药物靶标蛋白筛选的化学蛋白质组学研究进展

张晓磊, 张文博, 胡良海*

吉林大学生命科学学院, 长春 130012

* 联系人, E-mail: lianghaihu@jlu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-03; 接受日期: 2017-08-21; 网络版发表日期: 2017-11-21

国家自然科学基金(批准号: 21675061)和教育部新世纪优秀人才项目(批准号: NCET-12-0234)资助

摘要 药物或生物活性物质通过与靶蛋白结合而发挥功能, 研究表明, 大多数药物具有多个作用靶点, 药物靶标的发现有助于药物前体的筛选和作用机制的研究, 同时对其耐药性等副作用的解决方案提供理论指导. 基于生物质谱技术的蛋白质组学可对蛋白质进行高通量的定性定量分析, 为药物靶标的筛选提供了全新的平台. 本文综述了基于固载药物和游离药物模式的药物靶标蛋白筛选相关方法和应用研究的最新进展, 为基于生物质谱技术的化学蛋白质组学研究提供参考.

关键词 药物靶标, 化学蛋白质组学, 生物质谱

随着对药物及其靶蛋白相互作用机制的深入研究, 人们清晰地认识到药物与靶蛋白的相互作用并不局限为一种药物对应一个靶标^[1]. 大多数临床药物是通过药物直接结合一个或多个靶蛋白而发挥疗效, 这种结合通常位于靶蛋白的功能位点上起到激活或抑制作用. 目前已经发现的药物靶点有500个左右, 而约40%的药物是以G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)为靶点发现和设计的^[2]. 根据人类基因组的研究估计, 人体内可能的药物作用靶点蛋白约有5000~10000个, 更多的药物靶点有待于进一步的挖掘^[3]. 寻找新的药物靶点蛋白是药物研发中的重要环节, 新靶点的发现可为药物筛选提供突破口, 为先导化合物的发现和设计提供重要的理论依据.

近年来, 随着质谱软电离技术如电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解吸电离(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)和高分

辨质量分析器如飞行时间技术(time of flight, TOF)、轨道阱(orbitrap)和傅里叶变换离子回旋共振(Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR)的发展, 以生物质谱为核心的规模化蛋白质表达与修饰分析已经广为应用; 而稳定同位素标记技术如SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture), iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation)和TMT (tandem mass tags)等的发展, 为多个生物样品的蛋白质组定量分析提供了可能. 基于生物质谱技术的蛋白质组学在疾病标志物发现, 蛋白质翻译后修饰和相互作用研究等方面提供了重要的平台. 化学蛋白质组学是蛋白质组学的一个重要分支, 是一种整合了合成化学、细胞生物学和质谱等多门学科的方法^[4], 为药物靶蛋白特异性和亲和力物理结合特性的分析以及药物作用机制中靶蛋白的鉴定等提供了良好的平台. 化学蛋白质组学方法不局限于重组蛋白, 而是以整个蛋白质组为

引用格式: 张晓磊, 张文博, 胡良海. 药物靶标蛋白筛选的化学蛋白质组学研究进展. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 160–170
Zhang X L, Zhang W B, Hu L H. Recent advances of chemical proteomics for protein drug target screening (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 160–170, doi: [10.1360/N052017-00153](https://doi.org/10.1360/N052017-00153)

研究对象,可应用于任何类型的细胞、组织或其他物种^[5].而且,化学蛋白质组学方法广泛用于药物靶蛋白识别,并能够有效解决在传统方法研究中出现的非特异性结合问题^[6-8].在药物研发过程中,运用化学蛋白质组学技术识别药物靶蛋白具有低成本、高通量和高精确性的优点.本文着重介绍基于化学蛋白质组学的固载药物和游离药物模式识别和鉴定药物或生物活性物质相互作用靶蛋白的方法,其旨在通过阐述基于化学蛋白质组学发现药物作用靶标最新方法的进展,能够为药物靶蛋白的高通量筛选和作用方式以及药物的研发提供参考.

1 药物靶标的识别

细胞中蛋白质的生物功能常常与小分子的相互作用有着密不可分的关系,可作为底物、信号分子和变构调节物.在药物靶标不确定的情况下,仅通过表面分析很难发现药物的作用机制.另外,识别脱靶对于深入掌握药物副作用机制也是非常重要的.一些研究发现许多化合物比预期的更为复杂,一种药物不局限为只结合一种靶蛋白,可能存在两种或多个靶标,而一个基因也并不是对应一个靶标以及一种疾病^[9].药物的脱靶会使小分子结合到未知的靶蛋白,从而影响药效的发挥,这可能导致某些蛋白生物活性的改变,并且产生毒副作用^[10],但另一方面也可能揭示药物的其他医疗用途.实际上靶标和脱靶的识别和鉴定是新药研发过程中存在的重要瓶颈.药物靶标的识别为揭示药物作用机制提供关键的信息,为药物在以后的临床应用中更好地发挥疗效提供理论支持.

2 固载药物模式

为研究药物和蛋白的相互作用,通常会把药物通过连接臂和化学基团或基质进行连接,以便通过化学或生物的方法把相互作用的蛋白进行富集和质谱鉴定.目前广泛应用的方法主要包括基于活性的探针分析(activity-based probe profiling, ABPP)和亲和色谱(affinity chromatography).蛋白质微阵列(protein microarray)是另外一种通过固载模式识别和鉴定靶蛋白的方法,但有别于前两种方法,该方法可以将蛋白质固载到芯片上,然后用标记的药物进行特异性识别.

2.1 基于活性探针分析

由于蛋白质受转录后修饰、蛋白质与蛋白质或蛋白质与小分子相互作用的影响,相比蛋白表达水平,蛋白活性更能准确反映细胞生理或病理状态. ABPP方法能够评估复杂样品中的蛋白活性,该方法主要是利用靶向活性位点并能直接测定酶活力水平的化学探针分析天然生物样品中多种酶功能的一种化学蛋白质组学方法^[11].小分子探针的化学结构通常包含用于导向靶蛋白活性中心的活性基团、使探针与靶蛋白共价结合的反应基团、连接单元以及定量分析标记靶蛋白的功能基团(生物素基团、荧光基团和同位素基团)^[12].根据反应基团的不同,探针可分为基于共价和非共价作用的活性小分子探针,非共价作用的探针不能共价修饰靶蛋白,需要在紫外照射下能与靶蛋白共价结合的光反应基团. ABPP方法的一般流程是将设计的探针与细胞裂解液、活细胞或组织进行孵育,使小分子探针作用于其靶向的酶活性位点,探针会和酶反应形成复合物或通过光反应基团与靶蛋白在紫外光照下形成共价键^[1],然后通过探针的功能基团对已标记的蛋白进行富集和纯化,最后结合质谱等技术来鉴定捕获的靶蛋白. ABPP方法的关键是化学探针的设计,需要详细的结构活性信息以确保能够特异性结合靶向酶类的催化活性位点.

ABPP广泛用于药物或小分子靶蛋白的识别^[13],该方法能够直接评估感兴趣的酶活性^[14],特异性富集和表征靶蛋白^[15],在新药研发中是一种有力的工具.目前,利用ABPP方法广泛应用于一些重要的蛋白酶家族的研究,如丝氨酸水解酶^[16]、半胱氨酸蛋白酶^[17]、氧化还原酶^[18]、糖苷水解酶^[19]等. Xiao等人^[20]开发了一种同位素编码的ATP亲和探针(ICAP),将其应用于核酸结合蛋白的研究,将该探针作为酰化剂进行富集ATP结合蛋白同时将同位素掺入其中,最终发现了293个GO中未曾注释的与ATP结合蛋白,此外,还揭示了HSP90新的ATP结合位点K356. 靶蛋白Bruton酪氨酸激酶(bruton tyrosine kinase, BTK)是药物依罗替尼(ibrutinib)已知的作用靶标,用于治疗B细胞恶性肿瘤. Lanning等人^[21]设计特异性探针将炔基与小分子的苯环连接,通过炔基与叠氮化物修饰的罗丹明反应标记靶蛋白,结合SILAC技术不仅识别了Ibrutinib已知靶蛋白BTK,还发现了其他激酶,包括BLK, MAP2K7, TEC

和MLTK, 以及一些非激酶靶标, 研究发现以上这些蛋白质的共同特征是具有保守的活性位点或功能性半胱氨酸。

小分子可以作为研究蛋白质功能的重要工具, 但是大多数人类蛋白缺少小分子配体, 基于片段配体的发现能够鉴定复合化合物库高通量筛选难以靶向蛋白的分子探针, Backus等人^[22]对天然生物系统中靶向数百种人类蛋白质的半胱氨酸残基的亲电子片段进行化学蛋白质组学分析, 这些片段的共价相互作用促进靶蛋白的识别和鉴定。将光反应基团嵌入生物活性小分子可以促进细胞中蛋白质靶标的化学蛋白质组学分析^[23]。Parker等人^[24]利用含有与多数药物结构共用片段的光反应探针并结合定量化学蛋白质组学, 在人类细胞中识别了上千种与小分子相互作用的靶蛋白, 并确定了与片段相互作用蛋白的位点, 并进一步利用基于片段的化学方法和表型筛选识别了能够促进脂肪细胞分化的小分子。小分子文库的合成和筛选进展促进了化学探针的发展。

2.2 亲和色谱

亲和色谱是目前为止用于识别蛋白质与配体相互作用最为经典并广泛使用的一种方法。传统上的亲和层析是将感兴趣的药物或小分子通过官能团固定在固相基质上, 与细胞裂解液孵育后, 药物或小分子选择性纯化与之紧密结合的靶蛋白, 然后用缓冲液进行充分洗脱以去除非特异性结合蛋白, 利用变性剂或竞争性游离药物将靶蛋白洗脱下来, 然后用基于质谱的蛋白质组学技术鉴定靶标蛋白^[25,26]。另外, 亲和色谱的广泛使用主要得益于近年来质谱技术的快速发展。

基于亲和色谱的代表性研究是蛋白质激酶与其抑制剂的相互作用网络的构建^[27]。蛋白质激酶是哺乳动物中最大的酶家族, 在肿瘤学和炎症中代表一类重要的药物靶标^[28]。激酶抑制剂是近年来发展最为迅速的一类药物。近年来, 固定化激酶抑制剂的亲和介质(kinobeads)被开发并广泛应用于系列抑制剂和激酶的相互作用研究^[29-31]。Bantscheff等人^[27]以3种广谱性的激酶抑制(伊马替尼(imatinib)、达沙替尼(dasatinib)和博舒替尼(bosutinib)) Kinobeads为代表, 定量研究了200个靶向激酶和kinobeads的相互作用, 确认了已知的imatinib作用靶标ABL和SRC, 同时还鉴定出了两个新的靶点蛋白受体酪氨酸激酶DDR1和氧化还原酶

NQO2, 由于激酶的磷酸化与活性直接相关, 作者还进行了药物诱导引起的靶蛋白磷酸化分析^[27]。Becher等人^[32]采用Kinobeads在两个人类细胞系中确定200多个核苷酸辅因子ATP, ADP和GTP靶向激酶的亲和力, 并证实亲和力对抑制剂靶向蛋白选择性的影响, 核苷酸结合蛋白激酶对激酶药物研发过程中药物靶标的筛选提供了宝贵的信息资源。

尽管目前小分子亲和层析技术已被广泛应用于研究药物与蛋白的相互作用, 然而传统的亲和层析技术是将药物分子修饰在固相基质(如琼脂糖凝胶)上, 这就需要先进行蛋白提取然后才能进行后续的筛选, 因而不能反映活体细胞内药物与蛋白在生理条件下的相互作用情况。最近, Hu等人^[33]发展了一种水溶性纳米高分子材料的药物载体并将其用于活体细胞内药物靶标的筛选(图1A)。该方法通过把药物分子修饰到具有细胞穿透性的树状高分子(Dendrimer)上, 从而使得药物输运到细胞内部, 这对难于穿透细胞膜的强疏水性或电负性药物分子显得尤为重要。药物分子进入细胞之后会和其靶蛋白形成复合物, 同时由于Dendrimer上被修饰了羟基基团, 从而带有醛基的固相基质可以有效地捕集结合有靶蛋白的Dendrimer-药物聚合物, 最后通过凝胶电泳分离或原位酶解后用质谱对富集的蛋白进行鉴定。该方法以一种经典的抗癌药物氨甲喋呤(methotrexate, MTX)为模型, 以不同浓度的游离MTX作为竞争性结合剂用于评价该载体的MTX与已知作用靶标二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)的特异相互作用(图1B)。通过对富集的蛋白进行质谱分析, 成功地鉴定出DHFR和脱氧胞苷激酶(deoxycytidine kinase, dCK), 同时还鉴定出几种与MTX代谢相关的潜在靶标蛋白(图1C)。该方法突破了传统化学蛋白质组学只能进行体外药物靶标研究的局限性, 为活体细胞内药物靶标的原位识别和鉴定提供了一种通用的方法。

2.3 蛋白质微阵列

蛋白质微阵列技术能够研究药物或小分子与蛋白质的相互作用, 主要有蛋白质微阵列和小分子微阵列两种形式。根据其解决问题的不同可分为分析型微阵列和功能型微阵列, 前者主要研究所捕捉蛋白的功能特性, 蛋白质间的相互作用以及酶活性等; 后者使用蛋白质特异性结合配体如抗体和核酸来表征样品

图1 亲和色谱(网络版彩图)

A: 基于可溶性纳米聚合物鉴定药物靶标方法示意图^[33]; B: 游离MTX与固载药物的竞争结合; C: 基于SILAC定量蛋白质组学分析

中蛋白的表达水平,用于发现生物标志物和检测蛋白的活性状态等^[34,35]。

蛋白质微阵列是基于蛋白质固定的化学蛋白质组学识别药物靶蛋白的方法。蛋白质微阵列的分析小分子与数以千计蛋白质的相互作用提供了良好平台^[35]。在该方法中,首先将蛋白质或抗体固定在微型高密度的阵列中,标记小分子,使得它们在结合蛋白质微阵列时可以跟踪它们的物理存在和位置。用于蛋白质微阵列的标记包括亲和和标签(如生物素)、荧光标签、光化学标签和放射性同位素。蛋白质微阵列能够减少样品的消耗量,最重要的是能够在一个平台中高通量分析微阵列上整个蛋白质组的药物结合,揭示了所有结合的靶蛋白或脱靶蛋白^[36,37]。Hett等人^[37]使用氘标记的mRNA脱帽清除酶DcpS抑制剂二氨基喹唑啉和9000个由N末端谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)融合蛋白组成的人类蛋白质微阵列以鉴定抑制剂的选择性结合,证实了二氨基喹唑啉抑制剂的精确

选择性,并强调了蛋白质微阵列技术为药物靶点识别和新药研发提供有力的工具。相反,固定的小分子微阵列可用于结合感兴趣的蛋白。衍生化的小分子偶联到芯片表面,然后高通量筛选与固定化合物相互作用的靶蛋白。Koster等人^[38]通过利用微阵列结合质谱技术鉴定磺胺类药物的预期靶蛋白,证实了这种方法在药物靶点筛选研究中的有效性。

但是,蛋白质微阵列的不足是需要小分子标记,并且这部分标记不会消除其本身化合物的生物活性。相反,小分子非标记就会避免结合特性和活性的改变,从而促使一些非标记的方法广泛应用,该方法能够有效测定小分子药物与蛋白间的相互作用,主要包括荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)和表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)^[39]。随着质谱技术的快速发展以及在蛋白质组学中的重要作用,利用质谱并结合微阵列技术也是克服小分子标记的一种方法^[7]。

3 游离药物模式

虽然固定化药物的方法已经完善并广泛应用,但是这种方法仍然存在技术的局限性. 结合蛋白质的分离需要小分子附着在固体基质上或是检测标签上,并且候选靶标的分离依赖于亲和力,小分子的特异性化学修饰会导致亲和力以及分子特异性的改变. 另外一个比较常见的问题是配体的非特异性结合,造成假阳性结果.

然而,随着药物靶标识别技术的不断发展,在游离药物与靶蛋白结合的基础上,通过运用基于能量的热力学来分析蛋白质与配体相互作用的方法应运而生. 基于能量的靶蛋白识别方法是利用蛋白质与配体结合所产生结构稳定性的变化,这种方法不需要任何小分子的标签或固定,有别于传统的基于亲和捕捉方法. 用于评估蛋白质与配体的热力学稳定性技术通常基于量热或光谱方法,但这类方法的主要缺点是需要高度纯化的蛋白. 而纯化蛋白稳定性(SUPREX)^[40]、组氨酸H/D交换(slow histidine H/D exchange)^[41]、赖氨酸酰胺化(lysine amidination)^[42]和定量半胱氨酸反应(QCR)^[43]相比量热和光谱法能够降低蛋白质的复杂性. 但是,由于以上几种方法在识别药物靶蛋白方面具有一定的局限性,所以促使药物靶标筛选方法不断地发展和更新. 近年来,广泛应用的药物靶蛋白识别技术主要包括脉冲蛋白水解(pulse proteolysis)^[44,45]、氧化速率蛋白稳定性(stability of proteins from rates of oxidation, SPROX)^[46,47]和蛋白质热稳定性分析(cellular thermal shift assay, CETSA)^[31,48,49]. 下文主要对这几种基于能量识别药物靶蛋白的方法进行阐述.

3.1 脉冲蛋白水解

脉冲蛋白水解主要是基于折叠蛋白(药物结合蛋白)和未折叠蛋白水解速率的不同,捕捉折叠蛋白和未折叠蛋白构象的变化. 药物结合蛋白质时呈现折叠状态,肽键不受蛋白酶消化的影响,蛋白质的热稳定性有所升高,并且其解折叠速率有所下降^[45]. 当药物未结合蛋白质时呈现未折叠状态,暴露的多肽就会被快速地消化^[44,50].

脉冲蛋白水解的一般流程(图2A)是在配体存在或缺失的条件下,将蛋白样品用含有不同浓度变性剂的缓冲液孵育,然后加入蛋白水解酶如嗜热菌蛋白酶用

以非特异性消化未折叠蛋白的多肽链. 水解作用猝灭后,运用凝胶分离或生物质谱等技术对样品中药物或小分子结合的靶蛋白进行分析. 脉冲蛋白水解的主要优点是不需要小分子的修饰,消除了小分子在结合上的负面影响,能够识别包括底物、信号分子、抑制剂和药物等配体和蛋白质的相互作用^[44]. 而且,这种方法成本较低,在蛋白质工程和药物领域具有重要的前景.

该方法也成功与2D-PAGE^[44]、免疫印迹法^[50]、生物质谱^[44]、SILAC技术^[8]以及结构生物信息学方法^[51]进行结合测定配体结合蛋白质的热力学稳定性. Liu等人^[44]通过利用脉冲蛋白水解探索尿素诱导的细胞裂解物中蛋白质的解折叠,通过2D凝胶电泳,发现含有配体和对照组的两种凝胶之间具有不同强度的斑点(图2B). 然后对差异显著的斑点进行胶内消化,最后基于质谱技术成功地鉴定了大肠杆菌蛋白质组中与ATP相互作用的蛋白质. Chang等人^[45]运用脉冲蛋白水解结合SDS-PAGE及质谱分析鉴定了多种之前没有报道的ATP结合蛋白. 此外,可以将脉冲蛋白水解和沉淀技术以及定量蛋白质组学技术进行结合用于靶蛋白的识别(PePTID)^[45],该方法消除了样品蛋白水解前需要分离的步骤并降低了样品的复杂性. 脉冲蛋白水解也可以用于评估亲脂性药物诱导的肠内脂肪酸结合蛋白稳定性的变化^[52].

3.2 基于氧化速率的蛋白质热稳定

SPROX是基于能量分析的另一种方法,这种方法主要是利用H₂O₂介导的蛋白质中甲硫氨酸残基的氧化速率分析蛋白质折叠或展开反应的热力学性质^[46]. 这种方法能够在蛋白质组规模上分析与药物相互作用的多个靶蛋白,并且能够对配体结合蛋白的亲和力进行定量^[53]. SPROX需要对蛋白质复杂样品中含有甲硫氨酸的肽段进行定量,天然蛋白质序列中甲硫氨酸残基的含量相对较低,大约为2%^[54],但是大多数蛋白或蛋白结构域至少存在一个甲硫氨酸,甲硫氨酸残基的氧化映射了整个或亚细胞中蛋白的热稳定性变化. 鉴定药物与靶蛋白的结合是通过转换中点的偏移确定的,也就是在配体存在或缺失的条件下,对含有甲硫氨酸氧化和非氧化形式的肽段的丰度进行定量,以化学变性剂的系列不同浓度作为指标比较两种形式转换中点的偏移. 理论上,含有相同甲硫氨酸残基的转换中点相似. 转换中点偏移到高浓度或低浓度变性

图 2 脉冲蛋白水解

A: 基于能量的脉冲蛋白水解靶标识识别示意图^[44]; B: 含有ATP和空白对照*Escherichia coli*裂解液脉冲水解后的2D凝胶电泳图谱

剂分别表示药物引起的蛋白稳定或不稳定。相比于非氧化肽段, 氧化肽段的转换中点通常在较低的浓度^[55]。

SPROX方法的一般流程(图3)是在配体存在或缺失条件下, 将蛋白质裂解液加入含有系列不同浓度变性剂的缓冲液中进行孵育, 使蛋白达到展开/重折叠平衡, 然后向蛋白质样品中加入 H_2O_2 以开始甲硫氨酸残基的氧化。为了使得蛋白质中的甲硫氨酸残基能够被选择性地氧化成为亚砷, H_2O_2 的反应浓度和反应时间需要作出特定的调整。反应完成后, 用过量的甲硫氨酸或过氧化氢酶对氧化反应进行淬灭^[53]。然后利用基于质谱的化学蛋白质组学对氧化和未氧化含有甲硫氨酸的肽段进行定量, 最后通过化学变性曲线转换中点的偏移确定潜在的靶蛋白。关于SPROX的第一篇文献分析了4种蛋白质模型, 包括泛素、核糖核酸酶A、牛碳酸酐酶 II (bovine carbonic anhydrase II, BCA II) 和亲环素(cyclophilin A, CypA), 基于MALDI-TOF质谱测定的数据用于计算蛋白的折叠自由能 ΔG_f 和 m 值, 得到的热力学参数与光谱学验证结果具有一致性^[55]。有

文献报道利用温度取代了含有变性剂的缓冲液分析未折叠的蛋白。West等人^[6]利用热力学SPROX方法对蛋白质混合物运用MALDI-TOF-MS和LC-MS两种质谱检测方式均鉴定了免疫抑制剂CsA与靶蛋白CypA的相互作用, 证实了热力学SPROX方法能够识别药物与靶蛋白的相互作用。但是, 这种方法存在的问题是样品中的一些蛋白质热变性后容易形成沉淀聚集。

SPROX方法主要的优点是能够通过转移中点的转移幅度进行定量分析。虽然这种方法对测定热稳定的准确性有所限制, 但是在氧化不破坏靶蛋白特性的前提下能够对配体和蛋白的相互作用进行定量分析^[46], 为药物靶蛋白的识别开辟了一条新的途径。Jin等人^[47]使用苯甲酰甲基溴(phenacyl bromide, PAB)对SPROX中含甲硫氨酸的肽进行靶向检测和定量, 在三重四级杆质谱仪上使用选择性反应监测(selective reaction monitoring, SRM), 通过对酵母裂解液中CsA和靶蛋白CypA相互结合的验证, 证实了这种方法的可行性, 并且该方法显著提高了目标蛋白检测的灵敏度。

图3 SPROX靶标蛋白筛选流程示意图^[53](网络版彩图)

Xu等人^[56]运用SPROX结合基于质谱技术对具有良好抗肿瘤作用的天然产物格尔德霉素与已知靶蛋白的热休克蛋白90 (heat shock protein 90, Hsp90)的亲和力进行了研究, 格尔德霉素平衡0.5和2 h时对应的 K_d 值分别为1和0.03 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 证实了 K_d 值取决于SPROX分析前格尔德霉素的平衡时间. Dearmond等人^[57]还将SPROX用于研究中药活性成分白藜芦醇的蛋白靶标, 发现除已知靶蛋白胞质醛脱氢酶之外的另外6个潜在的靶蛋白.

3.3 蛋白质热稳定性分析

利用配体结合蛋白热稳定性识别靶标也是基于能量的一种方法. 2013年, Martinez等人^[49]发表了第一篇有关CETSA方法的文献, 该方法可广泛应用于裂解液、细胞和组织中靶标研究. CETSA方法是基于配体结合蛋白后会产生一种相对于游离蛋白热力学稳定性增加的复合物, 这是由于蛋白质和配体之间形成的疏水、氢键或静电相互作用而引起的负自由能变化, 从而导致更稳定的热力学状态^[58].

CETSA方法的操作过程是首先将药物与细胞裂解液或活细胞进行孵育, 然后分别进行梯度加热. 经过加热后, 孵育体系中仍保持折叠状态的配体结合蛋白质相对稳定, 而没有结合配体的蛋白质会解折叠, 从而迅速变性产生沉淀. 然后, 可溶性蛋白可以通过

离心或过滤从沉淀蛋白中分离出来并进行定量, 孵育体系中可溶性蛋白量也就是仍保持折叠状态的蛋白量, 进而对可溶性蛋白部分进行热稳定性分析. 检测稳定结合蛋白的方法通常采取Western Blot以及基于质谱技术^[59], 通过拟合溶解曲线计算蛋白的溶解温度(T_m)(图4). T_m 值的变化间接反映蛋白质热稳定性的变化, 从而在细胞内追踪药物的作用.

CETSA能够直接测定活细胞内配体靶蛋白参与情况, 对配体结合蛋白和其他蛋白进行差异分析, 为确定药物靶标提供了客观有效的方法. 有研究表明, 在活细胞和裂解液中一些激酶抑制剂的药物结合情况明显不同^[60], 比较加药后细胞裂解液与完整细胞热转移的差异可以间接反映细胞对药物的可利用性, 并且能够分析化学修饰的小分子或药物亲和力的变化以及进入细胞到达靶蛋白的能力. Tan等人^[61]利用了CETSA比较完整细胞和裂解液中模拟抑癌基因P53 N端区域的stapled peptides与Mdm2/Mdm4结合后热转移的变化, 发现在裂解液中热转移程度比较显著, 表明了stapled peptides进入细胞的有效性偏低, 从而可以通过化学修饰等手段提高药物的可利用性. 总之, CETSA为药物设计与优化提供了有价值的方法.

细胞或组织中的蛋白结合配体后, 其活性的调节导致了相应的细胞生理应答. 药物的有效性很大程度上取决于相应靶蛋白的参与程度, 并且药物和其他蛋白质的脱靶结合会产生一定的副作用. 所以, 识别脱靶蛋白对于深入掌握药物副作用的机制也是非常重要的. Savitski等人^[31]通过运用CETSA发现了血红素生物合成酶铁螯合酶(ferrochelatase, FECH)与BRAF抑制剂vemurafenib和ALK抑制剂alectinib的相互作用. FECH缺陷与原卟啉症有关, 会导致严重的光敏性和肝损伤, 表明了由vemurafenib和其他药物诱导的光敏性是由FECH介导的, 揭示了该抑制剂潜在的脱靶作用, 为深入了解脱靶引起的毒副作用和药理作用提供了重要的信息, 并促进了药物有效性和毒副作用标记物的识别.

CETSA不仅能应用于活细胞或细胞裂解液, 也能应用于动物组织, 为药代动力学和动物体内吸收分布代谢分泌(absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME)的研究提供了一种新的手段. TNP-470是抗血管生成药物, 目前在临床开发中用于治疗实体瘤, TNP-470靶向蛋白酶甲硫氨酸氨基肽酶2 (METAP2)^[62].

图 4 基于热稳定分析的CETSA靶蛋白识别示意图^[31](网络版彩图)

对TNP-470处理的小鼠(*Mus musculus*)肝组织进行热稳定性测定, METAP2呈现显著的药物诱导热转移. 小鼠肝脏和肾脏组织的等温剂量反应(ITDRF_{CETSA})测定也揭示了靶标的参与和药物的分布^[63]. CETSA能够有效地应用到动物组织中, 为研究靶标的参与及临床药物的发展提供重要工具.

综上所述, CETSA能够验证重要临床靶蛋白的药物结合, 监测细胞药物转运活化、药物的可利用性、脱靶作用以及药物在组织中的分布, 此外, 结合基于质谱的蛋白质组学技术, 该方法也可用于生物标志物的发现^[64]. CETSA在验证和优化药物靶蛋白参与方面有可能成为一种很有价值的工具.

4 展望

研究药物或小分子与靶蛋白的相互作用不仅能够挖掘潜在的药物靶标, 同时也能加深对药物副作用或

机制的了解. 由于药物的治疗效果依赖于与同源靶标的结合, 研发能够识别靶蛋白的各种工具始终是一项具有挑战性的工作. 化学蛋白质组学方法的优点主要是能够富集结合能力比较弱或丰度较低的蛋白、消除多数非特异性结合以及筛选出具有较高可能性的候选靶标. 基于游离药物模式的化学蛋白质组学在药物靶标识别和药物作用机制研究中具有很好的应用前景, 包括细胞信号传导途径以及药物在其途径中发挥的作用. 而且, 化学蛋白质组学方法与高通量、高灵敏度质谱技术的结合促进了药物靶标识别的进程. 本文中所阐述的几种不同方法的结合和验证可能会更好地呈现出蛋白质与药物系统性相互作用的视图. 然而, 为了更好地探测药物靶标、深入了解药物的作用机制及脱靶效应, 最大限度地减少临床试验的时间和成本并提高新药的成功率, 高灵敏度、低成本、具有普遍适用性的高通量筛选方法仍然是迫切需要的.

参考文献

- 1 Rix U, Superti-Furga G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 616–624
- 2 Stevens R C, Cherezov V, Katritch V, et al. The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 12: 25–34
- 3 Pillai O, Dhanikula A B, Panchagnula R. Drug delivery: an odyssey of 100 years. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 439–446
- 4 Bantscheff M, Scholten A, Heck A J R. Revealing promiscuous drug-target interactions by chemical proteomics. *Drug Discov Today*, 2009, 14: 1021–1029
- 5 Humphrey S J, James D E, Mann M. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*,

- 2015, 26: 676–687
- 6 West G M, Thompson J W, Soderblom E J, et al. Mass spectrometry-based thermal shift assay for protein-ligand binding analysis. *Anal Chem*, 2010, 82: 5573–5581
- 7 Zhou Y, Liu Z, Rothschild K J, et al. Proteome-wide drug screening using mass spectrometric imaging of bead-arrays. *Sci Rep*, 2016, 6: 26125
- 8 Adhikari J, Fitzgerald M C. SILAC-pulse proteolysis: a mass spectrometry-based method for discovery and cross-validation in proteome-wide studies of ligand binding. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2014, 25: 2073–2083
- 9 Curran M E, Splawski I, Timothy K W, et al. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*, 1995, 80: 795–803
- 10 Tsai S Q, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided *Fok I* nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 569–576
- 11 Evans M J, Cravatt B F. Mechanism-based profiling of enzyme families. *Chem Rev*, 2006, 106: 3279–3301
- 12 Sadler N C, Wright A T. Activity-based protein profiling of microbes. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 24: 139–144
- 13 Pichler C M, Krysiak J, Breinbauer R. Target identification of covalently binding drugs by activity-based protein profiling (ABPP). *Bioorg Med Chem*, 2016, 24: 3291–3303
- 14 Wright A T, Cravatt B F. Chemical proteomic probes for profiling cytochrome P450 activities and drug interactions *in vivo*. *Chem Biol*, 2007, 14: 1043–1051
- 15 Dey K K, Mandal M. Abstract 38: quantitative proteomic approaches to identify biomarkers for oral cancer & targeting S100A7 by RNA-mediated interference through NF kappa beta-mediated pathway. *Cancer Res*, 2014, 74: 38–38
- 16 Ortega C, Anderson L N, Frando A, et al. Systematic survey of serine hydrolase activity in mycobacterium tuberculosis defines changes associated with persistence. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 290–298
- 17 Edgington L E, Verdoes M, Ortega A, et al. Functional imaging of legumain in cancer using a new quenched activity-based probe. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 174–182
- 18 Camara K, Kamat S S, Lasota C C, et al. Combining cross-metathesis and activity-based protein profiling: new β -lactone motifs for targeting serine hydrolases. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 317–321
- 19 Stubbs K A. Activity-based proteomics probes for carbohydrate-processing enzymes: current trends and future outlook. *Carbohydr Res*, 2014, 390: 9–19
- 20 Xiao Y, Guo L, Wang Y. Isotope-coded ATP probe for quantitative affinity profiling of ATP-binding proteins. *Anal Chem*, 2013, 85: 7478–7486
- 21 Lanning B R, Whitby L R, Dix M M, et al. A road map to evaluate the proteome-wide selectivity of covalent kinase inhibitors. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 760–767
- 22 Backus K M, Correia B E, Lum K M, et al. Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems. *Nature*, 2016, 534: 570–574
- 23 Niphakis M J, Lum K M, Cognetta Iii A B, et al. A global map of lipid-binding proteins and their ligandability in cells. *Cell*, 2015, 161: 1668–1680
- 24 Parker C G, Galmozzi A, Wang Y, et al. Ligand and target discovery by fragment-based screening in human cells. *Cell*, 2017, 168: 527–541.e29
- 25 Wang J, Gao L, Lee Y M, et al. Target identification of natural and traditional medicines with quantitative chemical proteomics approaches. *Pharmacol Therapeut*, 2016, 162: 10–22
- 26 Ziegler S, Pries V, Hedberg C, et al. Target identification for small bioactive molecules: finding the needle in the haystack. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 2744–2792
- 27 Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, et al. Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1035–1044
- 28 Hallberg B, Palmer R H. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 685–700
- 29 Werner T, Becher I, Sweetman G, et al. High-resolution enabled TMT 8-plexing. *Anal Chem*, 2012, 84: 7188–7194
- 30 Urbaniak M D, Mathieson T, Bantscheff M, et al. Chemical proteomic analysis reveals the drugability of the kinome of *Trypanosoma brucei*. *ACS Chem Biol*, 2012, 7: 1858–1865
- 31 Savitski M M, Reinhard F B M, Franken H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science*, 2014, 346: 1255784–1255784
- 32 Becher I, Savitski M M, Savitski M F, et al. Affinity profiling of the cellular kinome for the nucleotide cofactors ATP, ADP, and GTP. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 599–607
- 33 Hu L, Iliuk A, Galan J, et al. Identification of drug targets *in vitro* and in living cells by soluble-nanopolymer-based proteomics. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 4133–4136
- 34 Janzi M, Odling J, Pan-Hammarström Q, et al. Serum microarrays for large scale screening of protein levels. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4:

1942–1947

- 35 Romanov V, Davidoff S N, Miles A R, et al. A critical comparison of protein microarray fabrication technologies. *Analyst*, 2014, 139: 1303–1326
- 36 Aguilar-Mahecha A, Hassan S, Ferrario C, et al. Microarrays as validation strategies in clinical samples: tissue and protein microarrays. *OMICS*, 2006, 10: 311–326
- 37 Hett E C, Kyne Jr. R E, Gopalsamy A, et al. Selectivity determination of a small molecule chemical probe using protein microarray and affinity capture techniques. *ACS Comb Sci*, 2016, 18: 611–615
- 38 Koster H, D P Little, P Luan, et al. Capture compound mass spectrometry: a technology for the investigation of small molecule protein interactions. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, 5: 381–390
- 39 Mason J L, Spais C, Husten J, et al. Comparison of lanthascreen EU kinase binding assay and surface plasmon resonance method in elucidating the binding kinetics of focal adhesion kinase inhibitors. *ASSAY Drug Dev Technol*, 2012, 10: 468–475
- 40 Huang R Y C, Chen G. Higher order structure characterization of protein therapeutics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 6541–6558
- 41 Tran D T, Banerjee S, Alayash A I, et al. Slow histidine H/D exchange protocol for thermodynamic analysis of protein folding and stability using mass spectrometry. *Anal Chem*, 2012, 84: 1653–1660
- 42 Xu Y, Falk I N, Hallen M A, et al. Mass spectrometry- and lysine amidation-based protocol for thermodynamic analysis of protein folding and ligand binding interactions. *Anal Chem*, 2011, 83: 3555–3562
- 43 Isom D G, Vardy E, Oas T G, et al. Picomole-scale characterization of protein stability and function by quantitative cysteine reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 4908–4913
- 44 Liu P F, Kihara D, Park C. Energetics-based discovery of protein-ligand interactions on a proteomic scale. *J Mol Biol*, 2011, 408: 147–162
- 45 Chang Y, Schleich J P, VerHeul R A, et al. Simplified proteomics approach to discover protein-ligand interactions. *Protein Sci*, 2012, 21: 1280–1287
- 46 Strickland E C, Geer M A, Tran D T, et al. Thermodynamic analysis of protein-ligand binding interactions in complex biological mixtures using the stability of proteins from rates of oxidation. *Nat Protoc*, 2012, 8: 148–161
- 47 Jin L, Wang D, Gooden D M, et al. Targeted mass spectrometry-based approach for protein-ligand binding analyses in complex biological mixtures using a phenacyl bromide modification strategy. *Anal Chem*, 2016, 88: 10987–10993
- 48 Martinez Molina D, Nordlund P. The cellular thermal shift assay: a novel biophysical assay for in situ drug target engagement and mechanistic biomarker studies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56: 141–161
- 49 Martinez Molina D, Jafari R, Ignatushchenko M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*, 2013, 341: 84–87
- 50 Park C, Marqusee S. Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nat Meth*, 2005, 2: 207–212
- 51 Zeng L, Shin W H, Zhu X, et al. Discovery of nicotinamide adenine dinucleotide binding proteins in the *Escherichia coli* proteome using a combined energetic- and structural-bioinformatics-based approach. *J Proteome Res*, 2017, 16: 470–480
- 52 Velkov T. Thermodynamics of lipophilic drug binding to intestinal fatty acid binding protein and permeation across membranes. *Mol Pharm*, 2009, 6: 557–570
- 53 West G M, Tucker C L, Xu T, et al. Quantitative proteomics approach for identifying protein-drug interactions in complex mixtures using protein stability measurements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 9078–9082
- 54 Baud F, Karlin S. Measures of residue density in protein structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 12494–12499
- 55 West G M, Tang L, Fitzgerald M C. Thermodynamic analysis of protein stability and ligand binding using a chemical modification- and mass spectrometry-based strategy. *Anal Chem*, 2008, 80: 4175–4185
- 56 Xu Y, Wallace M A G, Fitzgerald M C. Thermodynamic analysis of the geldanamycin-Hsp90 interaction in a whole cell lysate using a mass spectrometry-based proteomics approach. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, 27: 1670–1676
- 57 Dearmond P D, Xu Y, Strickland E C, et al. Thermodynamic analysis of protein-ligand interactions in complex biological mixtures using a shotgun proteomics approach. *J Proteome Res*, 2011, 10: 4948–4958
- 58 Lomenick B, Olsen R W, Huang J. Identification of direct protein targets of small molecules. *ACS Chem Biol*, 2011, 6: 34–46
- 59 Branca R M M, Orre L M, Johansson H J, et al. HiRIEF LC-MS enables deep proteome coverage and unbiased proteogenomics. *Nat Meth*, 2013, 11: 59–62
- 60 Salisbury C M, Cravatt B F. Activity-based probes for proteomic profiling of histone deacetylase complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 1171–1176

- 61 Tan B X, Brown C J, Ferrer F J, et al. Assessing the efficacy of Mdm2/Mdm4-inhibiting stapled peptides using cellular thermal shift assays. *Sci Rep*, 2015, 5: 12116
- 62 Yin S Q, Wang J J, Zhang C M, et al. The development of MetAP-2 inhibitors in cancer treatment. *Curr Med Chem*, 2012, 19: 1021–1035
- 63 Jafari R, Almqvist H, Axelsson H, et al. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nat Protoc*, 2014, 9: 2100–2122
- 64 Lambert J P, Iovsev G, Couzens A L, et al. Mapping differential interactomes by affinity purification coupled with data-independent mass spectrometry acquisition. *Nat Meth*, 2013, 10: 1239–1245

Recent advances of chemical proteomics for protein drug target screening

ZHANG XiaoLei, ZHANG WenBo & HU LiangHai

School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China

Proteins play a key role through binding with drugs or bioactive compounds. Previous reports showed that drugs have multiple targets, and identification of drug targets contributes to the discovery of drug precursors and the mechanism of action, as well as provides theoretical guidance on elimination of side effects such as drug resistance. The development of biological mass spectrometry-based proteomics can conduct high-throughput qualitative and quantitative analysis of proteins and provide a new platform for drug targets screening. The present review summarized the recent progress of approaches and applications of immobilized and free drug-based modes for the targeted proteins recognition and identification, which will provide reference for biological mass spectrometry-based chemical proteomic study.

drug targets, chemical proteomics, biological mass spectrometry

doi: [10.1360/N052017-00153](https://doi.org/10.1360/N052017-00153)