

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и энергетики
(наименование института полностью)

Центр медицинской химии
(наименование)

04.03.01 Химия
(код и наименование направления подготовки)

Медицинская и фармацевтическая химия
(направленность (профиль))

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Анализ теплового сдвига для открытия новых ингибиторов карбоангидразы IX

Обучающийся

Г.Г. Оганисян

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

доцент ЦМХ, А. С. Бунев

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Консультант

Р.Э. Гасанов

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Тольятти 2023

Аннотация

Выпускная квалификационная работа состоит из 57 страниц, содержит 6 таблиц, 15 рисунков, 3 схемы. Список литературы включает в себя 71 источник.

Цель выпускной квалификационной работы заключается в апробации тест-системы с применением проточной цитометрии для поиска ингибиторов карбоангидразы IX. Тест-система основана на биофизическом методе – анализе клеточного теплового сдвига (CETSA), который позволяет оценить связывание соединений с нативным белком-мишенью в физиологической среде.

Объектом исследования в представленной работе является структурно разнообразный набор соединений из ряда первичных сульфонамидов на основе азолов.

В литературном обзоре подробно изложена информация о роли IX изоформы карбоангидраз в условиях гипоксии, также было уделено внимание ингибиторам CA, разработанным за последние 10 лет.

В экспериментальной части описаны методики получения клональных клеточных линий, анализа теплового сдвига и биологических испытаний производных первичных сульфонамидов.

На основе проведенных экспериментов получена серия профилей термической денатурации белка CAIX в присутствии исследуемых лигандов. Выявлена необходимость в доработке тест-системы, с включением значительно расширенной выборки соединений для установления закономерности на более глубоком уровне и оценки применимости данного метода.

Abstract

The title of the graduation work is Thermal shift analysis to discover carbonic anhydrase IX inhibitors.

The graduation work consists of an explanatory note, an introduction, three parts on 56 pages, 15 figures, the list of 71 references including foreign sources.

The key issue of the thesis is the search for inhibitors of carbonic anhydrase IX, which is a promising therapeutic target in anticancer therapy.

The aim of this work is to approbate a test system using flow cytometry to evaluate carbonic anhydrase IX inhibitors.

The graduation work may be divided into several logically connected parts which are: obtain a transfected cell line expressing CAIX-GFP; optimize conditions for cellular thermal shift assay (CETSA); perform cell thermal shift assay on HEK293 stable cell line expressing CAIX-GFP; investigate possible correlations of the fluorescence signal with the inhibitory ability of the compound library.

Finally, we present all the experimental information about CETSA, which can monitor a change in protein thermal stability upon ligand binding in intact cells.

In conclusion, we emphasize that the studied compounds, according to the results of CETSA, exhibit a destabilizing effect in most cases. The need to refine the test system was established, with the inclusion of a significantly expanded sample of compounds to establish patterns at a deeper level.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	5
Введение.....	6
1 Литературный обзор	8
1.1 Общая характеристика карбоангидраз IX и XII	8
1.2 Экспрессия и функция карбоангидраз в опухолевых клетках	10
1.2.1 Связь САIX с гипоксией и ацидозом	11
1.2.2 САXII: распространение и роль в онкогенезе	14
1.3 Ингибиторы карбоангидразы IX	15
1.4 Анализ термического сдвига	23
1.5 Метод проточной цитометрии	28
2 Результаты и их обсуждение.....	35
2.1 Определение температуры плавления белка интереса	36
2.2 Оптимизация условий и скрининг лигандов.....	37
3 Экспериментальная часть.....	43
3.1 Объект исследования	43
3.2 Оборудование и материалы	45
3.4 Методика эксперимента	46
3.4.1 Получение клональных клеточных линий	46
3.4.2 Анализ клеточного теплового сдвига	47
3.4.3 МТТ-тест.....	47
Заключение	48
Список используемой литературы	49
Приложение А Результаты оптимизации CETSA.....	56

Определения, обозначения и сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

CAI	ингибиторы карбоангидраз
SETSA	анализ клеточного термического сдвига
FP	флуоресцентный белок
hCA	карбоангидраза человека
HIF	индуцируемый гипоксией фактор
HRE	чувствительная к гипоксии единица
K_i	константа ингибирования
MCT	монокарбоксилатный транспортер
MDA-MB-231	тройная негативная аденокарцинома молочной железы человека
NBC	котранспортер бикарбоната натрия
PC-3	клеточная линия рака простаты
PHD	пролилгидроксилаза
pH_e	внеклеточный pH
pH_i	внутриклеточный pH
PG	протеогликан-подобный домен
POI	белок интереса
RCC	почечно-клеточная карцинома
SLG	липкая липофильная группа
TM	трансмембранный домен
TSA	анализ термического сдвига
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов
VHL	белок фон Хиппеля-Линдау
ZBG	цинксвязывающая группа

Введение

В настоящее время особое внимание уделяется поиску и разработке малых молекул, способных моделировать функцию белка, с целью исследования биологических процессов и применения в качестве терапевтических средств. Большинство стратегий изучения белок-лигандного взаимодействия трудоемки, малопродуктивны или не предоставляют доказательств связывания лиганда с мишенью в клеточной среде [1]. Биохимические методы, основанные на тепловом сдвиге, такие как дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF), определяет лиганд-индуцированные тепловые сдвиги с использованием рекомбинантного белка с гидрофобными красителями [33,34], однако данный подход не учитывает сложности, обнаруживаемые в клетках, включая мембранные барьеры и возможность нецелевого связывания.

В 2013 году Martinez Molina и соавторы представили запатентованный анализ клеточного теплового сдвига (CETSA) для количественной оценки взаимодействия с мишенью в клетках путем изучения влияния связывания соединения на термостабильность белков. Поскольку ни соединение, ни белок не модифицируются, CETSA обеспечивает надежное измерение взаимодействия с мишенью в физиологических условиях [42]. Биологически значимые данные о воздействии на мишень могут быть получены из любого типа клеточных матриц, таких как клеточные линии, ткани животных и образцы пациентов, что делает метод применимым на всех этапах процесса открытия и разработки лекарств.

Карбоангидраза IX (CAIX) считается подходящей мишенью для различных противоопухолевых стратегий, потенциал этого фермента как важного класса биологических объектов для химиотерапевтического вмешательства была признана несколько десятилетий назад [3,5]. Это белок клеточной поверхности, который экспрессируется в гипоксических солидных опухолях человека, где играет ключевую роль в регуляции микроокружения,

тем самым способствуя выживанию, пролиферации, метастазированию и развитию лекарственной устойчивости опухолевых клеток [4]. Поэтому поиск ингибиторов CAIX может послужить перспективным терапевтическим подходом в противораковой терапии.

Цель работы: апробация тест-системы с применением проточной цитометрии для оценки ингибиторов карбоангидразы IX.

Задачи работы:

1. Получить трансфицированную клеточную линию, экспрессирующую экспрессирующую CAIX-GFP;
2. Оптимизировать условия анализа клеточного теплового сдвига;
3. Провести анализ клеточного теплового сдвига на клеточной линии HEK293, стабильно экспрессирующей CAIX-GFP
4. Исследовать возможные корреляции сигнала флуоресценции с ингибирующей способностью библиотеки соединений.

1 Литературный обзор

1.1 Общая характеристика карбоангидраз IX и XII

Карбоангидразы (CAs, EC 4.2.1.1) – повсеместно распространенные металлоферменты с семью различными генетическими семействами известными на данный момент: α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, и вероятность обнаружения других семейств достаточно высока, и это связано с тем, что рассматриваемые ферменты катализируют простую, но важную химическую реакцию взаимного превращения углекислого газа и воды с образованием бикарбоната и протонов: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. В тканях/организмах СА участвуют в регуляции pH (строго контролируемый процесс во всех живых организмах) и в метаболических процессах, связанных с реакциями карбоксилирования/декарбоксилирования [2].

У человека CAs представлены 15 изоформами (включают Zn^{2+} в качестве каталитического иона и относятся к классу α), которые существенно различаются по своей каталитической активности, распределению в тканях и субклеточной локализации [3].

Карбоангидразы могут быть:

- цитозольные, такие как CAI, CAII, CAIII, CAVII и CAXIII;
- расположенные в клеточных мембранах, такие как CAXIV, CAXII, CAIX и CAIV;
- митохондриальный: CAV;
- секретирующийся в слюну: CAVI;
- существуют также СА без ферментативной активности.

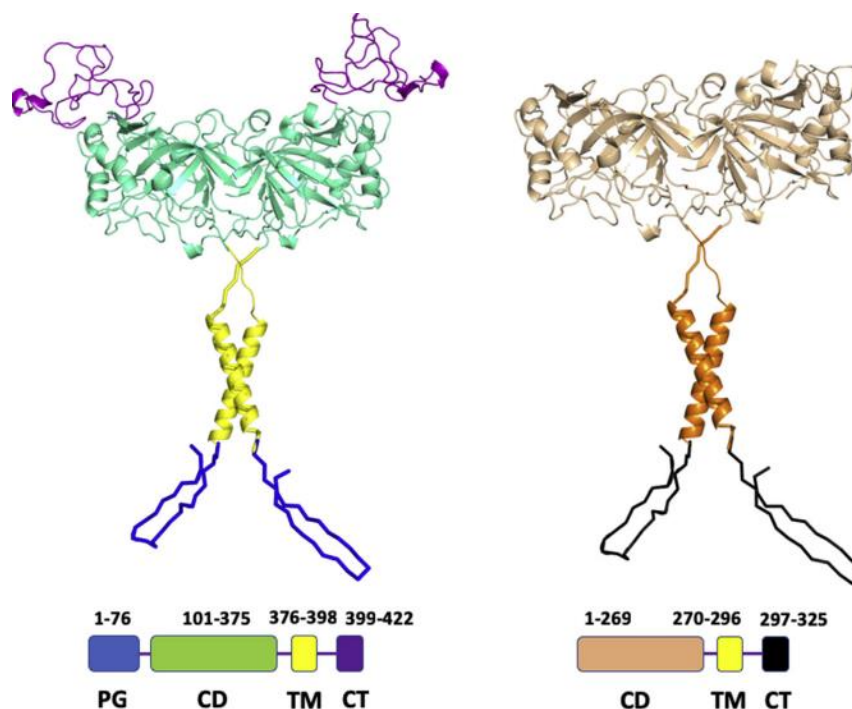
Следовательно, эти ферменты необходимы для широкого спектра биологических процессов, требующих кислотно-щелочного баланса в субклеточных компартментах. Интересно, что aberrantная экспрессия/активность многих hCA связана с болезненными состояниями, которые включают глаукому, отек, ожирение, невропатическую боль,

остеопороз и т. д., поэтому многие изоформы hCA были признаны ценными терапевтическими мишенями, и продолжают обнаруживаться новые связи с патологическими расстройствами [4]. Основная часть описания будет ограничена мембранными изоформами CAIX и CA XII из-за их важности при онкологических заболеваниях и в концепции инверсии градиента pH.

Множество исследований изображают hCAIX и hCA XII в качестве биомаркеров и терапевтических мишеней для различных типов рака, и оба фермента связаны с прогрессированием этого заболевания, метастазированием и нарушением терапевтического ответа [5], но hCA XII, будучи скорее связанным с менее агрессивным и хорошо дифференцированным опухолевым фенотипом, привлек меньше внимания исследователей по сравнению с hCAIX [6].

hCAIX и XII отличаются от остальных изоформ CA тем, что представляют собой трансмембранные мультидоменные белки с внеклеточным каталитическим доменом, трансмембранным коротким доменом и коротким внутрицитозольным «хвостом». Дополнительный протеогликановый домен (PG), который присутствует только у hCAIX на его N-конце, облегчает взаимодействие с белками-партнерами, способствуя распространению и прогрессированию опухоли. О трехмерных структурах hCAIX и hCA XII впервые сообщили, соответственно, в 2009 и 2001 гг. (рисунок 1) [7,8].

Исследования выявили по крайней мере четыре аминокислоты в активном центре (положения 67, 91, 131 и 135), которые различаются между цитозольным hCAII и мембраносвязанными hCAIX и CA XII. Эти различия могут быть использованы для разработки изоформспецифических ингибиторов CAIX и XII и снижения ингибирования вездесущей нецелевой hCAII [9].



CD - каталитический домен; CT - С-концевой домен; PG - протеогликан-подобный домен; TM - трансмембранный домен.

Рисунок 1 – Структуры hCAIX и hCA XII

1.2 Экспрессия и функция карбоангидраз в опухолевых клетках

Возникновение и прогрессирование рака является результатом накопления многочисленных генетических и эпигенетических изменений. Однако экспериментальные и клинические данные исследований также подтверждают важную роль физиологии опухоли и микроокружения злокачественных клеток. Эти факторы в значительной степени способствуют внутриопухолевой гетерогенности, отбору агрессивных опухолевых клеток, инвазии и метастазированию, а также резистентности к противоопухолевому лечению [10].

Враждебная среда, которая способствует росту опухоли и одновременно гибели соседних нормальных клеток создается благодаря повышенной продукции и высвобождению протонов в сочетании с ограниченной перфузией и изменениями в механизмах регулирования pH [11]. Внеклеточное закисление способствует прогрессированию опухоли, что в свою очередь

реализуется с помощью различных механизмов, включая рН-зависимую модуляцию интегрин-опосредованной адгезии клеток к матриксу, деградацию внеклеточного матрикса посредством активации катепсинов и различных механизмов матриксных металлопротеаз, а также путем уничтожения соседних клеток-хозяев. В совокупности изменения в метаболизме и регуляции рН обеспечивают эволюционное преимущество раковых клеток над окружающими их клетками-хозяевами и тем самым способствуют соматической эволюции, которая отбирает более агрессивные фенотипы опухолевых образований [12].

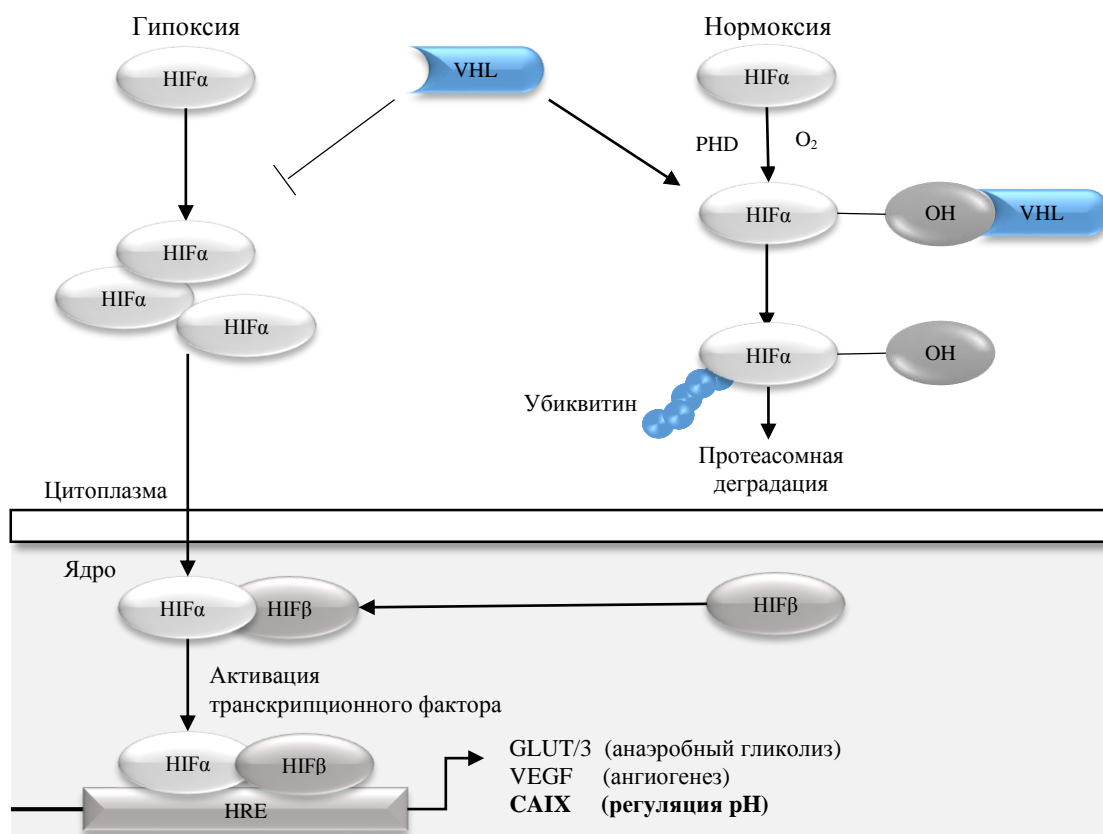
Тем не менее, несмотря на то, что метаболические изменения и обратный градиент рН могут представлять собой препятствие для традиционной терапии рака, они также могут стать ахиллесовой пятой опухоли, которую можно использовать для новых терапевтических подходов. [13].

Как упоминалось ранее, карбоангидразы IX и XII являются ключевыми регуляторами рН, которые создают дифференциальное микроокружение рН в солидных опухолях и обеспечивают выживание опухолевых клеток в стрессовых условиях. Сверхэкспрессия CAIX и CA XII приводит к увеличению роста опухоли, активации метастатического каскада и снижению ответа на химиотерапию. Роль каждого из CA подробнее рассмотрена ниже.

1.2.1 Связь CAIX с гипоксией и ацидозом

Подкисление микроокружения опухоли часто развивается из-за вызванного гипоксией онкогенного метаболизма, что приводит к интенсивной выработке лактата, протонов и диоксида углерода. Чтобы избежать внутриклеточного накопления кислых продуктов метаболизма, что несовместимо с выживанием и пролиферацией, опухолевые клетки активируют молекулярный механизм, который регулирует рН, управляя трансмембранными потоками ионов изнутри и снаружи. CAIX избыточно экспрессируется во многих таких опухолях в ответ на путь индуцируемого гипоксией фактора (HIF) [14].

Фактор транскрипции HIF-1, представляет собой гетеродимер, состоящий из индуцируемой субъединицы (HIF-1 α) и конститутивно экспрессируемой субъединицы (HIF-1 β). Активация HIF-1 при гипоксии достигается за счет стабилизации и/или экспрессии α -субъединицы. Гипоксия ослабляет гидроксилирование пролина в домене HIF-1 α из-за неактивности пролилгидроксилазы (PHD) в отсутствие кислорода, что приводит к стабилизации HIF-1 α и нераспознаванию белка-супрессора pVHL (рисунок 2). Ассоциация HIF-1 α с β -субъединицей приводит к образованию HIF-1 и экспрессии генов-мишеней, содержащих сайты HRE, включая переносчики глюкозы (GLUT-1 и GLUT-3), рост VEGF, запускающий неоангиогенез, и, наконец, CAIX, участвующий в регуляции pH и клеточной адгезии [15]. После hCAIX участвует в нейтрализации избытка кислых конечных продуктов гликолитического метаболизма в цитозоле для предотвращения возникновения внутриклеточного ацидоза [14]. Активный центр фермента CAIX в каталитическом домене обращен во внеклеточное пространство и за счет ускоренной гидратации CO₂ способствует регуляции pH через плазматическую мембрану, одновременно способствуя диффузии CO₂ и подвижности протонов в опухолевой ткани.



HRE - элемент, чувствительный к гипоксии; PHD - пролилгидроксилаза; VHL - белок фон Хиппеля-Линдау

Рисунок 2 – Механизм индуцированной гипоксией экспрессии генов, опосредованной фактором транскрипции HIF, приводит к сверхэкспрессии CAIX в гипоксических опухолях

В настоящее время хорошо установлено, что CAIX делает это в пространственном и функциональном сотрудничестве с различными кислотными переносчиками бикарбонатов, включая натрий-зависимые переносчики бикарбоната NBCe1 и NBCn1, переносчики лактата и монокарбоксилата, экспортирующие протоны, MCT1 и MCT4 [16]. Нейтрализация внутриклеточных протонов импортируемыми бикарбонат-ионами способствует повышению pH_i до значений, благоприятных для метаболических процессов, передачи сигналов и пролиферации клеток ($pH_i = 7.2$). С другой стороны, внеклеточные протоны, генерируемые той же реакцией, катализируемой hCAIX, остаются вне клетки и способствуют закислению внеклеточной среды ($pH_e = 6.8$).

Таким образом, опухолевые клетки снижают свой рН_e как за счет продукции молочной кислоты (из-за высоких скоростей гликолиза), так и за счет гидратации CO₂, катализируемой опухоль-ассоциированной CAIX, обладающей внеклеточным каталитическим доменом.

1.2.2 CA XII: распространение и роль в онкогенезе

CA XII была открыта в 1998 году двумя независимыми группами: Turesi и соавторы идентифицировали CA XII в почечно-клеточной карциноме человека с помощью серологического скрининга экспрессии с аутологичными антителами, клонировали и секвенировали соответствующую кДНК и доказали сверхэкспрессию ее мРНК примерно у 10% пациентов с почечно-клеточным раком (RCC) [17]. Иванов С. и соавторы, с другой стороны, клонировали CA XII как новую мишень pVHL, используя дифференциальный дисплей РНК [18]. Авторы показали, что экспрессия мРНК CA XII ингибируется pVHL дикого типа в клеточных линиях RCC, предполагая, что она подвергается такой же регуляции, как и CA IX. Затем те же авторы [17,18] показали, что мРНК CA XII экспрессируется в почках, поджелудочной железе, толстой кишке, предстательной железе, яичниках, легких и головном мозге взрослых, а также обнаруживается в нормальной эндометрии, толстой кишке, почках и глазах. Эти данные свидетельствуют о важной физиологической роли этого фермента в транспорте ионов и концентрации жидкости в различных органах, т.е. в то время как сверхэкспрессированный изофермент hCA IX в основном связан с отрицательным прогнозом рака и ограничен гипоксическими опухолями, hCA XII можно обнаружить в некоторых нормальных тканях. CA XII отличается от CA IX тем, что его экспрессия связана с эстроген/прогестерон-положительным раком молочной железы и регулируется действием эстрогена. В этом случае CA XII является предиктором более положительного исхода для пациента, что предполагает, что чрезмерное воздействие на активность этой изоформы CA XII, в отличие от CA IX, может иметь отрицательный эффект [19].

Однако этот фермент так же, как и hCAIX, рассматривается как мишень для агентов противораковой терапии. Было показано, что в некоторых опухолях наблюдается коэкспрессия CA XII и CAIX преимущественно в перинекротических областях, что указывает на то, что CA XII также может индуцироваться гипоксией [20]. Ввиду того, что изоформы hCAIX и XII принимают участие практически во всех стадиях онкогенеза, эти ферменты считаются достаточно валидированной мишенью для терапии некоторых видов опухолей, а разработка новых ингибиторов hCAIX и XII представляется актуальной задачей.

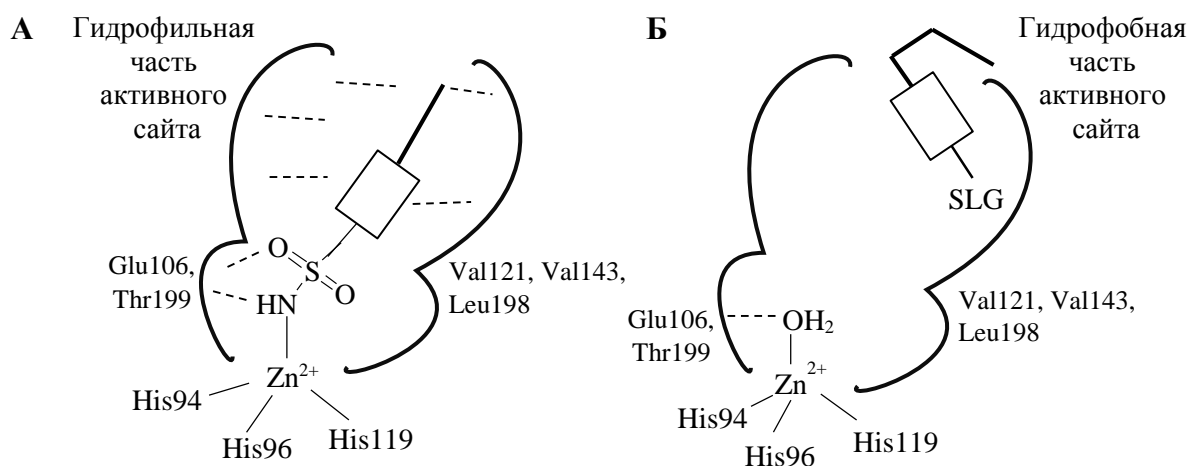
1.3 Ингибиторы карбоангидразы IX

Как обсуждалось ранее, рост опухоли, ангиогенез, пролиферация и метастазирование связаны со сверхэкспрессированными уровнями hCAIX и XII, что предполагает стратегию нацеливания на такие ферменты в качестве одного из подходов в химиотерапии рака. В этом контексте селективное ингибирование ассоциированных с опухолью изоформ hCAIX и XII по сравнению с другими изоформами, особенно наиболее распространенными цитозольными hCA I и II, является весьма желательным и приводит к лечению опухолевых заболеваний с меньшим количеством побочных эффектов [15].

Наиболее важный класс ингибиторов CA (CAI) принадлежит к новому поколению сульфаниламидов. Среди этого огромного семейства несколько соединений были подробно исследованы на моделях опухолей животных, и только одно такое производное SLC-0111 дошло до клинических испытаний. Прорыв в этой области также был представлен различными инновационными подходами: открытием новых хемотипов, таких как кумарины, гетерокумарины, и разработкой новых целевых подходов, таких как двойное нацеливание с гибридными ингибиторами и ингибирование в иммунотерапии моноклональными антителами [21].

Ингибиторы СА состоят из трех компонентов: цинксвязывающей группы (ZBG), линкерной области и хвостовой области. ZBG закрепляет лиганд в центре активного сайта СА, линкер дополнительно стабилизирует лиганд посредством взаимодействий с остатками активного сайта, а хвостовая часть способствует специфичности к изоформе посредством взаимодействий с уникальными для изоформы остатками [22].

hCAIX могут ингибироваться различными стратегиями, такими как координация с ионом цинка, расположенным в каталитическом активном центре. Молекулы этого класса представлены производными сульфонамидов и их биоизостеров. Кроме того, изучается способ перекрывания каталитически активной щели, и этот подход был изучен с использованием кумаринов в качестве недавно открытого класса hCAIs (рисунок 3) [23].



А - ингибирование СА посредством координации с каталитическим ионом Zn^{2+} ;
 Б - ингибирование СА посредством перекрывания входа в каталитический центр
 SLG - Липкая липофильная группа

Рисунок 3 – Схематическое изображение способов ингибирования СА

Кумарин является природным привилегированным гетероциклическим каркасом, и молекулы, содержащие его, проявляют многочисленные биологические свойства, такие как ингибирование передачи сигналов СК2, EGFR и PI3K-АКТ-mTOR. Недавно были обнаружены кумарины как новый класс hCAI с ингибирующим механизмом, отличным от ингибиторов на

основе сульфонамидов. Кумарин действует как пролекарство, подвергающееся гидролизу под действием эстеразной активности СА с образованием производного 2-гидроксикоричневой кислоты, которое может связываться с щелью активного сайта и перекрыть его вход. [24].

Поскольку сайты связывания кумаринов являются наиболее гетерологичной областью активного центра между всеми изоформами САs, неудивительно, что эти хемотипы проявляют очень высокую селективность в отношении специфических изоформ САs. Кроме того, простота в химическом строении кумаринов позволяет легко вводить различные заместители, что приводит к образованию большого числа производных с интересными биологическими профилями. Следовательно, многие текущие усилия были сосредоточены на разработке новых производных кумарина в качестве селективных ингибиторов hCAs IX/XII, которые можно было бы использовать для терапии рака [25]. Например, В. Kurt и соавторы представили серию наномолярных ингибиторов hCAIX и XII **1**, содержащих два кумариновых фрагмента (рисунок 4). Антипролиферативные свойства этих соединений против клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231 оцениваются как высокие (IC_{50} составляет от 1 до 13 мкМ) [26].

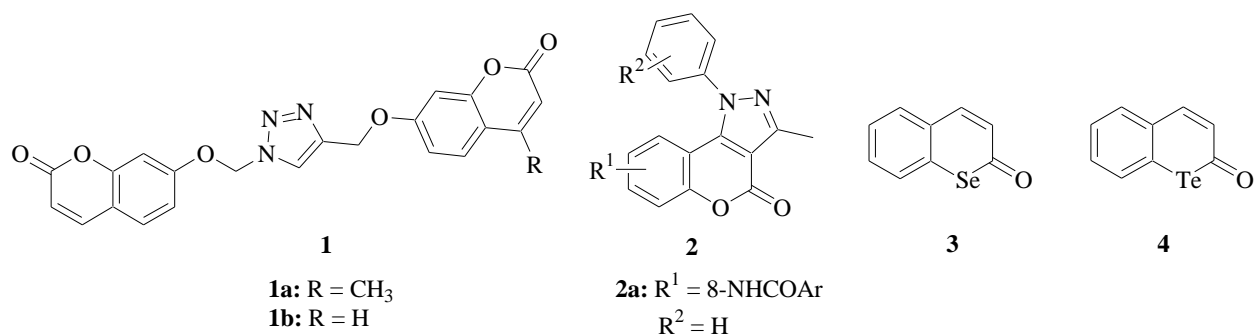


Рисунок 4 – Структуры кумариновых и гетерокумариновых ингибиторов hCA

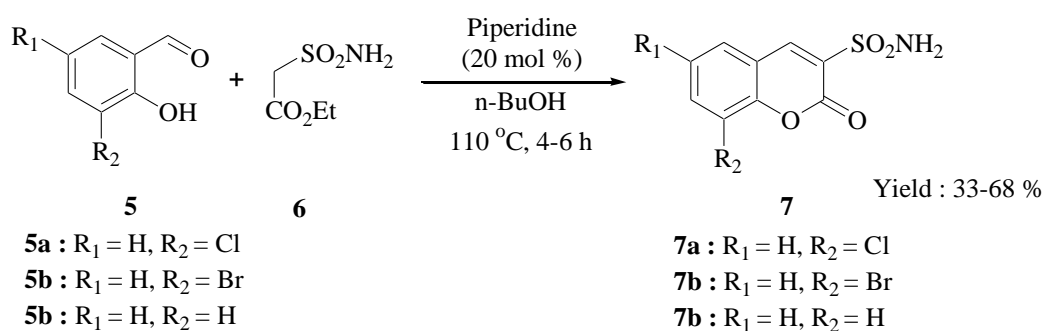
Bonardi A. и другие опубликовали новые структуры ингибиторов на основе хромено[4,3-с]пирозол-4-онов **2** (рисунок 4). Большая часть соединений типа **2** оказалась потентными ингибиторами hCAIX и XII, и лишь некоторые производные продемонстрировали избирательное действие в отношении hCAIX. Исследования на антипролиферативные свойства ингибиторов **2** на клеточных линиях рака толстой кишки HT-29 в гипоксических условиях показали, что только одно производное типа **2** (R¹ = 8-NHCOAr, R² = H) подавляет клеточный рост на 60 % при концентрации 100 мкМ [27].

В 2018 году Angeli и соавторы описали новую серию различных халькогенкумаринов, имеющих многообещающий профиль ингибирования, находящийся в низком наномолярном диапазоне, против связанных с опухолью. изоформ hCAIX и XII. Пара молекул **3** и **4** (рисунок 4) были исследованы *in vitro* на антипролиферативную активность. Соединение **3** (K_i = 26.3 и 22.9 нМ для hCAIX и XII соответственно) после 48 ч инкубации против линии раковых клеток MDA-MB-231 показало выраженный антипролиферативный эффект в гипоксических условиях (клеточная выживаемость составляет около 45 % при концентрации 30 мкМ). Интересно, что теллуокумарин **4** обладал выраженным антипролиферативным профилем в гипоксических условиях по отношению к обеим раковым линиям,

используемых в эксперименте: клеточная выживаемость составила 40 % и 25% при концентрации 100 мкМ для РС-3 и MDA-MB-231 соответственно [28].

В статье [29] сообщается о разработке и синтезе нового типа химерных молекул, включающих первичную сульфонамидную группу, непосредственно в 3-м положении кумаринового ядра, что оказалось возможным за счет введения эфиров 2-сульфамойлуксусной кислоты **6** в классическую конденсацию Кнёвенагеля с производными салицилового альдегида **5** (схема 1). Полученные соединения имеют значения K_i в наномолярном диапазоне.

Схема 1



На сегодняшний день наиболее часто представляемыми и применяемыми в терапии САІ являются соединения на основе сульфонамидов и их изомеры (сульфамиды или сульфаматы) [30]. Сульфонамидная функциональность в этих соединениях отвечает за координацию с ионом металла фермента (который является Zn^{2+} во всех известных САs) и обозначается как цинксвязывающая группа (ZBG). Эффективность и селективность ингибитора определяет периферия молекулы САІ. Это иллюстрируется эволюцией слабого и неселективного ингибитора СА бензолсульфонамида (BSA) в сильнодействующие сульфонамиды **8-11**, селективные по изоформе (рисунок 5) [31].

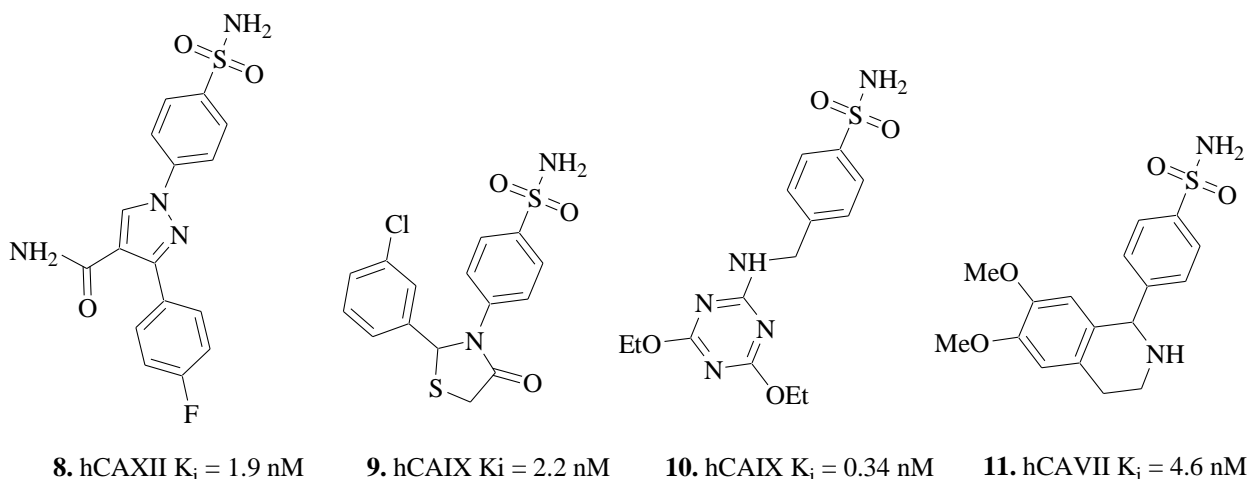


Рисунок 5 – Примеры сильнодействующих и селективных по изоформе CAIs - производные бензолсульфонамида (BSA)

Авторы статьи [31] пришли к выводу, что если низкоаффинный BSA подвергается скринингу в комбинациях с различными фрагментами, то комбинации, которые вызывают больший тепловой сдвиг, чем BSA или рассматриваемый фрагмент в отдельности, могут означать подходящую периферию BSA для разработки новых CAI. Другими словами, это могло бы послужить основой для открытия фрагментов, которые связываются с CA совместно с BSA и, таким образом, могут служить кандидатами для последующего химического связывания с мотивом BSA, что в конечном итоге приводит к активным CAI.

Один из наиболее успешных низкомолекулярных ингибиторов **SLC-0111** (рисунок 6), разработанный SignalChem Lifesciences Corporation (SLC), представляет собой уреидозамещенный бензолсульфонамид, который проходит клинические испытания для лечения опухолей, экспрессирующих CA IX. Значения K_i этого соединения для CAIX и CAII составляют 45 и 960 нМ соответственно [32].

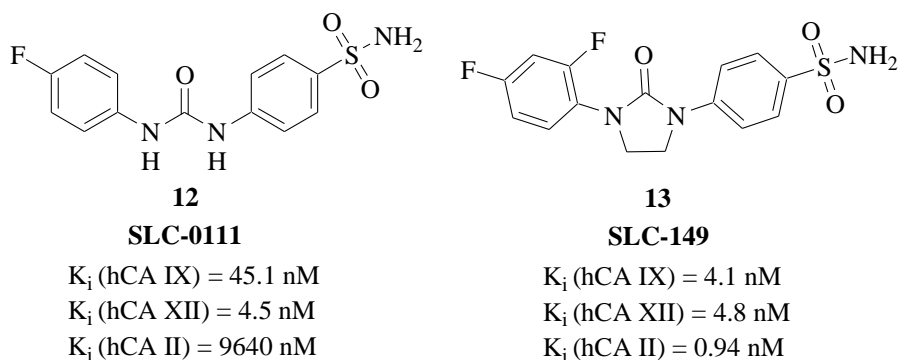
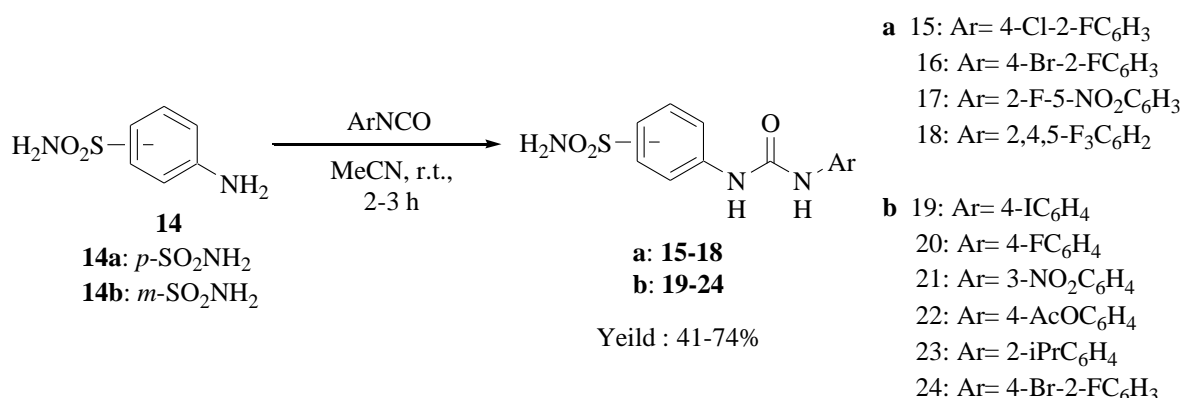


Рисунок 6 – Химическая структура ингибиторов CAIX и XII

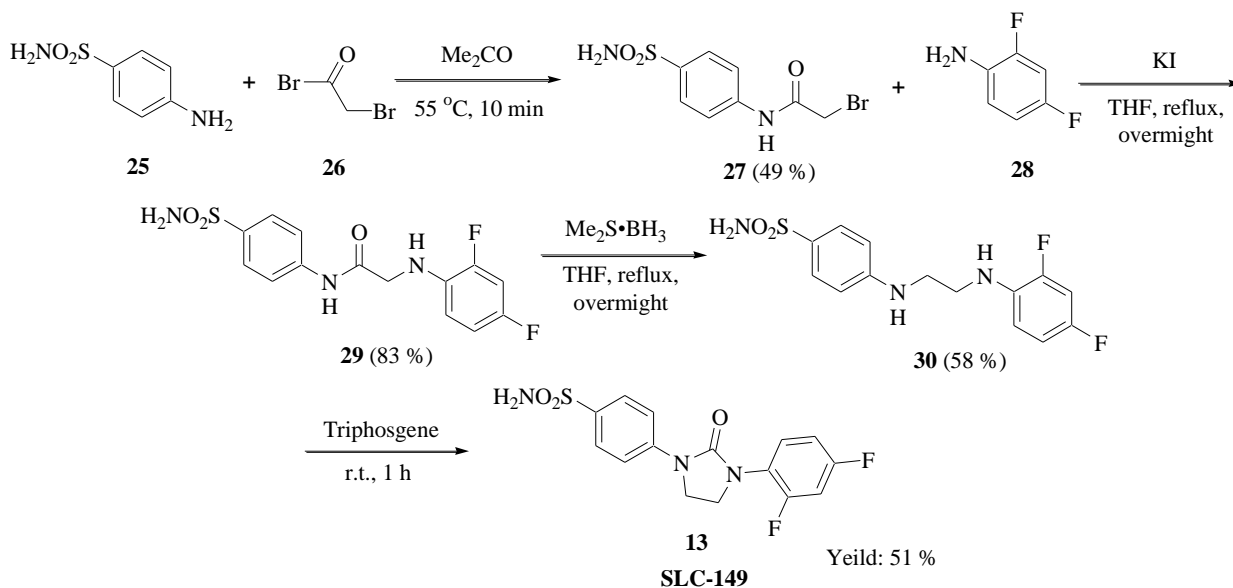
Недавно SLC синтезировала родственные имидазолу производные SLC-0111 (схема 2) и планирует разработать один из этих ингибиторов, 4-(3-(2,4-дифторфенил)-оксоимидазолидин-1-ил)-бензолсульфонамид (SLC-149) в качестве более мощного специфического ингибитора CA IX [33].

Схема 2



Структура SLC-149 отличается от SLC-0111 тем, что уреидная часть была преобразована в пятичленную циклическую оксоимидазолидиновую часть и была получена по схеме 3 [33]. Это привело к значительному увеличению ингибирующего потенциала в отношении CAII, IX и XII, однако уменьшило его селективность от опухолеассоциированных изоформ к цитозольным.

Схема 3



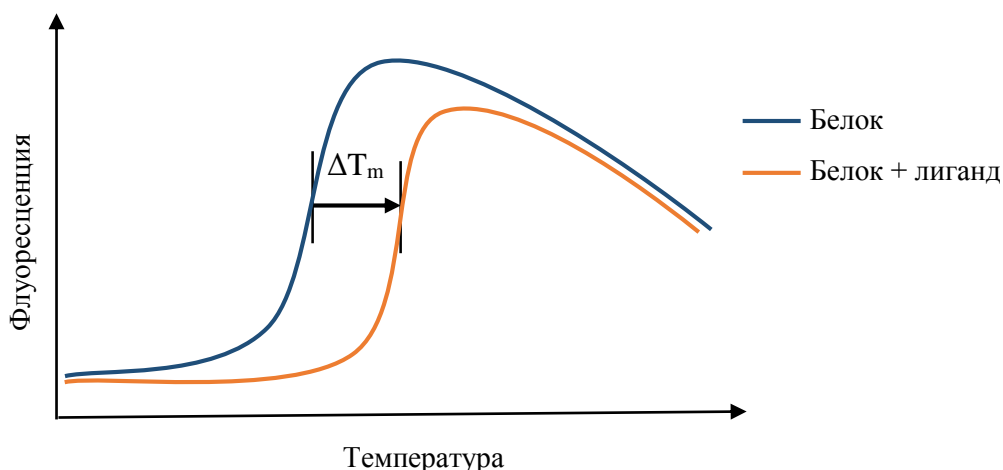
Таким образом, в литературе представлено колоссальное количество сообщений о разработках новых ингибиторов hCAIX и XII на основе различных хемотипов, часть из которых приведена выше. Однако лишь малая группа потентных ингибиторов hCAIX обладает выраженными антипролиферативными свойствами. Более того, из всего массива разработанных в настоящее время ингибиторов только один противораковый агент SLC-0111 дошел до стадии клинических испытаний [34]. Такие наблюдения позволили предположить, что ингибиторы hCAIX в качестве индивидуальных противораковых агентов способны лишь несколько снизить пролиферацию раковых клеток, однако не подавить их полностью. Со временем стало появляться больше сообщений о противораковом потенциале ингибиторов hCAIX в качестве адъювантной терапии.

1.4 Анализ термического сдвига

1.4.1 Дифференциальная сканирующая флуориметрия

Одной из основных задач при открытии лекарств является разработка методов скрининга для быстрой идентификации ингибиторов белков-мишеней из библиотек соединений. Для решения этих проблем был предложен метод термического сдвига [35].

Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF), также называемая анализом термического сдвига (TSA), является основным методом оценки связывания лигандов с белком, благодаря простоте выполнения и высокой производительности [36]. Белки сворачиваются таким образом, чтобы свести к минимуму свободную энергию. Гидрофобные остатки упаковываются во внутреннюю часть структуры, а гидрофильные остатки отображаются снаружи. Структуры стабилизируются внутримолекулярными силами, такими как электронные силы притяжения Ван-дер-Ваальса, дипольные взаимодействия и водородными связями [37]. По мере увеличения тепловой энергии эти внутримолекулярные силы белка нарушаются, что приводит к дестабилизации структуры белка, денатурации и обнажению внутренних гидрофобных участков. Термическую денатурацию можно контролировать с помощью детекции флуоресценции с помощью инструментов ПЦР в реальном времени с использованием собственной флуоресценции триптофана или красителей, которые имеют повышенный квантовый выход при связывании в гидрофобных средах [38]. График зависимости интенсивности флуоресценции от температуры дает характеристическую кривую плавления и температуру тепловой денатурации (T_m), которая определяется как средняя точка переходной области плавления. На T_m влияют условия образца: связанные лиганды изменяют значения T_m , и, следовательно, экспериментально значимые наблюдения ΔT_m обычно указывают на связывание (рисунок 7) [39].



ΔT_m - разница в температуре плавления

Рисунок 7 – Кривая DSF, демонстрирующая денатурацию белка в отсутствие и присутствии лиганда

Метод DSF в сочетании с зеленым флуоресцентным белком (DSF-GFP) был разработан и опубликован Moreau et al. в 2012 г. [40]. Развитие дифференциальной сканирующей флуориметрии значительно облегчило скрининг лигандов в разработке лекарственных соединений. Метод не ограничен потребностью как в высокоочищенных белках, так и в сольватохромных красителях (по сравнению с классической DSF), что позволяет его использовать в более надежных высокопроизводительных технологиях, преодолевая вышеперечисленные ограничения. Данная технология основана на изменениях в проксимальном окружении GFP, за счет разворачивания и агрегации интересующего белка, которые можно измерить относительно флуоресценции флуорофора. Технология выполнения эксперимента DSF-GFP в формате 96-луночного планшета проста, не требует сольватохромных красителей, что снижает риск помех. Образцы белка смешиваются с условиями тестирования в планшете и подвергаются протоколу кривой плавления с использованием термоциклера в режиме реального времени [41].

1.4.2 Анализ клеточного термического сдвига

Анализ термического сдвига (TSA) традиционно применялся с использованием очищенных белков, а в последнее время был расширен для изучения взаимодействия мишеней в клеточной среде с появлением анализов клеточного теплового сдвига (CETSA). О тепловом сдвиге в клеточном контексте сообщалось относительно недавно [42]. В первых исследованиях CETSA (2013 г.) целые клетки или клеточные лизаты нагревались до определенного диапазона температур, агрегированные белки удалялись центрифугированием, растворимый белок определяли иммуноблоттингом. Взаимодействие лекарственного средства с мишенью было продемонстрировано для различных клинических мишеней с использованием лизатов клеточных линий. После этого первоначального отчета были опубликованы другие эксперименты, описывающие применение этого метода к мембранным белкам [43] с использованием результатов масс-спектрометрии. Эти подходы расширили CETSA до полного обнаружения протеома, включая мембранные белки, и описали методы экспериментов, которые информировали как о целевых, так и о нецелевых взаимодействиях.

Преимущество CETSA заключается в том, что метод не содержит меток и, следовательно, позволяет напрямую контролировать связывание лиганда с определенной мишенью в лизате, живых клетках или даже в кусочках ткани, также может быть использован для изучения последующих эффектов взаимодействия белков, обеспечивая новый взгляд на функцию белка *in situ*.

По мере публикации большего количества отчетов об использовании CETSA возник интерес к расширению возможностей CETSA для увеличения производительности анализа. HT-CETSA можно разделить на две основные категории, в которых измеряется либо эндогенный белок, либо белок с репортерной меткой. Технологии на основе репортеров обеспечивают преимущество в гибкости системы за счет использования белковых меток, которые присоединяются к мишеням, позволяя реагентам и процедурам обнаружения оставаться относительно фиксированными [44].

Одним из распространенных форматов анализа HTS является технология AlphaLISA/AlphaScreen, в основе которого лежит хемилюминесценция (рисунок 8). Для этого подхода перенос энергии между донорными и акцепторными частицами на основе близости обеспечивается антителами против интересующей мишени, которые связаны с частицами. В присутствии целевого белка антитела на гранулах связываются с мишенью и сближают донорную и акцепторную частицу, так что, когда донорная часть возбуждается, генерируемый синглетный кислород оказывается достаточно близко к акцепторной части, чтобы обеспечить передачу энергии, в конечном счете вызывая генерацию хемилюминесцентного сигнала [45].

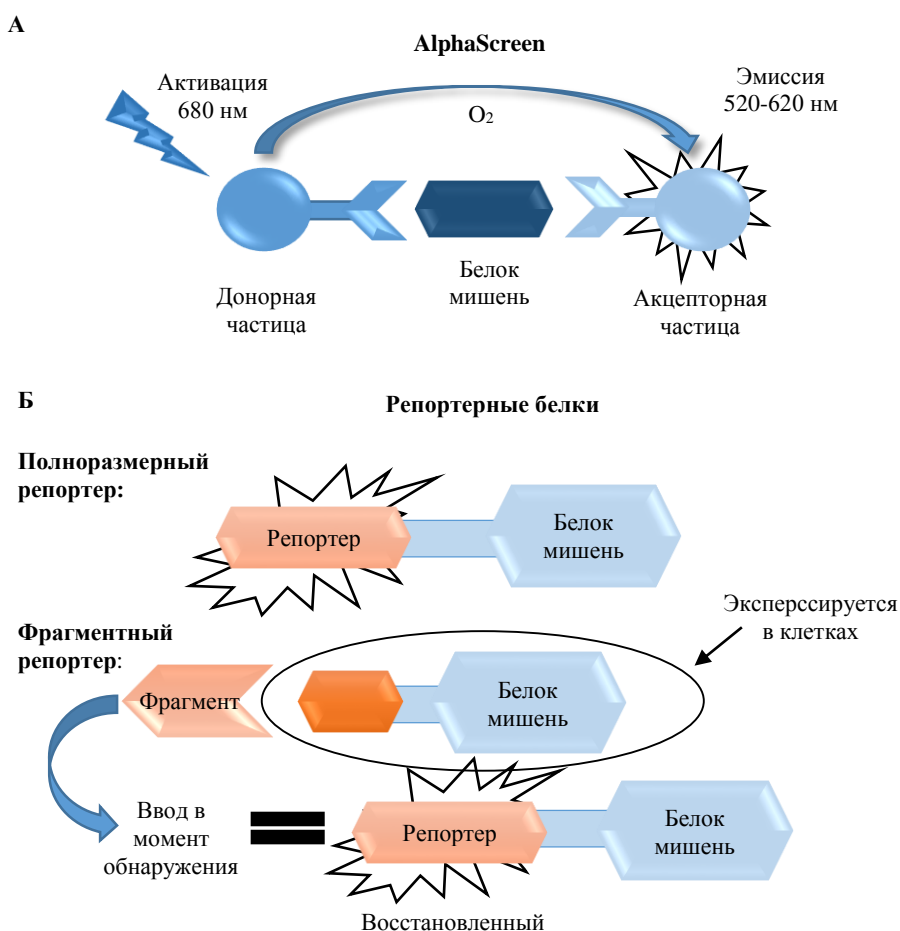


Рисунок 8 – Методы обнаружения целевого белка с высокой пропускной способностью для CETSA

На сегодняшний день в стратегиях HT-CETSA также используются репортерные анализы (рисунок 8, Б), в которых либо полноразмерный репортер (верхняя панель), либо фрагмент репортера (нижняя панель) конструируют как слитый белок с белком-мишенью и экспрессируются в клетках. Обнаружение полноразмерных репортерных слияний требует только добавления реагентов репортерного субстрата для количественного определения. Для анализов с разделенным репортером во время обнаружения должен быть добавлен дополняющий фрагмент репортера. Чтобы обойти ограничения использования полноразмерных репортеров (низкая температура плавления, размер репортера), есть возможность использовать подходы в контексте CETSA, которые позволяют присоединить небольшую метку к интересующему белку, а более крупный фрагмент может быть доставлен на этапе обнаружения после нагревания. Системы комплементации были разработаны для ферментов люциферазы, включая люциферазу Renilla [46], NanoLuciferase [47], также доступны флуоресцентные системы комплементации GFP (splitGFP) [48].

Таким образом, HT-CETSA как платформа для скрининга имеет несколько преимуществ. Во-первых, дает возможность быстро перейти от первичного скрининга к набору соединений, способные поражать мишень в сложной клеточной среде. Во-вторых, цели, которые являются сложными с точки зрения разработки анализа HTS, могут поддаваться HT-CETSA. Например, сюда входят мишени, которые требуют многокомпонентных комплексов для восстановления физиологически значимой активности, которую может быть сложно воссоздать в биохимических условиях. В-третьих, HT-CETSA обеспечивает платформу для идентификации молекул, которые связывают, но не обязательно ингибируют мишень. Это может быть выгодно для мишеней, которые обладают высокой гомологией в пределах каталитического сайта с антимисенями, где предпочтительно связывание с менее консервативной частью белка. Хотя HT-CETSA все еще находится на ранней стадии развития, существует множество возможностей для разработки

и внедрения этого подхода как в исследованиях, так и в условиях открытия лекарств.

1.5 Метод проточной цитометрии

Аберрантная регуляция экспрессии и функции белка может резко изменить клеточную физиологию и привести к многочисленным патофизиологическим состояниям, таким как рак, воспалительные заболевания и нейродегенерация. За последнее десятилетие обрел популярность метод, который помог ускорить усилия по поиску лекарственных соединений, основанный на оценке структуры внутриклеточного белка, за счет использования проточного цитометра в сочетании с репортерными белками на основе флуоресценции [49].

Проточная цитометрия (FC) – это разносторонний анализ на основе флуоресценции [50]. Проточный цитометр может предоставить информацию о внутренних и внешних характеристиках анализируемых клеток, включая размер, форму, плотность, содержание ДНК, РНК и белка, внутренние или внешние рецепторы, апоптоз и некроз [51,52,53].

1.5.1 Устройство и принцип работы проточного цитометра

Как следует из названия, FC представляет собой метод качественного и количественного измерения биологических и физических свойств клеток и других частиц, основанный на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки в суспензии, находящихся во взвешенном состоянии в высокоскоростном потоке жидкости [54].

Необходимые измерения осуществляются с помощью приборов, которые направляют одиночный поток клеток мимо источника света (лазера) и определяют результирующее рассеяние и излучение световой энергии на различных длинах волн, характеризуя клеточные популяции на уровне отдельных клеток. Как правило, проточный цитометр состоит из трех частей:

жидкостной системы, оптики и блока обработки электронного сигнала [55]. Измерение оптических свойств клетки осуществляется в проточной ячейке – ключевом элементе цитометра. Жидкостная система обеспечивает гидродинамическую фокусировку ламинарного потока частиц (1), которая позволяет клеткам проходить одну за другой через один или несколько световых лучей (2). Свет, рассеянный в прямом направлении к лучу лазера, затем собирается фотоумножителем и называется каналом прямого светорассеяния (FSC) (3). Это измерение дает информацию, позволяющую оценить размер частицы, т.к. более крупные частицы преломляют больше света, чем более мелкие. Фотоумножители, измеряющие луч света примерно под углом 90° к световому лучу, называются каналами бокового светорассеяния (SSC) (4) (рисунок 9). Это дает информацию об относительной неоднородности внутриклеточной организации. Например, нейтрофилы представляют собой высокозернистые клетки по сравнению с макрофагами [56].

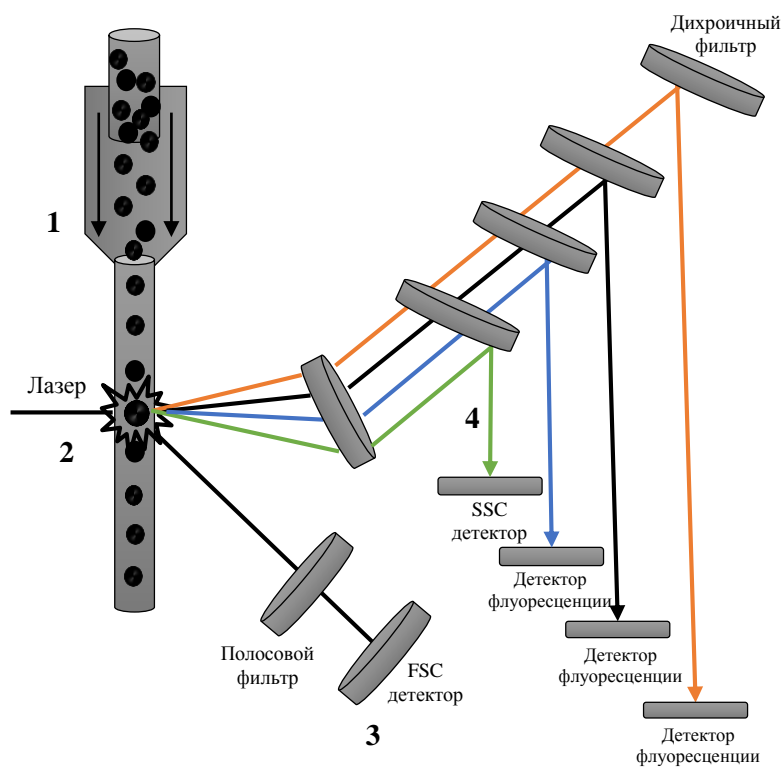


Рисунок 9 – Схема строения проточного цитометра

Для анализа конкретных мишеней с помощью проточной цитометрии компоненты клеток помечаются флуоресцентной меткой. Это может быть достигнуто с помощью автономных флуоресцентных молекул, антител, меченных флуорофором или флуоресцентными белками [54]. Последние обладают рядом преимуществ: не требуют ферментов или субстратов для генерации флуоресценции; не обладают высокой фототоксичностью; могут непрерывно экспрессироваться и даже передаваться последующим поколениям клеток, что позволяет проводить более долгосрочные исследования экспрессии белка в клетках или тканях; возможность контролировать экспрессию флуоресцентного белка с помощью индуцируемых промоторов. Ниже приводится рассмотрение флуоресцентных белков.

1.5.2 Флуоресцентные белки

Флуоресцентные белки (FP) в настоящее время являются важным инструментом во всех областях биомедицинских исследований [57]. Благодаря первоначальной очистке, клонированию и экспрессии зеленого флуоресцентного белка дикого типа (GFP) в 1990-х годах [58] ученые-биомедики теперь имеют доступ к настоящей палитре экспрессируемых маркеров, варьирующихся от синего до красного, со свойствами возбуждения и испускания, которые могут быть выбраны или адаптированы к конкретным технологиям обнаружения флуоресценции (таблица 1). FP чаще всего используются в репортерных анализах для определения, экспрессируется ли определенный ген клеткой, тканью или организмом без инвазивных процедур мечения [59].

Чтобы использовать FP для метки белка в различных типах клеток или организмах, интересующий белок делают флуоресцентным, сначала клонируя кДНК белка интереса в вектор для создания слитого белка FP. В этом слитом белке FP может быть связан либо с N-, либо с C-концом интересующего белка [60]. FP также могут быть доставлены внутриклеточно с помощью вирусной трансдукции [61]. После экспрессии в интересующей клетке слитый белок FP

можно наблюдать или локализовать в организме неинвазивно, обеспечив правильную длину волны возбуждения для используемого FP. Как отмечалось выше, дополнительной обработки клеток или флуоресцентной маркировки не требуется.

Таблица 1 – Флуоресцентные белки и их характеристики

Оптический канал	Белок	Возбуждение, нм	Эмиссия, нм	Олигомеризация
Дальний красный	mPlumg	590	649	Мономер
Красный	mCherry	587	610	Мономер
Оранжевый	mOrange	548	562	Мономер
	mKO	548	559	Мономер
Желтто-зеленый	Venus	515	528	Слабый димер
	YFP	514	527	Слабый димер
Зеленый	GFP	395	509	Слабый димер
	eGFP	488	507	Слабый димер
Голубой	CyPet	435	477	Слабый димер
	Cerulean	433	475	Мономер

Обнаружение флуоресцентного белка зависит от правильности выбора оптического канала и фильтров. Длина волны возбуждения должна быть как можно ближе к максимумам возбуждения, хотя широкий диапазон кривых возбуждения для FP упрощает процесс подбора лазера. Недавняя тенденция использования нескольких лазеров в проточных цитометрах оказалась крайне полезной при анализе флуоресцентных белков. Зеленый (532 нм) и желтый (561 нм) лазеры в комбинации часто встречаются в современных проточных цитометрах и являются почти идеальными источниками возбуждения для всех, кроме самых длинных красных флуоресцентных белков [62]. Оранжевые лазеры с длиной волны 592-594 нм становятся все более распространенными в мультлазерных приборах и оптимально подходят для самых длинных красных лучей, хотя обычно работает и лазер с длиной волны 561 нм [63]. Хотя длина волны возбуждения может быть недоступна вблизи максимального поглощения конкретного FP, соответствующие уровни флуоресценции обычно достигаются благодаря низкому фону и высокому квантовому выходу

для многих FP. Примером является EYFP, который можно легко возбудить с помощью лазера с длиной волны 488 нм, хотя эта длина волны обеспечивает возбуждение только при примерно 30% пикового поглощения белка.

Таким образом, флуоресцентные белки являются мощным инструментом для исследователей, контролирующей экспрессию генов или выполняющих любые эксперименты по молекулярному клонированию. Эти белки обладают многими уникальными преимуществами по сравнению с альтернативными флуоресцентными или колориметрическими репортерными анализами, а открытие и разработка новых флуоресцентных белков еще больше расширили этот важный инструментарий.

1.5.3 Область применения проточной цитометрии

Проточная цитометрия подходит в качестве инструмента для изучения клеточной некробиологии, и благодаря множеству реагентов можно отслеживать различные этапы этих процессов: апоптоз, некроз, аутофагия.

Одной из первых стадий апоптоза являются изменения, наблюдаемые в митохондриях, где мембранный потенциал разрушается, что приводит к высвобождению нескольких факторов, которые могут ингибировать антиапоптотические белки, а также высвобождению цитохрома c, который связывается с другим белком, что в конечном итоге вызывает активацию каспазы-9, тот в свою очередь активирует каспазу-3 [64]. Существует множество красителей, которые могут измерить эту деполяризацию. Одним из наиболее распространенных является JC-1, который представляет собой проникающий в клетки краситель, способный излучать красную флуоресценцию (~ 590 нм) в здоровых, активных митохондриях из-за образования агрегатов. По мере снижения мембранного потенциала агрегаты распадаются, а флуоресценция переходит в зеленый цвет (~ 529 нм) [65].

Следующий этап в апоптозе, включающий активацию каспаз, приводит к изменению симметрии и проницаемости мембраны. Фосфатидилсерин (PS) находится на внутреннем слое плазматической мембраны. По мере прогрессирования апоптоза PS переходит на внешнюю мембрану, что является

сигналом для фагоцитоза клеток [64]. Белок Annexin V представляет собой кальций-зависимый белок, который преимущественно связывается с PS. Annexin V используют меченным флуоресцентной молекулой FITC с максимумом поглощения вблизи 490 нм. При добавлении непроницаемых для здоровых клеток красителей, такой как 7-AAD или PI (в ДНК-связывающие красители), получают надежный анализ для выявления апоптотических и некротических клеток [66]. Типичные данные приведены на рисунке 10.

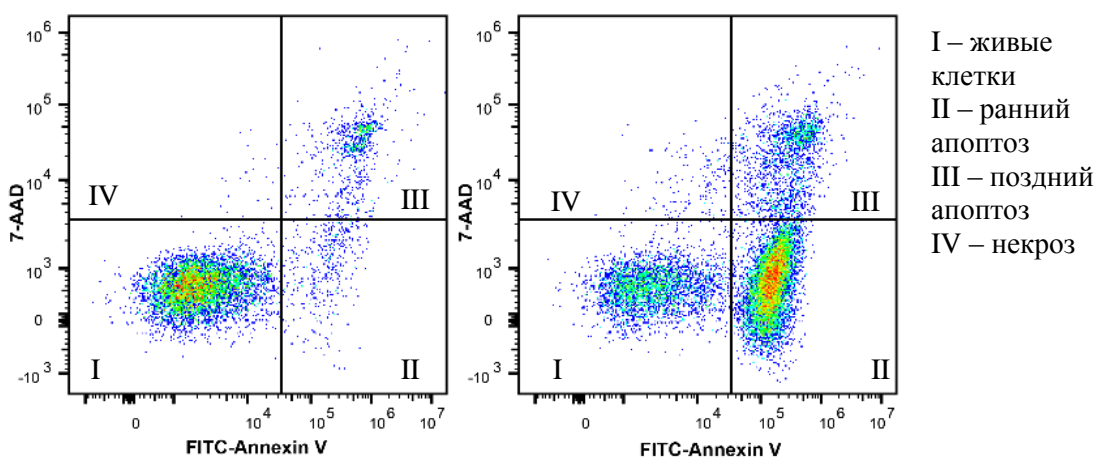


Рисунок 10 – Детекция апоптоза/жизнеспособности клеточной линии

Проточная цитометрия не ограничивается изучением клеточной гибели и используется при разработке и анализе фармацевтических препаратов. Приложения в клеточной биологии включают: подсчет клеток, анализ клеточного цикла, пролиферацию, фенотипирование различных типов клеток и последующую сортировку клеток [54].

Помимо вышперечисленного, проточную цитометрию применяют также для обнаружения и мониторинга внутриклеточной локализации различных белков. Авторы статьи [67] представляют подход, который заключается в слиянии интересующего белка с флуоресцентными репортерами для изучения стабильности белка интереса (POI). Был разработан лентивирусный вектор, который позволяет экспрессировать три разных типа белка из одной мРНК: зеленый флуоресцентный белок (EGFP) с маркировкой

FLAG, фактор устойчивости к пурамицину и красный флуоресцентный белок (RFP) с маркировкой FLAG, слитый с белком интереса (рисунок 11). Измерение коэффициента флуоресценции методом проточной цитометрии позволяет точно оценить количество POI в различных и медикаментозно-индуцированных условиях.

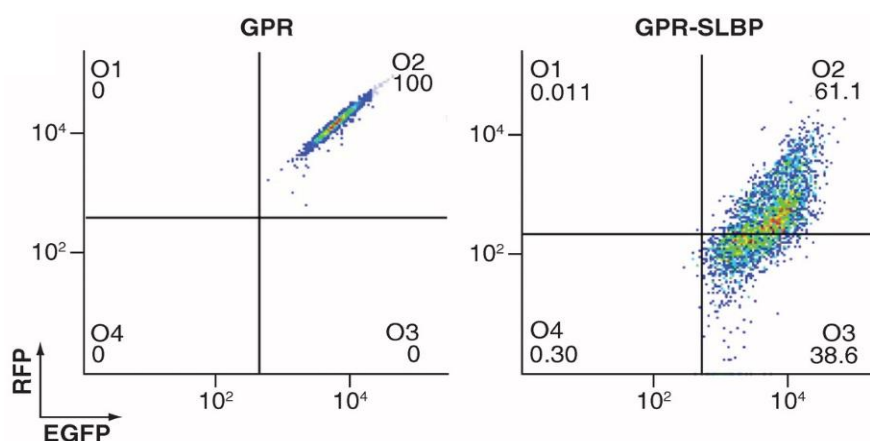


Рисунок 11 – Анализ моноклональных клеточных линии с помощью проточной цитометрии на флуоресценцию EGFP и RFP

В статье [68] описывают подход, также основанный на проточной цитометрии, для характеристики белковых агрегатов, выделенных из клеточной среды, меченных флуоресцентными белками GFP или mCherry. Агрегаты белков индуцировали в клеточной линии тепловым шоком и метили с использованием репортерных белков для контроля. Таким образом, метод позволяет проводить прямой анализ лизированных клеток, не требуя дальнейшей очистки агрегатов.

2 Результаты и их обсуждение

Исходя из литературного обзора, для оценки взаимодействия лиганда с белком интереса *in situ* применим недавно разработанный метод – анализ клеточного термического сдвига (CETSA), основанный на принципе термостабилизации целевых белков, вызванной лигандом. Термическую денатурацию возможно контролировать детекцией флуоресценции с помощью проточного цитометра с использованием флуоресцентных репортеров. Преимущество рассматриваемого метода заключается в многообразии реагентов и технологических решений, позволяющих значительно расширить как прикладные, так и диагностические возможности CETSA в сочетании с проточной цитометрией.

На сегодняшний день было зарегистрировано лишь несколько анализов эндогенного CETSA, ограниченных следующими лекарственными мишенями: p38a [69], тимидилатсинтаза [70], и андрогенный рецептор [71]. Представленные здесь данные, могут расширить описанные анализы CETSA, включая дополнительную лекарственную мишень CAIX. Изоформа hCAIX сверхэкспрессируется в различных солидных опухолях человека, где играет критическую роль в регуляции подкисления внеклеточной опухоли, пролиферации и прогрессирования. Следовательно, данный фермент рассматривается в качестве мишени для различных противоопухолевых стратегий.

В ходе проделанной работы, мы стремились оценить целевое взаимодействие библиотеки соединений с hCAIX в клеточной линии эмбриональных почек человека HEK 293, стабильно экспрессирующей CAIX-GFP. Такие подходы с репортерным геном устраняют потребность в высококачественных антителах против интересующей мишени.

2.1 Определение температуры плавления белка интереса

Перед запуском CETSA на белке CAIX в клеточной линии необходимо построить кривую плавления (охватывающую широкий диапазон температур) в отсутствие каких-либо стабилизирующих лигандов, для определения кажущейся температуры плавления (T_m) интересующего белка.

Кривая плавления была основана на измеренных уровнях флуоресценции при градиенте температур в диапазоне от 37 до 65 °C. Получен профиль термической денатурации рекомбинантного белка CAIX-GFP (рисунок 12). Высокая флуоресценция при комнатной температуре указывает на хорошо свернутый белок. Излучение флуоресценции уменьшается с повышением температуры, что приводит к появлению сигмоидальной кривой, которая представляет разворачивание белка. Постпиковая агрегация комплекса CAIX-GFP приводит к подавлению сигнала флуоресценции.

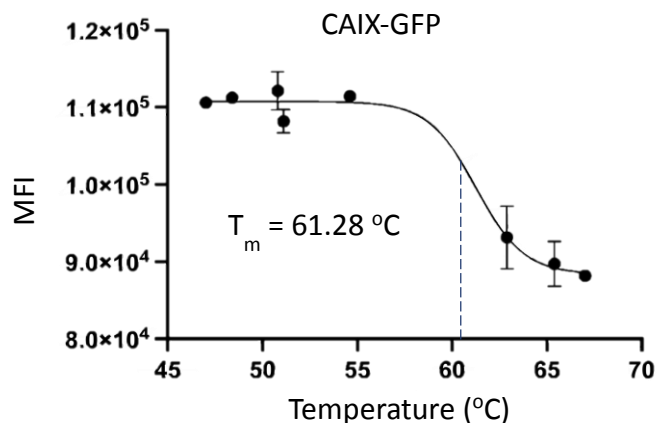


Рисунок 12 – Кривые плавления белка в клеточной линии

Обработка кривых термической денатурации привела к определению температуры плавления CAIX-GFP, или T_m , равной 61.28 °C, которая возникает в средней точке разворачивающегося перехода.

2.2 Оптимизация условий и скрининг лигандов

Термическая стабильность карбоангидразы CAIX, как описывалось выше, контролируется с помощью оценки уровня флуоресценции GFP, которая сильно гасится при разворачивании белка интереса, влияя на периферию флуоресцентного белка.

На предмет ингибиторной активности в отношении изоформы CAIX была рассмотрена библиотека со структурно разнообразным набором первичных сульфонамидов на основе азолов или, в более широком смысле, цинк связывающих соединений (рисунок 13).

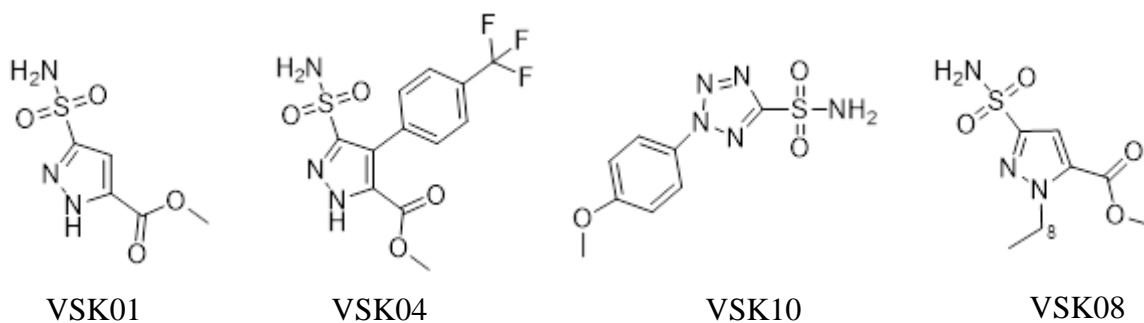


Рисунок 13 – Структуры исследуемых соединений

По результатам оптимизации условий CETSA для CAIX-GFP (приложение А), протоколом для обработки образца является 3-минутный нагрев суспензии клеток, обработанных ДМСО/исследуемыми соединениями, при 67 °С с прямым охлаждением в термоциклере до 4 °С (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты СЕТSA при 3-минутном нагреве

Соединение	Температура			
	37 °C		67 °C	
	Mean FITC-A	Median FITC-A	Mean FITC-A	Median FITC-A
Контроль (ДМСО)	127195.5	104633.8	103519.0	84517.1
	125846.7	104633.8	103308.6	84906.1
	122618.8	102262.0	106914.2	87505.2
VSK01	122554.2	101206.6	101170.8	82360.4
	122085.5	101328.8	100834.5	82095.5
	122755.1	100674.9	101087.7	83405.1
VSK04	123018.6	101538.5	104608.1	85292.7
	124028.6	100933.6	99569.2	81260.1
	123440.9	101154.0	101579.3	83150.3
VSK07	120306.8	97317.2	101658.7	83574.6
	117364.5	96983.8	100714.4	83803.5
	119832.1	99180.0	100467.2	82902.8
VSK08	112411.9	91838.7	96842.9	81009.5
	111822.9	92940.7	96772.2	78349.5
	112841.7	91870.8	95699.6	78673.3
VSK09	120091.4	99031.9	102455.5	84343.6
	119145.8	98751.3	105111.3	86396.3
	122386.6	101930.7	103456.0	85050.4
VSK10	119989.5	97682.0	106115.0	87511.2
	121322.9	98751.3	103255.0	84054.6
	120869.4	101930.7	103308.5	84024.5
VSK12	117954.4	96567.8	103805.5	85908.5
	121202.4	100686.1	101265.4	82539.0
	123458.5	100907.0	104076.8	85564.4
VSK13	119595.0	98897.4	102837.4	85015.4
	121594.1	100913.0	104124.7	85024.7
	120810.2	98065.3	102774.7	85283.2
VSK14	118614.8	96845.2	104173.5	84562.3
	118961.1	98767.9	102411.4	84235.6
	122158.4	100611.3	106421.3	85631.5
VSK15	118764.8	95667.0	100762.8	83217.4
	119143.1	98734.0	101736.3	82909.2
	121431.4	98724.6	103711.5	84184.4
Отрицательный контроль	126957.3	102744.3	103564.5	85971.0
	124986.7	104822.4	103978.6	84832.2
	127518.4	102352.2	104125.6	83451.6

Сопоставление сигналов флуоресценции CAIX-GFP при нативных условиях (37 °C) и при нагреве (67 °C) указывает на наличие связывающих способностей контрольных лигандов, которое проявляется в снижении стабильности белка-мишени, для всех соединений наблюдался одинаковый аналитический сигнал - дестабилизация лигандом белка (таблица 4). Графики

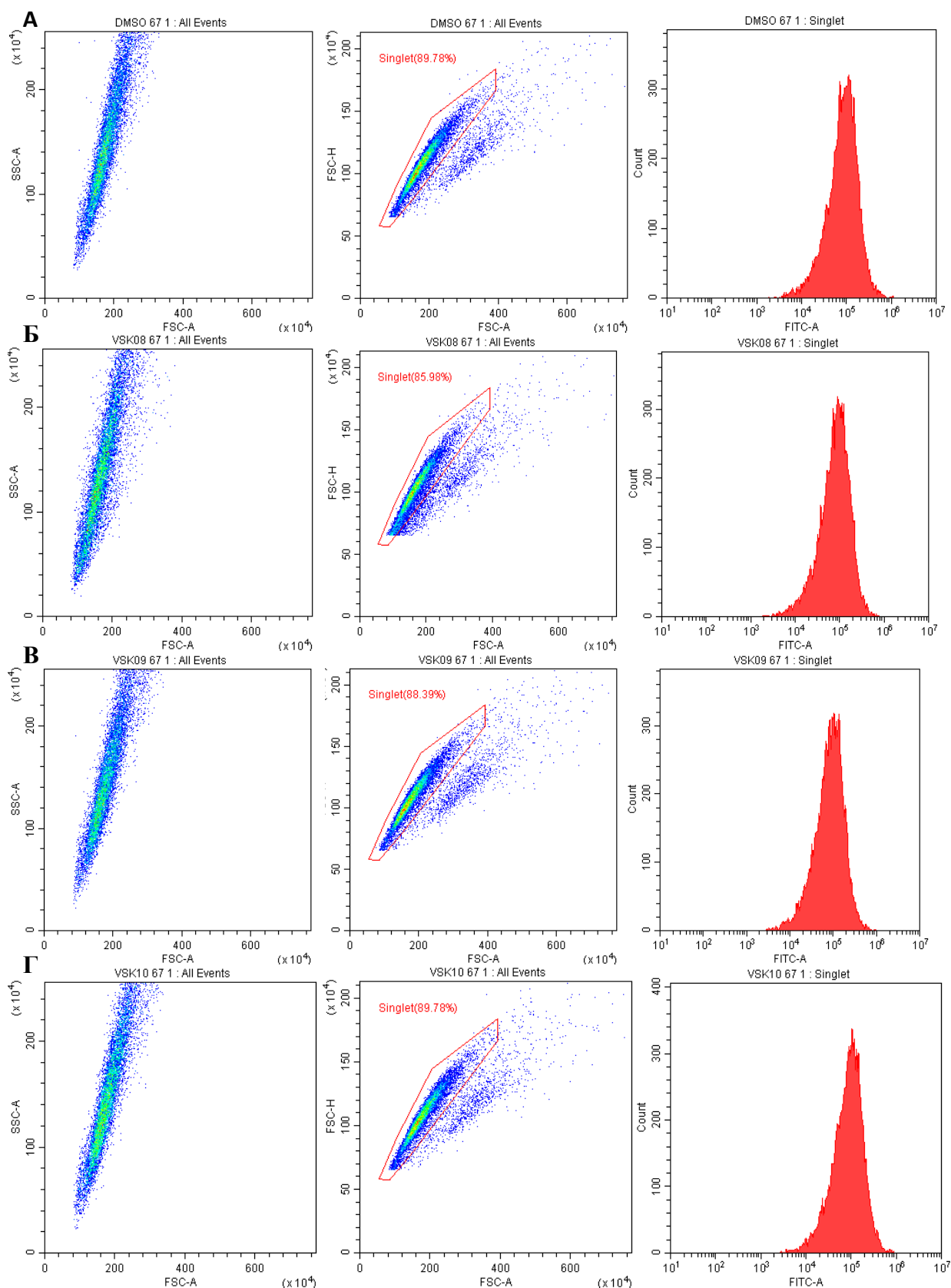
FSC и SSC обеспечили приблизительную визуализацию клеток на основе морфологии и светорассеяния, тем самым позволили работать с синглетной популяцией клеток, исключая из анализа скопления, которые могут содержать нежелательные популяции, приводя к неточным результатам (рисунок 14).

Таблица 4 – Результаты % стабилизации от контроля для CETSA при 3-минутном нагреве

Соединение	T=37 °C	Время 3 мин, T = 67 °C		
	Mean FITC-A	Mean FITC-A	% Стабилизации от контроля	K _i (nM), hCAIX
DMCO	126387.0	104580.6		
VSK01	122464.9	101031.0	98.3	9.6
VSK04	123496.0	101585.5	100.7	62.5
VSK07	121834.5	100946.8	95.8	8.9
VSK08	112358.8	96438.2	73.1	193.5
VSK09	120541.3	103674.3	77.4	236.2
VSK10	120727.3	104226.2	75.7	7.7
VSK12	120871.8	103048.2	81.7	7.1
VSK13	120666.4	103245.6	79.9	6.7
VSK14	119911.4	103292.4	76.2	8.5
VSK15	119779.8	102070.2	81.2	4.3
Отрицательный контроль	126489.5	103305.6	99.6	

^a Значения K_i получены как среднее между тремя измерениями с использованием метода остановленной струи (ошибки находились в диапазоне ±5-10 % от зарегистрированных значений)

Кроме того, отрицательный контроль показал температуру плавления, аналогичную температуре DMCO, что указывает на надежность анализа. Впоследствии были проведены несколько анализов клеточного термического сдвига (приложение А), собраны сигналы флуоресценции для того же набора соединений при различных температурах нагрева и времени.



А - образец с ДМСО, Б - образец с VSK08, В - образец с VSK09, Г - образец с VSK10
 Все результаты получены при 67 °С

Рисунок 14 – Данные проточной цитометрии после термической обработки

Для проверки клеточной активности, исследуемые соединения подвергали анализу МТТ в клетках НЕК 293, результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Средние значения выживаемости и их стандартные отклонения для исследуемых соединений

Соединение	Выживаемость клеток, %
VSK01	98.4 ± 4.5
VSK04	106.4 ± 3.9
VSK07	104.7 ± 4.4
VSK08	74.2 ± 9.1
VSK09	101.9 ± 4.3
VSK10	104.4 ± 5.3
VSK12	100.7 ± 4.4
VSK13	103.7 ± 5.3
VSK14	102.9 ± 5.1
VSK15	104.7 ± 3.3
Отрицательный контроль	105.8 ± 8.3

Исследование на цитотоксичность против клеточной линии показало, что лишь одно из рассматриваемых соединений (VSK08) подавляет клеточную активность больше, чем на 20 % при концентрации 10 мкМ, остальные соединения такого эффекта не проявляли.

В подтверждение этому также представлены результаты анализа данных проточной цитометрии, где, основываясь на прямом и боковом рассеянии, после инкубации с VSK08 была замечена новая популяция клеток НЕК 293 с измененной морфологией, имеющая меньший уровень прямого рассеяния, находящаяся в нижнем левом углу графика (рисунок 15).

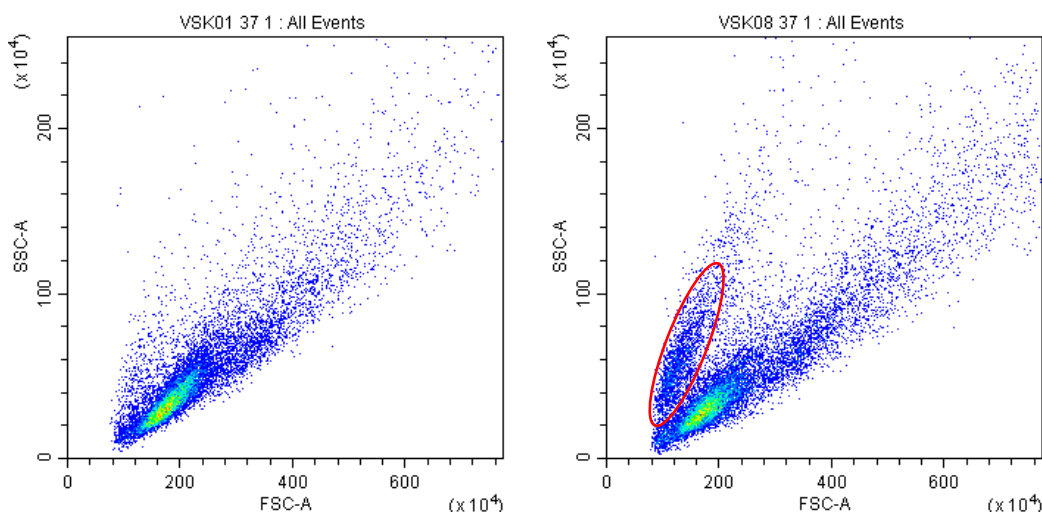


Рисунок 15 – Диаграмма прямого и бокового светорассеяния

Таким образом, в этом исследовании мы продемонстрировали подход CETSA в клеточной линии эмбриональных почек человека, обработанных ингибиторами CAIX. Выполняя сравнительный анализ с результатами кинетического анализа методом остановленной струи (K_i) с использованием очищенного белка, наблюдалась хорошая корреляция результатов CETSA для многих производных сульфонамидов, в подтверждении того, что все соединения проницаемы для клеток и поражают мишень в физиологической среде.

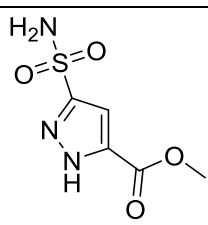
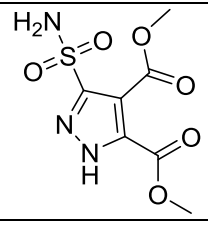
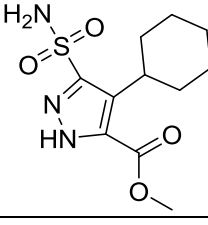
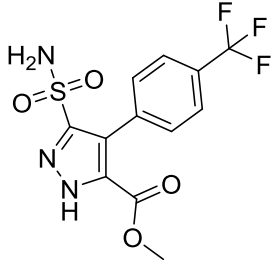
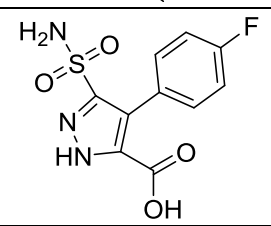
Так же присутствуют небольшие отклонения результатов в рассматриваемых системах. Обработка клеток VSK08 привела к ложноположительным результатам, за счет цитотоксического эффекта этого соединения по отношению к HEK 293. Подтверждением неспособности VSK08 к образованию стабильного комплекса с CAIX являются также данные (K_i). Помимо этого, наблюдалось снижение активности соединений (VSK01, VSK15) в CETSA. Возможные объяснения таких наблюдений могут заключаться в проницаемости соединений для клеток, стабильности в клеточной среде или внутриклеточной среде, в скорости оттока клеток или внутриклеточном связывании без индукции термостабилизации, что является ложноотрицательным результатом CETSA.

3 Экспериментальная часть

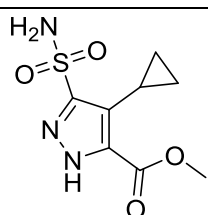
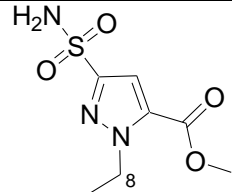
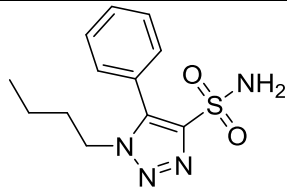
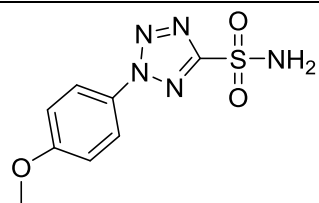
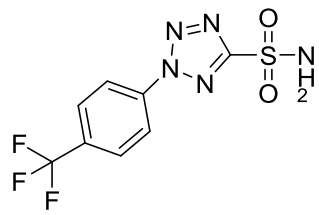
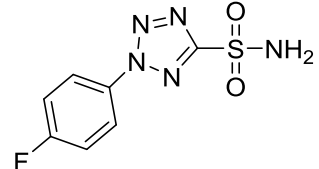
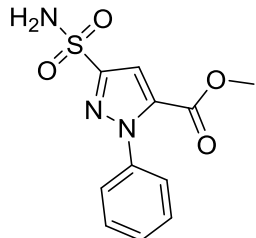
3.1 Объект исследования

В качестве объектов исследования были взяты соединения, структура которых представлена в таблице 6. Библиотека включает структурно разнообразный набор первичных сульфонамидов на основе азолов или, в более широком смысле, цинк связывающих соединений.

Таблица 6 – Характеристики исследуемых образцов

ID	Структура	K _i (nM)			
		hCAI	hCAII	hCAIX	hCAXII
VSK01		122.1	65.6	9.6	29.9
VSK02		778.9	50.4	77.4	53.0
VSK03		6523	612.2	10.2	59.3
VSK04		>10000	52.3	62.5	151.2
VSK05		8852	9.2	33.8	36.5

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6
VSK07		471.1	7.3	8.9	11.3
VSK08		913.3	12.8	193.5	9.5
VSK09		>10000	486.9	236.2	323.9
VSK10		82.8	6.9	7.7	13.9
VSK12		89.3	4.7	7.1	7.9
VSK13		95.1	11.6	6.7	5.5
VSK15		375.2	527.6	4.3	6.3

3.2 Оборудование и материалы

В данной работе для проведения биологических испытаний использовались следующие оборудования: ламинарный бокс (SafeFAST Elite, Italy), CO₂-инкубатор (BINDER, Germany), инвертированный микроскоп (ZEISS, Germany), автоматический счетчик клеток (TC20 Bio-Rad, USA), планшетный ридер (Promega, USA), автоматический дозатор (Eppendorf, Germany), микродозатор (Eppendorf, Germany), проточный цитометр CytoFLEX LX (Beckman Coulter, USA), термоциклер (T100 Bio-Rad, USA).

Материалы: культуральный флакон с обработанной поверхностью T75 (Eppendorf, Germany); 6-ти луночные планшеты для адгезивных культур (Eppendorf, Germany); наконечники для микродозатора на 10 и 300 мкл (Vertex, USA); серологические пипетки на 5, 10, 50 мл (Eppendorf, Germany); центрифужные пробирки на 15 мл (Eppendorf, Germany); пробирки для проточной цитометрии на 2 мл (Eppendorf, Germany).

3.3 Культивирование клеток

Клеточная линия HEK293 была получена из Американской коллекции тканевых культур (ATCC). Клетки культивировали в питательной среде DMEM (Gibco, UK), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки FBS (Gibco, UK), пенициллин (100 МЕ/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и GlutaMax (2 мМ, Gibco, UK). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95% воздуха/5% CO₂ при 37 °C. Клеточные монослои в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express (Gibco, UK) в фосфатно-солевом буфере (PBS, Carlsberg Scientific, Germany) и трижды промывали PBS. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению красителя (трипанового синего).

3.4 Методика эксперимента

3.4.1 Получение клональных клеточных линий

Клеточная линия НЕК293 культивировалась в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 5% концентрации углекислого газа. Пассаж клеток происходил каждые 3-4 дня с плотностью посева 4×10^4 клеток/мл.

Подготовка клеток к трансфекции включала в себя процесс трипсинизации и подсчета. Трансфекцию выполняли с использованием соотношения 1:3 плазмидной ДНК CA9-tGFP-меченая (Origene, USA) и реагента для трансфекции FuGENEHD (Promega, USA) в базальной среде Opti-MEM I. За день до трансфекции клеточную линию пересадили в 6-луночный планшет в количестве 5×10^5 клеток на лунку, инкубировали при 37 °C и 5% содержанием CO₂ в течении ночи. Конструкцию для трансфекции получали разведением 1 мкг плазмидной ДНК в 250 мкл базальной среды Opti-MEM I, последовательно вносили 3 мкл FuGENEHD, инкубировали 15 минут при комнатной температуре, после полученную смесь вносили в лунки с клетками, инкубируя при 37 °C, через 24 часа после трансфекции заменили исходную на полную питательную среду. Отбор трансфицированных клеток производили при помощи препарата селекции G-418: адгезивные клетки трипсинизировали и пересаживали в нескольких различных разведениях в среде с G-418 (500 мкг/мл) в целях масштабирования.

Далее следовал этап клонирования клеток с разведением. Клетки трипсинизировали для получения суспензии единичных клеток (10 кл/мл), пересаживали в 96-луночные планшеты с учетом достижения низкой плотности клеток в одной лунке, инкубировали в среде, содержащей препарат селекции, до формирования колоний. Гомоколонии подвергались масштабированию, с оценкой уровня экспрессии CA9-tGFP-tagged при помощи проточной цитометрии.

3.4.2 Анализ клеточного теплового сдвига

Влияние тестируемых соединений на термостабильность белка-мишени определяли методом анализа клеточного теплового сдвига (CETSA) с использованием полученной клеточной линии, экспрессирующей *CA9-tGFP*.

Суспензию исследуемых клеток в питательной среде инкубировали в с испытываемыми соединениями (5 мкл) и контрольным DMSO (5 мкл) в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂, концентрация клеток составляла 10⁶ кл/пробирку. Далее по 100 мкл клеточной суспензии переносили в планшеты для ПЦР, каждое соединение тестировали в трипликатах. Использовали линейный градиент от 37-62°C с шагом 3°C. Количественную оценку флуоресценции GFP определяли с помощью проточного цитометра. Детекцию проводили в каналах FITC (488-нм лазер, полосовой фильтр 525/50 нм – GFP). Первичную обработку данных проводили с помощью программного обеспечения CytExpert.

3.4.3 МТТ-тест

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность раковых клеток определяли с помощью колориметрической оценки метаболической активности клеток с использованием красителя бромида 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия (МТТ-тест). Аликвоты с концентрацией 5×10³ клеток на 200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета (Eppendorf, Германия) и инкубировали в течение 24 часов. На следующий день клетки обрабатывали исследуемыми соединениями и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. После инкубации клетки обрабатывали 40 мкл раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, 5 мг/мл в PBS) и инкубировали 4 часа. После этого среду с МТТ удаляли и добавляли 150 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Планшеты перемешивали на шейкере в течение 10 минут. Оптическую плотность каждой лунки определяли при 560 нм с помощью микропланшетного ридера GloMax® Multiþ (Promega, США).

Заключение

Оценка связывания соединения с нативными белками-мишенями в живых клетках крайне желательна на всех этапах разработки лекарственных соединений. Однако изучение белков и их взаимодействий в физиологической среде считается сложной задачей.

В работе рассмотрен и воспроизведен биофизический метод – анализ клеточного теплового сдвига (CETSA). Здесь сообщается о применении CETSA для выявления сродства библиотеки соединений к внутриклеточному связыванию с CAIX. Ряд проведенных экспериментов позволяют рассчитать % стабилизации от контроля для оценки внутриклеточного сродства лиганд-рецептор, измеренного в живых клетках, сохраняя при этом вышеупомянутые преимущества технологии CETSA, а именно физиологически релевантную систему без применения антител.

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

- получена клональная клеточная линия HEK293, стабильно экспрессирующая CAIX-GFP;
- проведен анализ клеточного теплового сдвига (CETSA) на клеточной линии HEK293, стабильно экспрессирующей CAIX-GFP;
- получены корреляции сигнала флуоресценции с ингибирующей способностью исследуемых соединений. Наличие связывающих способностей контрольных лигандов проявлялось в снижении стабильности белка-мишени.

По причине того, что изначально работа велась с ограниченной выборкой соединений, возникла сложность в оценке применимости данного метода. В дальнейшем работа будет направлена на расширение этого экспериментального исследования для изучения его применимости в определении внутриклеточной аффинности связывания с включением значительно расширенной выборки соединений (с аффинностью от 0,1 до 1000 нМ) для установления закономерности на более глубоком уровне.

Список используемой литературы

1. Ciulli A. Biophysical screening for the discovery of small-molecule ligands // *Methods in Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 1008. – P. 357-388.
2. Angeli A. et al. Inhibition of α -, β -, γ -, δ -, ζ - and η -class carbonic anhydrases from bacteria, fungi, algae, diatoms and protozoans with famotidine // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 34. – № 1. – P. 644-650.
3. McDevitt M., Lambert L. Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – Vol. 1814. – № 12. – P. 1854-1861.
4. Zamanova S. et al. Carbonic anhydrases as disease markers // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2019. – Vol. 29. – № 7. – P. 509-533.
5. Ondriskova E. Tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII // *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts*. – 2015. – P. 169-205.
6. Ilies M., Winum J. Carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of tumors: Therapeutic, immunologic, and diagnostic tools targeting isoforms IX and XII // *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target*. Elsevier Inc. – 2019. – Vol. 2. – P. 331-365.
7. Alterio V. et al. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – № 38. – P. 16233-16238.
8. Whittington D. et al. Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 17. – P. 9545-9550.
9. Alterio V. et al. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms? // *Chemical Reviews*. – 2012. – Vol. 112. – № 8. – P. 4421-4468.

10. Patel Saroor A.; Vanharanta, Sakari. Epigenetic determinants of metastasis // *Molecular Oncology*. – 2016. – Vol. 11. – P. 79-96.
11. Thorsten C., Schmitt C. The role of pH regulation in cancer progression // *Metabolism in Cancer*. – 2016. – Vol. 207. – P. 93-134.
12. Paredes F. et al. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer // *Cancer Letters*. – 2021. – Vol. 502. – P. 133-142.
13. Becker H. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer // *British Journal of Cancer*. – 2020. – Vol. 122. – P. 157-167.
14. Pastorekova S., Gillies R. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond // *Cancer Metastasis Rev. Cancer and Metastasis Reviews*. – 2019. – Vol. 38. – № 1–2. – P. 65-77.
15. Supuran C. Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2008. – Vol. 7. – № 2. – P. 168-181.
16. Orłowski A. et al. Binding of carbonic anhydrase IX to extracellular loop 4 of the NBCe1 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter enhances NBCe1-mediated HCO_3^- influx in the rat heart // *AJP: Cell Physiology*. – 2012. – Vol. 303. – № 1. – P. 69-80.
17. Tureci O. et al. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95. – № 13. – P. 7608-7613.
18. Ivanov S. et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95. – № 21. – P. 12596-12601.
19. Watson P. et al. Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma // *British Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 88. – № 7. – P. 1065–1070.

20. Tonissen K., Poulsen S. Carbonic anhydrase XII inhibition overcomes P-glycoprotein-mediated drug resistance: A potential new combination therapy in cancer // *Cancer Drug Resist.* – 2021. – Vol. 4. – № 2. – P. 343-355.

21. Nocentini A., Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review (2008-2018) // *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* – 2018. – Vol. 28. – № 10. – P. 729-740.

22. Singh S. Cancer drug development of carbonic anhydrase inhibitors beyond the active site // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23. – № 5. – P. 1045-1052.

23. Supuran, C. T. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* – 2015. – Vol. 31. – P. 345-360.

24. Maresca A. Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors // *Journal of the American Chemical Society.* – 2009. – Vol. 131. – № 8. – P. 3057-3062.

25. Eldehna W. et al. Discovery of 2,4-thiazolidinedione-tethered coumarins as novel selective inhibitors for carbonic anhydrase IX and XII isoforms // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* – 2022. – Vol. 37. – № 1. – P. 531-541.

26. Kurt B. et al. Synthesis, biological activity and multiscale molecular modeling studies of bis-coumarins as selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors with effective cytotoxicity against hepatocellular carcinoma // *Bioorganic Chemistry.* – 2019. – Vol. 87. – P. 838-850.

27. Bonardi A. et al. Structural investigations on coumarins leading to chromeno[4,3-c]pyrazol-4-ones and pyrano[4,3-c]pyrazol-4-ones: New scaffolds for the design of the tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2018. – Vol. 146. – P. 47-59.

28. Angeli A. et al. Heterocoumarins are selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors with cytotoxic effects against cancer cells lines // *ACS Medicinal Chemistry Letters.* – 2018. – Vol. 9. – № 9. – P. 947-951.

29. Dar'in D. et al. Investigation of 3-sulfamoyl coumarins against cancer-related IX and XII isoforms of human carbonic anhydrase as well as cancer cells leads to the discovery of 2-oxo-2H-benzo[h]chromene-3-sulfonamide – A new caspase-activating proapoptotic agent // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021. – Vol. 222. – № 15. – P. 113589.
30. Vullo D. et al. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2003. – Vol. 13. – № 6. – P. 1005-1009.
31. Krasavin M. Screening of benzenesulfonamide in combination with chemically diverse fragments against carbonic anhydrase by differential scanning fluorimetry // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 35. – № 1. – P. 306-310.
32. Pacchiano F. Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 54. – № 6. – P. 1896-1902.
33. Mboge M. et al. Inhibition of carbonic anhydrase using SLC-149: Support for a noncatalytic function of CAIX in breast cancer // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 65. – P. 171-174.
34. McDonald P. et al. A Phase 1 study of SLC-0111, a novel inhibitor of carbonic anhydrase IX, in patients with advanced solid tumors // *American Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 43. – № 7. – P. 484-490.
35. Pantoliano M. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery // *Journal of Biomolecular Screening*. – 2001. – Vol. 6. – № 6. – P. 429-440.
36. Dart M. et al. Homogeneous assay for target engagement utilizing bioluminescent thermal shift // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 9. – № 6. – P. 546-551.

37. Shoichet B. et al. A relationship between protein stability and protein function // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92. – № 2. – P. 452-456.
38. Coligan J. et al. Analysis of protein stability and ligand interactions by Thermal Shift Assay // *Current Protocols in Protein Science*. – 2001. – P. 28.9.1-28.9.14.
39. Waldron T., Murphy K. Stabilization of proteins by ligand binding: application to drug screening and determination of unfolding energetics // *Biochemistry*. – 2003. – Vol. 42. – № 17. – P. 5058-5064.
40. Moreau M. et al. Rapid determination of protein stability and ligand binding by differential scanning fluorimetry of GFP-tagged proteins // *RSC Advances*. – 2012. – Vol. 2. – № 31. – P. 11892.
41. Matulis Daumantas. Carbonic anhydrase as drug target (Thermodynamics and Structure of Inhibitor Binding) // *Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrases by Fluorescent Thermal Shift Assay*. – 2019. – Vol. 2. – № 31. – P. 63-78.
42. Martinez Molina D. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the Cellular Thermal Shift Assay // *Science*. – 2013. – Vol. 341. – № 84. – P. 84-87.
43. Friedrich R. et al. Thermal proteome profiling monitors ligand interactions with cellular membrane proteins // *Nature Methods*. – 2015. – Vol. 12. – P. 1129-1131.
44. Martinez N. et al. A widely-applicable high-throughput cellular thermal shift assay (CETSA) using split Nano Luciferase // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 9472.
45. Henderson M. et al. High-Throughput Cellular Thermal Shift Assays in research and drug discovery // *SLAS discovery: advancing life sciences R & D*. – 2019. – Vol. 25. – № 2. – P. 137-147.
46. Paulmurugan R., Gambhir S. Monitoring protein–protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation // *Analytical Chemistry*. – 2003. – Vol. 75. – № 7. – P. 1584-1589.

47. Dixon A. et al. NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells // *ACS Chemical Biology*. – 2016. – Vol. 11. – № 2. – P. 400-408.
48. Feng S. et al. Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 370.
49. Telford W. et al. Flow cytometry of fluorescent proteins // *Methods*. – 2012. – Vol. 57. – № 3. – P.
50. Shapiro H. *Practical flow cytometry* // New York: Wiley-Liss, – 1995. – Vol. 3. – P. 445-516.
51. Wlodkowic D. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death // *Recent Advances in Cytometry, Part B*. – 2017. – Vol. 103. – № 1. – P. 55-98.
52. Darzynkiewicz Z. et al. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis // *Seminars in Hematology*. – 2001. – Vol. 38. – № 82. – P. 193.
53. Ambrus E. Flow cytometry-based apoptosis detection // *Methods in Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 559. – № 2. – P. 19-32.
54. Alfonso B. et al. *Flow Cytometry* // *Comprehensive Biotechnology*. – 2011. – Vol. 1. – P. 541-560.
55. Chapman G. Instrumentation for flow cytometry // *Journal of immunological methods*. – 2000. – Vol. 243. – P. 3-12.
56. Macey M. et al. Flow cytometric analysis of the functional ability of neutrophils from patients with autoimmune neutropenia // *Journal of Microscopy*. – 1999. – Vol. 159. – № 3. – P. 277-283.
57. Shaner N. et al. A guide to choosing fluorescent proteins // *Nature Methods*. – 2005. – Vol. 2. – № 12. – P. 905-909.
58. Chalfie M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // *Science*. – 1994. – Vol. 263. – № 5148. – P. 802-805.
59. Veena K. et al. Solid state yellow and orange lasers for flow cytometry // *Cytometry Part A*. – 2008. – Vol. 73. – № 6. – P. 570-577.

60. Horiuchi Y. et al. Frame-insensitive expression cloning of fluorescent protein from *Scolionema suvaense* // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 2. – P. 371.
61. Levy J. In Vivo retroviral transduction and expression of green fluorescent protein // *Methods in Enzymology*. – 1999. – Vol. 302. – № 30. – P. 358-369.
62. Perfetto S., Roederer M. Increased immunofluorescence sensitivity using 532 nm laser excitation // *Cytometry Part A*. – 2007. – Vol. 71. – № 2. – P. 73-79.
63. Kapoor V. et al. Solid state yellow and orange lasers for flow cytometry // *Cytometry Part A*. – 2008. – Vol. 73. – № 6. – P. 570-577.
64. Alberts B. et al. *Molecular biology of the cell* // Garland Science. – 2012. – 5 ed. – P. 1086-1093.
65. Wachtel P. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry // *Cell Death and Disease*. – 2012. – Vol. 11. – № 3. – P. 430.
66. Stoddart M. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes // *Mammalian Cell Viability*. – 2011. – Vol. 740. – P.57-63.
67. Roisin A. et al. The fluorescent protein stability assay: An efficient method for monitoring intracellular protein stability // *BioTechniques*. – 2021. – Vol. 70. – № 6. – P. 337-344.
68. Shiber A., Breuer W. Flow cytometric quantification and characterization of intracellular protein aggregates in yeast // *Prion*. – 2014. – Vol. 8. – № 3. – P. 276-284.
69. Jafari R. et al. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells // *Nature Protocols*. – 2014. – Vol. 9. – № 9 – P. 2100–2122.
70. Helena A. et al. CETSA screening identifies known and novel thymidylate synthase inhibitors and slow intracellular activation of 5-fluorouracil // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 11040
71. Shaw J. et al. Determining direct binders of the Androgen Receptor using a high-throughput Cellular Thermal Shift Assay // *Scientific Reports*. – Vol. 8. – № 1. – P. 163.

Приложение А
Результаты оптимизации CETSA

Таблица А.1 – Результат CETSA 1

Соединение	T=37 °C	Время 5 мин, T = 58 °C		
	Mean FITC-A	Mean FITC-A	% Стабилизации от контроля	K _i (nM), hCA IX
DMSO	179579,9	170332,8		
VSK01	173802,7	164388,9	101.8	9.6
VSK02	178285,7	165563,2	137.6	77.4
VSK03	175251,7	165708,6	103.2	10.2
VSK04	176814,2	163891,8	139.7	62.5
VSK05	177570,5	164448,1	141.9	33.8

Таблица А.3 – Результат CETSA 3

Соединение	T=37 °C	Время 7 мин, T = 60 °C		
	Mean FITC-A	Mean FITC-A	% Стабилизации от контроля	K _i (nM), hCA IX
DMSO	122499.9	114343.1		
VSK01	120072.7	107113.8	158.9	9.6
VSK02	119662.8	114059.5	68.8	77.4
VSK03	119992.2	106988.4	159.4	10.2
VSK04	116440.1	107095.2	114.6	62.5
VSK05	117740.3	105320.2	152.3	33.8

Таблица А.4 – Результат CETSA 4

Соединение	T=37 °C	Время 5 мин, T = 66 °C		
	Mean FITC-A	Mean FITC-A	% Стабилизации от контроля	K _i (nM), hCA IX
DMSO	115850.7	88743.6		
VSK01	114247.1	87071.6	100.3	9.6
VSK02	116207	90263.8	95.7	77.4
VSK03	118672.6	87253.3	115.9	10.2
VSK04	119648.4	88996.4	113.1	62.5
VSK05	119651.3	86465.8	122.4	33.8

Таблица А.5 – Результат CETSA 5

Соединение	T=37 °C	Время 3 мин, T = 67 °C		
	Mean FITC-A	Mean FITC-A	% Стабилизации от контроля	K _i (nM), hCA IX
DMSO	144059.6	112969.3		
VSK01	137837.9	111358.4	85.2	9.6
VSK02	139396.6	112833.6	85.4	77.4
VSK03	140992.6	110831.6	97.0	10.2
VSK04	141617.4	108621.6	106.1	62.5
VSK05	145621.4	109188.6	117.2	33.8

Таблица А.6 – Результат CETSA 6

Соединение	T=37 °C	Время 3 мин, T = 67 °C		
	Mean FITC-A	Mean FITC-A	% Стабилизации от контроля	K _i (nM), hCA IX
DMSO	117190.1	96960.5		
VSK01	112870.9	92123.23	102.6	9.6
VSK02	112651.5	96641.63	79.1	77.4
VSK03	112447.6	98319.73	69.8	10.2
VSK04	110490.9	98192.13	60.8	62.5
VSK05	114027.1	93578.67	101.0	33.8

Таблица А.7 – Результат CETSA 7

Соединение	T=37 °C	Время 3 мин, T = 67 °C		
	Mean FITC-A	Mean FITC-A	% Стабилизации от контроля	K _i (nM), hCA IX
DMSO	98525.67	80089.77		
VSK01	95066.53	78672.17	88.9	9.6
VSK02	96468.93	79231.57	93.5	77.4
VSK03	96791.5	79362.97	94.5	10.2
VSK04	97017.93	81197.57	85.8	62.5
VSK05	96117.17	79929.95	87.8	33.8