WT）中蛋白丰度的差异表达筛选得到了 CA9（Q16790）和 TTR（P02766）这两个潜在靶点（图 6A）。CA9 在多种癌细胞型高表达，通过 VHL-HIF1 α -CA9 轴，促进肿瘤细胞存活（抑制多种死亡通路），促进转移^[15]。TTR 存

在 150 多种不同的点突变型，突变或老化导致 TTR 四聚体解离会导致 TTR 淀粉样沉积，并取决于沉积位置导致不同的神经病变^[16]。

随后，我们将敲除型（KO）细胞与野生型（WT）的无偏蛋白质组学结果交叉，以确认小分子给药诱导的蛋白表达差异是否内质网相关蛋白降解系统（ERAD）。与我们的预期一致，CA9 和 TTR 在野生型（WT）中表现出的加药诱导蛋白差异表达在敲除型（KO）中被挽救（图 6B）。这些结果表明，#1 配体小分子能够诱导 CA9 和 TTR 的蛋白水平降低，并且这种诱导具有内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）依赖性。

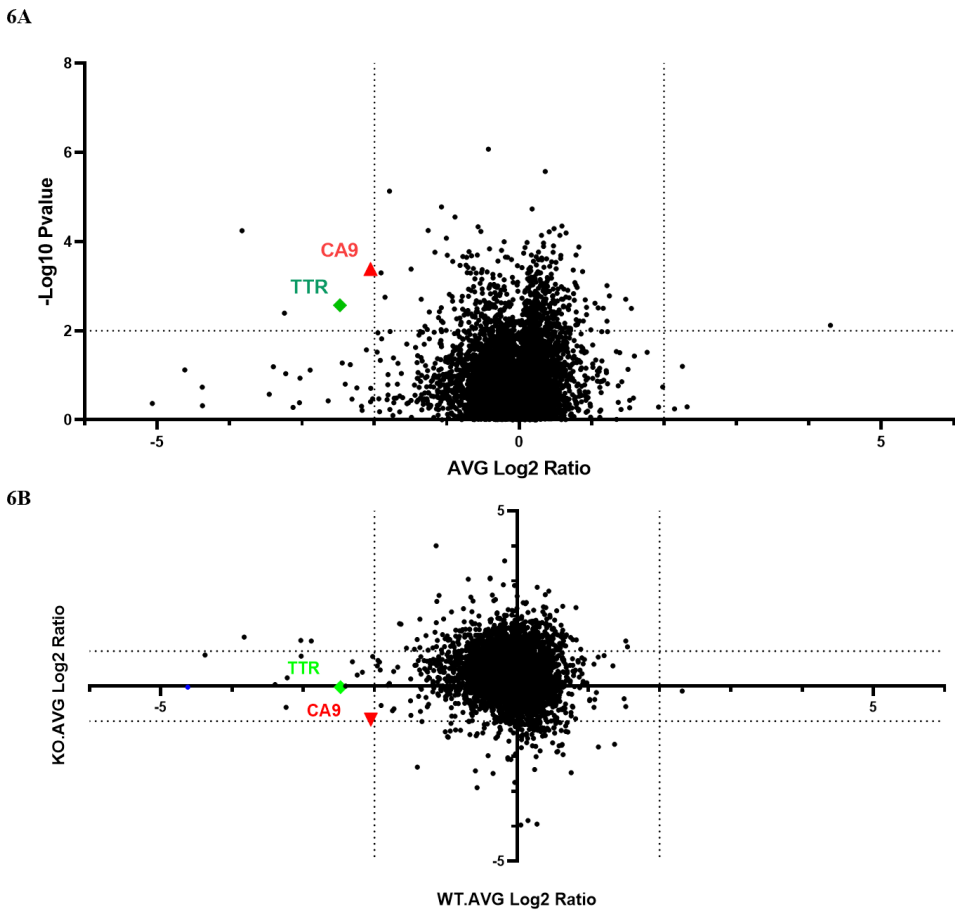


图 6 配体小分子#1 给药后的小分子无偏质谱火山图 (n=3)

U251-MG 野生型（WT）和内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）敲除型（KO）细胞中的无偏质谱统计结果。6A：野生型（WT）中#1 给药组和 DMSO 对照组的蛋白丰度差异表达分析结果。横坐标为平均蛋白丰度变化（Avg Log₂FC），纵坐标为显著性水平（-Log₁₀P_{value}），以显著性水平 $p < 0.01$ 、 $|\text{Log}_2 \text{FC}| > 2$ 作为蛋白具有显著差异表达的筛选标准；6B：野生型（WT）与敲除型（KO）细胞的蛋白丰度变化十字图，横坐标为野生型细胞加药组与 DMSO 组蛋白丰度变化（WT.Avg Log₂FC），纵坐标为敲除型细胞加药组与 DMSO 组蛋白丰度变化（KO.Avg Log₂FC）。以野

生型中丰度变化 $|\text{WT.Avg Log}_2\text{FC}|>2$ 、敲除型中丰度变化 $|\text{KO.Avg Log}_2\text{FC}|<1$ 作为蛋白丰度变化具有野生型特异性的筛选标准

3.3 小分子-蛋白结合位点预测与结构解析

配体小分子#97 和#120 的分子结构相似性与其出色的解离常数 (K_d) 表现让我们关注它们和内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 的可能结合位置。人内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 的酵母同源蛋白的结构已经作为内质网相关降解系统 (ERAD) 蛋白通道复合物的一部分被冷冻电镜 (Cryo-EM) 解出^[17], 然而对于人源蛋白的结构解析依然极具挑战性。内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 的有序结构域分子量 (~37.8kDa) 对于冷冻电镜来说过小, 其本身难以结晶化也给结构解析带来更多困难。因此, 我们通过体外纯化蛋白亲和力测定实验结合人工智能辅助预测的方式来寻找小分子-内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 的结合位置。

基于配体小分子#97 和#120 高度相似的核心官能团, 我们对药物库中同样具有 EJH-1 和 EJH-2 官能团的#97 或#120 衍生物进行了批量的测试 (97-1, 120-1, VH-4, VH-5&VH-6)。为了分辨这两者在小分子-E3 泛素连接酶复合物形成中分别的作用, 我们也选择了单具有 EJH-1 (V-3, V-4&V-5) 或 EJH-2 官能团 (H-1) 的对照小分子。如同我们的预期, 这些小分子在 MST 中均表现出了和内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 优秀的亲和力, 包括仅单具有 EJH-1 或 EJH-2 的小分子 (表 3)。同时, 它们的分子量 (MW) 均小于 500。

表 3 带有 EJH-1、EJH-2 的配体小分子微量热涌动技术 (MST) 检测参数 (n=2)

编号	MW	ER-E3 K_d	ER-E3 C _{terminal delete} K_d	ER-E3 TM5-8 K_d
#97-1	395	5.74 μM	16 μM	6.75 μM
#97	416	0.78 μM	2.65	3.22 μM
#120-1	437	27.1 μM	62.1 μM	27.8 μM
#120	472.34	8.32 μM	25.4 μM	8.87 μM
V-3	328	75.7 μM	N/A	107 μM
V-4	347	62.4 μM	85.6 μM	63.7 μM

V-5	324	61.4 μ M	N/A	93.7 μ M
VH-4	355	15.4 μ M	N/A	63.7 μ M
VH-5	458	4.39 μ M	N/A	9.27 μ M
VH-6	317	29.9 μ M	N/A	68.7 μ M
H-1	395	33.5 μ M	47.3 μ M	26.9 μ M

配体小分子及其对应的分子量 (MW); 通过微量热涌动技术 (MST) 测定得到的与内质网 E3 泛素连接酶蛋白的解离常数 (ER-E3 K_d); 内质网 E3 泛素连接酶 1-8 号跨膜结构域重组蛋白的解离常数 (ER-E3 C_{terminal} delete K_d); 进一步敲除 1-4 号跨膜结构域的重组蛋白的解离常数 (ER-E3 TM5-8 K_d)。部分未测数据以 N/A 表示。

基于对于配体小分子#97、#120 及其衍生物的筛选结果, 我们认为 EJH-1 和 EJH-2 均在小分子与内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 的相互作用中起到重要作用。为了进一步从分子水平解释这些官能团的作用方式, 我们关注内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 参与互作的活性口袋和关键氨基酸。基于 alpha-pold2 的高可信预测结果, 多次跨膜蛋白内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 拥有 8 个跨膜结构域(TM1-8)^[18]。因此, 我们首先确认这些配体小分子的结合区域。内质网 E3 泛素连接酶 1-8 号跨膜结构域重组蛋白 (ER-E3 C_{terminal} delete) 与我们测试的配体小分子表现出了不受影响的结合, 这使得我们确认配体小分子结合区域在跨膜结构域区 (表 3)。随后, 我们进一步敲除了内质网 E3 泛素连接酶 (ER-E3) 1-4 号的跨膜结构域 (TM1-4 delete), 并纯化了重组蛋白 (ER-E3 TM5-8)。我们通过微量热泳 (MST) 测定 ER-E3 TM5-8 与小分子的亲和力是否受到了敲除的影响。令人惊讶的是, 这些小分子依然保持着良好的亲和力, 无论它们是带有 EJH-1、EJH-2 中的一种或全部。

根据敲除蛋白的亲和力测定结果, 我们使用分子对接工具 Autodock Vina^[19]。基于 alpha-pold3 预测的内质网 E3 泛素连接酶结构, 分子对接给出了配体小分子 #120 的结合模型 (图 7A)。预测模型对 EJH-1 和 EJH-2 在分子互作中的作用给出了解释。为了验证预测模型的可靠性, 我们根据分子对接模型中关键成氢键氨基酸构建了 Y227F 突变体蛋白。微量热泳 (MST) 的结果验证了这一模型, Y227F

突变成功阻断了#120 和内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的结合（图 7B）。

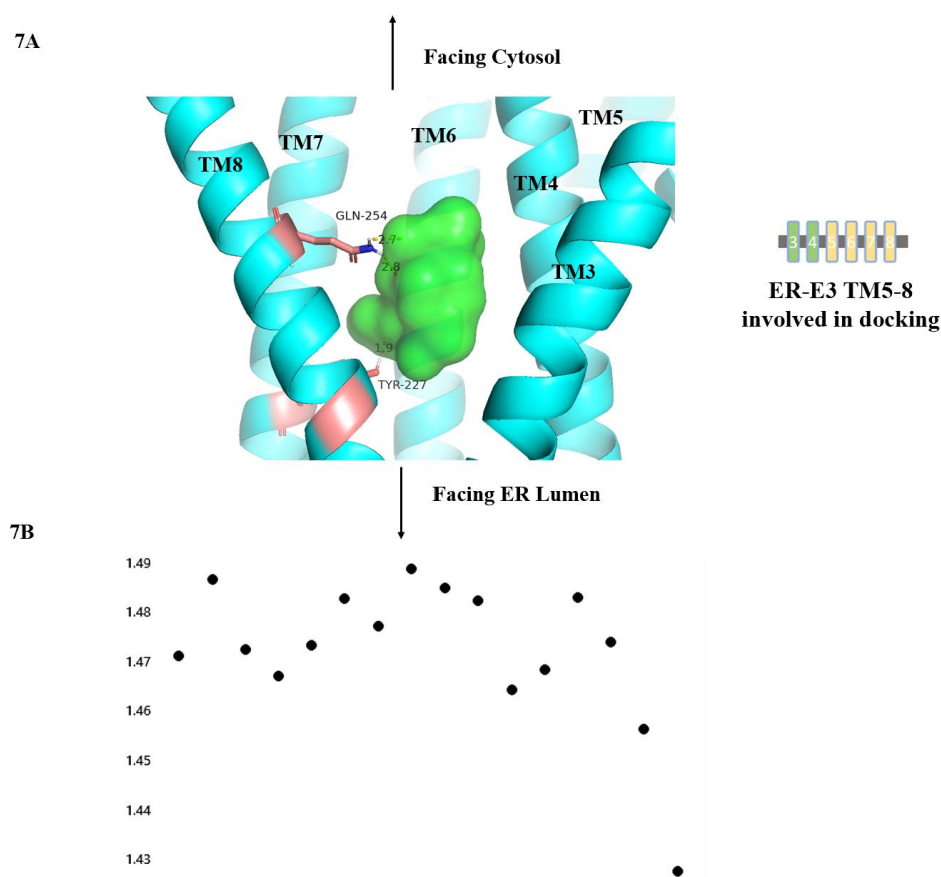


图 7 配体小分子#120 的 Docking 结果和 Y227F 突变蛋白的微量热泳（MST）检测（n=2）

7A: 基于 alpha-pold3 预测的内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）结构，在 TM5-8 跨膜结构域口袋处与#120 进行分子对接。EJH-2 官能团与 GLN254 残基成氢键，EJH-1 官能团与 TYR227 残基成氢键；7B: 具有代表性的#120 和 Y227F 突变蛋白的微量热泳（MST）测定的亲和力。Y227F 突变阻断了#120 和内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的相互作用

为了确认这一结合模型是否可以被应用到分子库中的其他小分子上，我们进一步对#120 的衍生物和其他配体小分子测试，观察 Y227F 突变是否能够影响其他配体小分子的结合。与预期一致的，120 衍生物（#120-1）的结合受到了相似的阻断（图 8A）。然而，#1 和#97 的结合并不受到突变的影响(图 8B&8C)。

总的来说，我们认为#120 和内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的结合位点如同分子对接模型展示的那样，通过与跨膜结构域 TM5-8 区域形成的结合口袋结合，Y227 残基的氢键作用在其中起到决定性作用。这种结合模型对 120 的衍生物同样适用。对于其他如具有 EJH-1 和 EJH-2 配体小分子（#97）或并不含有这

些官能团（#1）的配体小分子，这一模型的解释能力欠佳，有待进一步的结合模型迭代。

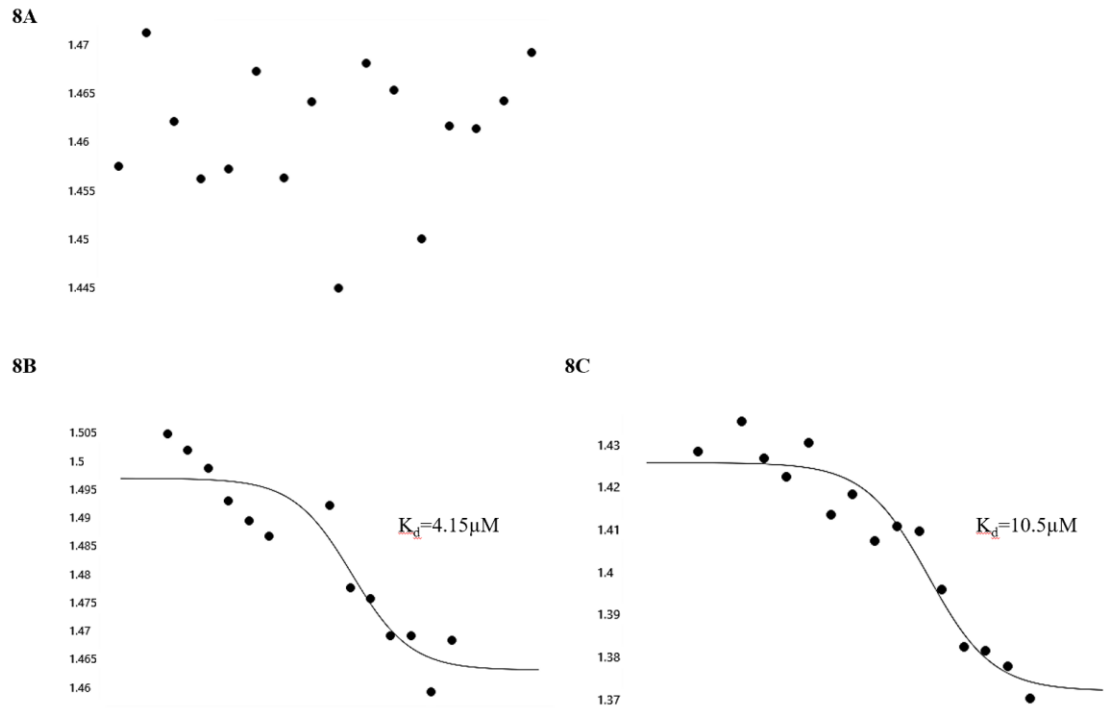


图 8 配体小分子#120-1，#1 和#97 的 Y227F 突变蛋白的微量热泳（MST）检测（ $n=2$ ）

具有代表性的配体小分子#120-1，#1 和#97 的 Y227F 突变蛋白的微量热泳(MST)检测图。8A: Y227F 突变阻断了#120-1 和内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）的相互作用；8B 和 8C: Y227F 突变未影响#1 和#97 的亲和力

四、讨 论

总的来说，我们针对基于 E3 泛素连接酶的小分子靶向蛋白质降解方法，对内质网 E3 泛素连接酶的配体小分子进行了优化，确认其并验证了其作为分子胶（Molecular glue）直接降解目标蛋白的可行性。筛选得到的具有内质网 E3 泛素连接酶亲和力的小分子表现出了 nM 到 μ M 级别的亲和效能（图 3&图 4），并且这些小分子的衍生物也有着相似的表现（表 3），结果得到体外纯化蛋白微量热泳（MST）和表面亲和共振（SPR）的交叉验证。细胞杀伤结果证实这些小分子通过内质网 E3 泛素酶依赖的方式改变 U251-MG 细胞的生存表型，且在长时间内有效抑制了癌细胞增殖（图 5）。无偏蛋白质组学的差异表达分析找到了多个降解靶点（图 6），这可能解释了生存表型。通过人工智能分子对接模型预测和体外纯化蛋白检测结合，小分子和内质网 E3 泛素连接酶的结合口袋与 Y227 氨基酸依赖性被确认（图 7），这种对接模型对于衍生物的解释能力良好，尽管对于其他类型的小分子的解释能力有待进一步迭代（图 8）。实验结果具有良好的可重复性。

基于小分子微阵列芯片（SMM）和微量热泳（MST）的偶联批量配体筛选和配体衍生物筛选得到了内质网 E3 泛素连接酶候选配体库，并根据表面亲和共振（SPR）的结果进行了交叉验证。微量热泳（MST）和表面亲和共振（SPR）检测得到的解离常数（ K_d ）吻合性良好（图 3&图 4）。在体内模型中进一步验证小分子-内质网 E3 泛素连接酶（ER-E3）复合物形成的效率是有必要的，可以通过对于标签化小分子-内质网 E3 泛素连接酶的二元复合物形成检测或小分子诱导的目的蛋白-小分子-内质网 E3 泛素连接酶的三元复合物验证进行确认。需要特别注意，在体内模型中完整的内质网相关降解系统（ERAD）会即时降解在小分子诱导下与内质网 E3 泛素连接酶互作并被打上泛素化修饰标签的目的蛋白，因此在对三元模型验证时需要严格控制降解的时间和给药浓度。

我们在不同的水平对预测的小分子作用机制（MoA）进行了验证。细胞杀伤与无偏蛋白质组结果均表现出了对内质网 E3 泛素连接酶的依赖性（图 5&图 6）。基于对经过小分子配体处理的 U251-MG 细胞进行的质谱丰度差异表达分

析，所测试的配体小分子表现出较好的特异性，除靶标蛋白 TTR 和 CA9 外，出现类似水平降低的仅有 ACTBL2 和 SYF2。相关脱靶效应的影响有待进一步的验证。为了进一步验证靶标蛋白的降解效果，我们设计了基于定量 muGFP-mCherry 双荧光表达的细胞内降解模型，分别构建在 N 端 20 位氨基酸内质网信号肽后和 C 端末尾融合 muGFP 绿色荧光蛋白的质粒，并根据 mCherry 作为内参，定量分析小分子诱导的靶标蛋白降解在 U251-MG 细胞野生型（WT）和内质网 E3 泛素连接酶敲除型（KO）中的表现。目前已经成功构建了稳定瞬时表达的 N 端和 C 端 TTR-muGFP/mCherry 质粒，有待后续进一步验证小分子降解效果与内质网 E3 泛素连接酶依赖性。

目前，对于配体小分子库的筛选主要依靠高通量方法，而有效的小分子-E3 连接酶结合模型能够提高筛选的准确性和效率^[10]。结合人工智能给出的内质网 E3 泛素连接酶蛋白结构和分子对接模型，我们给出并验证了配体小分子通过跨膜结构域 5-8（TM5-8）的活性口袋与 Y227 氨基酸和内质网 E3 泛素连接酶相互作用的对接模型（图 7）。该模型对于配体小分子衍生物同样具有良好的解释力，得到体外纯化 Y227F 突变蛋白结合测试的验证（图 8）。然而，令人惊讶的是，与该小分子具有相同官能团的小分子-内质网 E3 泛素连接酶结合并未被 Y227F 突变阻断。这种区别可能源于两种小分子官能团间空间距离的区别带来的空间位阻差异，需要后续进一步的验证与解释。

源于药物分子库，配体小分子原有的已知代谢通路在其对细胞表型影响中的作用需要得到进一步的关注。例如，#1 在内质网相关降解系统（ERAD）外，还可以通过调节 PI3K/AKT/mTOR、Notch 和 MAPK 信号通路来抑制细胞增殖^[20]。对于小分子加药诱导细胞表型对内质网相关降解系统（ERAD）的依赖性可以通过内质网相关降解系统（ERAD）的相关阻断（如 p97/VCP 转膜通道抑制，内质网 E3 泛素连接酶敲除或沉默，泛素化修饰 RING 结构域删除或蛋白酶体抑制）来确认。

针对基于内质网相关降解系统（ERAD）的小分子靶向蛋白降解技术的一个潜在疑虑在于其是否可能导致内质网相关降解（ERAD）通路的干扰或阻断，影响细胞蛋白质质量控制系统的正常功能。这种可能性极低，这是因为与蛋白降解靶向嵌合体（PROTAC）类似^[21]，基于内质网相关降解系统

(ERAD)的小分子通过催化模式 (Catalytic manner) 发挥作用, 而不会抑制其募集的 E3 泛素连接酶 (如 CRBN, VHL 或 ER-E3) 的功能。这种催化模式也意味着对于拥有和靶蛋白结合亲和力在 nM 到 μM 级别的小分子配体, 靶蛋白的相应降解效能能够达到 sub-nM 到 nM 级别^[22]。

历史上, 通过降解剂研究 (尤其是分子胶) 鉴定 E3 泛素连接酶配体的策略为蛋白降解靶向嵌合体 (PROTACs) 的发展提供了重要启示。靶向 CRBN 的免疫调节药物 (IMiDs, 如沙利度胺衍生物) 便是极为成功的范例。然而, 这类方法在系统性发现新 E3 泛素连接酶配体方面存在局限性。本课题利用纯化的内质网 E3 泛素连接酶蛋白, 通过高通量化合物库对内质网 E3 泛素连接酶配体进行了筛选和优化, 揭示了其作为一种新型的蛋白质靶向降解方案的潜力, 验证了作为分子胶降解靶蛋白的选择性和可行性, 并提出了一种对配体小分子及其衍生物具有解释力的分子结构模型。这些结果拓宽了可被用于靶向降解技术 (TPD) 的 E3 连接酶库, 并为未来针对内质网 E3 泛素连接酶的开发提供参考与帮助。

参考文献

1. Zhao L, Zhao J, Zhong K, et al. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022,7(1):113.
2. Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022,21(3):181-200.
3. Nalawansa DA, Crews CM. PROTACs: An Emerging Therapeutic Modality in Precision Medicine[J]. *Cell Chem Biol*, 2020,27(8):998-1014.
4. Jevtić P, Haakonsen DL, Rapé M. An E3 ligase guide to the galaxy of small-molecule-induced protein degradation[J]. *Cell Chem Biol*, 2021,28(7):1000-1013.
5. Ahn G, Riley NM, Kamber RA, Wisnovsky S, et al. Elucidating the cellular determinants of targeted membrane protein degradation by lysosome-targeting chimeras[J]. *Science*, 2023,382(6668):eadf6249.
6. Wang K, Dai X, Yu A, et al. Peptide-based PROTAC degrader of FOXM1 suppresses cancer and decreases GLUT1 and PD-L1 expression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022,41(1):289.
7. Krshnan L, van de Weijer ML, Carvalho P. Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022,14(12):a041247.
8. Wu X, Rapoport TA. Mechanistic insights into ER-associated protein degradation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018,53:22-28.
9. Xia J, Xu M, Hu H, et al. 5,7,4'-Trimethoxyflavone triggers cancer cell PD-L1 ubiquitin-proteasome degradation and facilitates antitumor immunity by targeting HRD1[J]. *MedComm (2020)*, 2024,5(7):e611.
10. Liu Y, Bai J, Li D, et al. Routes to molecular glue degrader discovery[J]. *Trends Biochem Sci*. 2025,50(2):134-142.
11. Domostegui A, Nieto-Barrado L, Perez-Lopez C, et al. Chasing molecular glue degraders: screening approaches[J]. *Chem Soc Rev*, 2022,51(13):5498-5517.
12. Fischer ES, Böhm K, Lydeard JR, et al. Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide[J]. *Nature*, 2014,512(7512):49-53.
13. Li Z, Wang C, Wang Z, et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds[J]. *Nature*, 2019,575(7781):203-209.
14. Verreault M, Wepler SA, Stegeman A, et al. Combined RNAi-mediated suppression of Rictor and EGFR resulted in complete tumor regression in an orthotopic glioblastoma tumor model[J]. *PLoS One*, 2013,8(3):e59597.
15. Ronca R, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: An atypical target for innovative therapies in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2024,1879(4):189120.
16. Ueda M. Transthyretin: Its function and amyloid formation[J]. *Neurochem Int*. 2022,155:105313.
17. Schoebel S, Mi W, Stein A, Ovchinnikov S, Pavlovicz R, DiMaio F, Baker D, Chambers MG, Su H, Li D, Rapoport TA, Liao M. Cryo-EM structure of the protein-conducting ERAD channel Hrd1 in complex with Hrd3. *Nature*. 2017 Aug 17;548(7667):352-355.

18. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. Nature, 2021,596(7873):583-589.
19. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2010,31(2):455-61.
20. Raza W, Luqman S, Meena A. Prospects of tangeretin as a modulator of cancer targets/pathways[J]. Pharmacol Res, 2020,161:105202.
21. Bondeson DP, Mares A, Smith IE, et al. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs[J]. Nat Chem Biol, 2015,11(8):611-7.
22. Haid RTU, Reichel A. A Mechanistic Pharmacodynamic Modeling Framework for the Assessment and Optimization of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) [J]. Pharmaceutics, 2023,15(1):195.

致 谢

千万思绪，寥寥数语。

感谢我的老师鲁伯坝，曹志远师兄，郑惠文师姐。道阻且长，你们身化我科研路之启明星，踏足光所及处，我得以坚定的前行。亦感谢实验室数位同门。初入此门，你们的无私帮助，你们的慷慨包容，我无以言表，唯有铭记于心。

感谢我的几位室友，李启明，王玺硕，牙靖元，谭黄秋睿，肖垚，程文涛。也感谢我的荣誉室友，翁靖霆，缪其辛，杨佳乐。虽然你们务农，炼铁，砌瓦，溯原，或是高手（自封），亦或是皇族（自封），但我依然珍惜和你们一起度过的那些欢笑和流泪的日子。长日之疾，疗以良夜。你们点缀了我大学四年的诗与梦。

感谢我的朋友们，璃洛，叶叶，灰尘，夜雨，lc, fall, fish, 江湖，奇结，纸鹤，尼科，泠泠。春秋四转，我始终享受着游戏的最高配置。青山一道同云雨，明月何曾是两乡。纵离千山万水，友谊地久天长，在旅行的终点再会吧。

感谢我的同道，谈老师，万老师，赖老师。天物芸芸，各复其根。既已挤过悬壁，前路自是坦途。少年有志，志在四方，下次见面时，再和我讲讲你们的故事吧。

感谢我的榜样，AG，一诺，刻小姐，迪先生。心怀荣耀，勇往直前，只要坚信自己的道路，就无所谓天气是晴是雨。心有所向，日复一日，必有精进，时间会给出答案，敬请见证我的物语。

最后，感谢我的父母，我的妹妹，以及我可爱的家人们。你们的理解与支持，温暖了我的成长之路。谢谢！