

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 Скрининг ингибиторов RNF-4

Обучающийся

М. И. Демидов

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

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)

Аннотация

Выпускная квалификационная работа состоит из 49 страниц, содержит 3 таблицы и 17 рисунков. Список литературы включает в себя 49 источников.

Целью данной выпускной квалификационной работы является поиск новых ковалентных ингибиторов RNF4 с применением анализа клеточного теплового сдвига (CETSA). Используемая тест-система позволяет оценить связывание соединений с нативным белком-мишенью в физиологической среде. Объектом исследования в представленной работе является библиотека со структурно разнообразным набором производных хлорацетамида. В литературном обзоре подробно изложен принцип используемого анализа CETSA, также были рассмотрены различные приложения анализа клеточного теплового сдвига в контексте поиска новых лекарственных средств за последние 10 лет. В заключительной части литературного обзора уделено внимание описанию RNF4 как участника протеосомной деградации и конструированию на ее основе PROTAC для целенаправленной деградации белков. В экспериментальной части описаны методики получения клональных клеточных линий, анализа теплового сдвига и биологических испытаний производных хлорацетамида. На основе проведенных экспериментов получена серия профилей термической денатурации белка RNF4 в присутствии исследуемых лигандов.

Abstract

The title of the graduation work is « Screening for RNF4 inhibitors».

The graduation work consists of an explanatory note, an introduction, three parts on 49 pages, contains 3 tables and 17 figures. The list of references includes 49 sources.

The aim of this work is to search for new covalent types of RNF4 ligase recruiters using the Cellular Thermal Shift Assay (CETSA). The test system used allows us to evaluate the binding of compounds to the native target protein in a physiological environment. The object of study in the presented work is a library with a structurally diverse set of chloroacetamide derivatives. The literature review details the principle of the CETSA assay used and examines the various applications of cellular thermal shift assays in the context of drug discovery over the past 10 years. In the final part of the literature review, attention is paid to the description of RNF4 as a participant in proteasomal degradation and the construction of PROTACs based on it for targeted protein degradation. The experimental part describes methods for obtaining clonal cell lines, thermal shift analysis and biological testing of chloroacetamide derivatives. Based on the experiments performed, a series of profiles of thermal denaturation of the RNF4 protein in the presence of the studied ligands was obtained.

Содержание

Введение.....	6
1. Литературный обзор	7
1.1 Анализ теплового сдвига как инструмент хемотреомики	7
1.2. Анализ клеточного теплового сдвига	8
1.3 Методы обнаружения белков после проведения CETSA	13
1.3.1 Методы детектирования, направленные на эндогенный белок	14
1.3.2 Методы детектирования с использованием репортерных систем	20
1.4 Роль RNF4 в убиквитинировании и протеасомной деградации.....	26
2. Результаты и их обсуждение.....	28
2.1 Конструкция плазмиды RNF4-NanoLuc	29
2.2 Определение температуры плавления белка интереса	33
2.3 Скрининг ингибиторов RNF4	34
3. Экспериментальная часть.....	37
3.1 Оборудование и материалы	37
3.2 Культивирование клеток	38
3.3 Получение плазмид.....	38
3.4 Транзиентная трансфекция	39
3.5 Анализ клеточного теплового сдвига	40
Заключение	42
Список используемых источников.....	43

Определения, обозначения и сокращения

В данной работе используются следующие термины с соответствующими определениями:

АТФ	аденозинтрифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛС	лекарственное средство
РНК	рибонуклеиновая кислота
ADMET	всасывание, распределение, метаболизм, выведение и токсичность в фармакокинетике
CDK	циклинзависимая киназа
SETSA	клеточный анализ теплового сдвига
CMV	цитомегаловирус
GFP	зеленый флуоресцентный белок
HTS	высокопроизводительный скрининг
LDHA	лактатдегидрогеназа А
MetAP2	метионинаминопептидаза-2
PDB	банк данных белковых структур
POI	белок интереса
R&D	исследование и разработка
RNF4	Really Interesting New Gene Finger Protein 4
SUMO	малый убиквитин-подобный модификатор
TSA	анализ теплового сдвига

Введение

Белки являются мишенями для большинства лекарств и участвуют во множестве клеточных процессов. Однако изучение белков и их взаимодействий в живых клетках и тканях является довольно сложной задачей. Современные подходы рационального создания лекарств предполагают достаточно хорошее понимание характера взаимодействий между химическим соединением и биологической мишенью [1], а также расчет энергетических параметров этого связывания. Это достигается при помощи методов хемопротеомики как в виде биохимических анализов, так и молекулярного моделирования. К настоящему времени разработано большое разнообразие подходов со своими преимуществами и недостатками, однако все они стремятся к минимизации затрат и повышению эффективности одного из самых первых этапов разработки лекарственных средств.

Одним из таких методов является клеточный анализ теплового сдвига, который позволяет измерять взаимодействие соединений с мишенями в интактных клетках. Это довольно простой в обращении подход для энергетической оценки связывания, что в конечном итоге позволяет судить об аффинности изучаемого лиганда. Кроме того, данный вид анализа оказывается довольно удобным в контексте поиска лигандов, для создания химерных соединений, нацеленных на протеолиз (PROTAC).

Клеточный анализ теплового сдвига удовлетворяет нынешним запросам медицинской химии. Скрининг CETSA может проводиться в высокопроизводительном формате [2], а специфика самого анализа позволяет получать данные, которые довольно точно соответствуют реальным процессам, происходящим в клетках и тканях при патологии.

1 Литературный обзор

1.1 Анализ теплового сдвига как инструмент хемопротеомики

По мере того как индустрия здравоохранения приближается к системной биологии и точной медицине, всестороннее профилирование взаимодействий малых молекул с белками становится все более важным. Анализ теплового сдвига (TSA) как метод хемопротеомики позволяют решить эту задачу [3]. Суть метода заключается в измерении изменения температуры денатурации белка, связанного с лигандом, по сравнению со свободным белком. Основной идеей является тот факт, что комплекс белка с малой молекулой, обладает большей устойчивостью к температурной денатурации чем несвязанный белок и, исходя из полученных значений разницы температур, можно судить об аффинности лиганда и устойчивости системы в целом (рисунок 1).

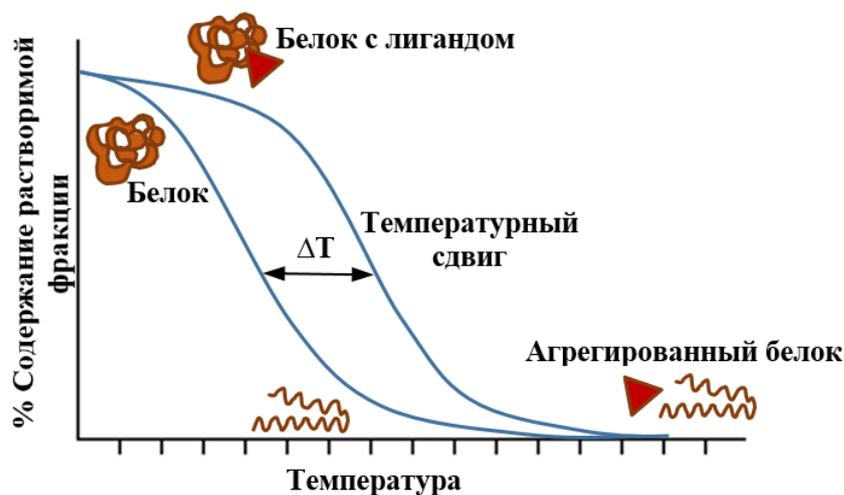


Рисунок 1 – Принцип анализа термического сдвига

В типичном протоколе TSA одна часть белоксодержащих образцов подвергается воздействию выбранного лиганда, а другая часть остается в виде контроля. Затем эти образцы отбираются на аликвоты и нагреваются до определенных температур. После нагревания количество оставшегося

неденатурированного белка анализируют с помощью методов количественной протеомики и строят кривые устойчивости. Ожидается, что при сравнении обработанных лигандом образцов с контролем кривая стабильности сместится вправо, что указывает на то, что произошла стабилизация, индуцированная лигандом.

Исторический след концепции TSA прослеживается до исследований Джона Шелмана [4], в которых рассматривается макромолекулярное связывание с точки зрения термодинамики и работ по термостабильности таких модельных белков как лизоцим и овальбумин куриного яйца [5]. В общем виде, данный метод анализа стал возможен благодаря изучению механизма денатурации белков и их структурной организации.

В настоящее время, анализ теплового сдвига тесно связан с термическим профилированием протеома (TPP), которое позволяет определять наличие того или иного белка в клетке используя свойство белков к индуцированной термостабилизации. Валидация связывания чаще всего проводится при помощи флуориметрии, либо статического светорассеяния [6], однако с появлением масс-спектрометров Orbitrap с высоким разрешением появилась возможность проводить эксперименты такого типа в масштабе всего протеома, а кривые стабильности генерировать для тысячи белков одновременно. Термическое профилирование протеома было успешно выполнено *in vitro*, *in situ* и *in vivo* [7].

1.2 Анализ клеточного теплового сдвига

Следующим витком в развитии TSA стала адаптация этого анализа для клеточных линий. Впервые подобный протокол был описан Пэром Нордлундом и его коллегами в работе [8], посвященной изучению взаимодействий лекарственного средства с мишенью в живых клетках. Авторы статьи отталкивались от актуальной проблемы – описания характера связывания лиганда и белковой мишени, которое происходит при

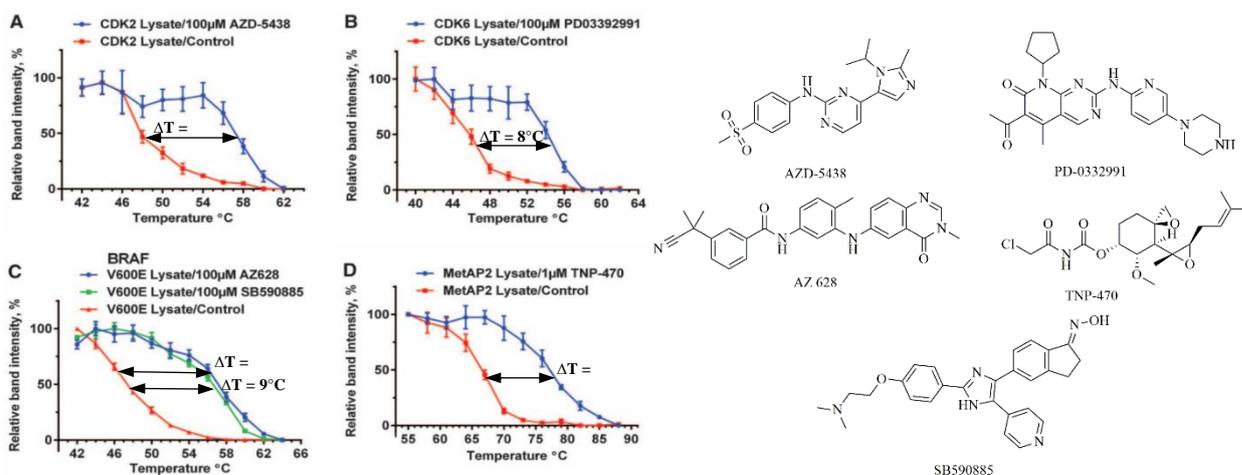
физиологических условиях. В результате был разработан метод оценки связывания лекарств с целевыми белками в образцах клеток и тканей. Поскольку эта процедура имеет концептуальное сходство с TSA, новая методика была названа анализом клеточного термического сдвига (CETSA).

В общем виде протокол CETSA начинается с того, что несколько аликвот клеточного лизата, предварительно обработанного исследуемыми веществами нагревались до разных температур (соответствующие температуры были определены в предварительных экспериментах). После охлаждения образцы центрифугировали для отделения растворимых фракций от осажденных белков. Затем количественно определяется присутствие целевого белка в растворимой фракции. Для этого супернатанты переносили в новые микропробирки и анализировали с помощью гель-электрофореза (SDS-PAGE) и последующего вестерн-блоттинга.

Используя этот анализ, было подтверждено связывание лекарственных средств с рядом важных клинических мишеней, а также он позволял отслеживать побочные эффекты и лекарственную устойчивость в раковых линиях клеток. В частности, были получены кривые CETSA (рисунок 2) для четырех терапевтических мишеней с соответствующими ингибиторами, измеренными в клеточных лизатах [8].

На графиках отчетливо виден сдвиг температуры, при которой происходит денатурация из чего можно сделать вывод, что выбранные для анализа соединения проявляют стабилизирующее действие на белковые мишени. Чтобы доказать результативность данного анализа авторами были выбраны такие соединения, для которых уже имелись данные по биологической активности. Например, используемый ингибитор метионинаминопептидазы-2 (MetAP2) TNP-470 находится в клинической разработке для использования в лечении солидных опухолей [9]. Данное соединение хорошо показывало себя в экспериментах на мышах, и полученная биологическая активность коррелирует со значениями CETSA. Подобные положительные результаты показаны и для ингибиторов CDK2, CDK6 и

BRAF. Кроме того, сравнительный анализ позволял оценить специфичность ингибиторов CDK по отношению к другим близкородственным белкам.



A – ингибитор CDK2; B – ингибитор CDK6; C – ингибиторы мутантной формы BRAF; D – ингибитор ангиогенеза

Рисунок 2 – Кривые плавления CETSА в клеточном лизате

Известно, что эффективная концентрация лекарства зависит от свойств под общим названием ADME, которые определяют фармакокинетику препарата [10]. Эти характеристики важны при разработке новых ЛС, однако существует комплексная проблема мониторинга регуляции белка и процессов ADME, которая вытекает из косвенных подходов измерения. Многие биохимические анализы предполагают не прямое наблюдение за интересующими процессами, а изучение последующих клеточных ответов. Следовательно, иногда может наблюдаться такая ситуация, что некоторые потенциальные лекарственные соединения не проходят расширенные клинические испытания. При выяснении причин отзыва препарата от дальнейших испытаний обнаруживается, что соединение кандидат не действуют на предсказанную биологическую мишень, либо действует совершенно другим образом внутри клеток [11]. Новый метод, представленный в статье [8] позволяет решить эту проблему и показывает

результаты, хорошо коррелирующие с исследованиями на животных модельных организмах при дальнейшей клинической разработке.

Помимо этого, существует несколько важных аспектов, которые требуется принимать во внимание при проведении CETSA. Для получения корректных данных следует провести проверку целостности клеток и клеточных мембран. В качестве стандартного теста используется обработка красителем – трипановый синий. Синий краситель проникает в клетки и окрашивает их только тогда, когда целостность клеточной мембраны теряется и образуются поры, тогда как клетки с интактными мембранами не насыщаются этим красящим веществом и остаются неокрашенными при микроскопическом осмотре. Также, этот тест позволяет установить температурный предел, при котором возможно проведение анализа CETSA. Полученные данные показывают, что большинство клеток не лизируются даже при высоких температурах (65–70 °C) (рисунок 3), т.к. количество клеток остается неизменным по сравнению с контрольными клетками, инкубированными при 37 °C. Эти данные подтверждают, что клеточные мембраны остаются интактными при температуре до 60–65 °C в зависимости от выбранной клеточной линии.

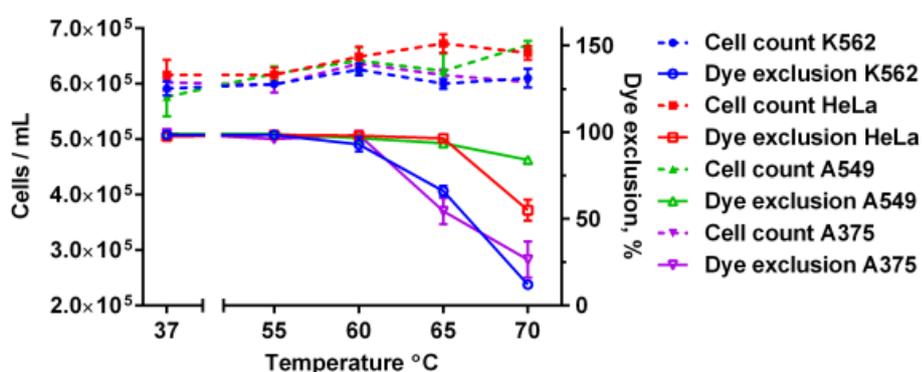


Рисунок 3 – Зависимость выживаемости различных клеточных линий от температуры

Так же, крайне полезно проводить проверку полученных данных путем нахождения корреляций со значениями параллельно проведенного обычного

анализа TSA. Для этого интересующий белок сверхэкспрессируют, очищают и проводят через протокол термического сдвига. В результате получают данные дифференциального статического светорассеяния (DSLС) и семейство функциональных кривых, которые сравнивают с подобными результатами, полученными после CETSA. Данная процедура позволяет оценить влияние клеточного лизата и оценить корреляцию двух методов. В работе Пэра Нордлунда [8] показана высокая степень наложения результатов от двух анализов при малых количествах лиганда. Однако при повышении концентрации соединений наблюдались расхождения, которые объяснялись связыванием белка и метаболическими процессами внутри клеток. Помимо этого, сильное влияние на величину сдвига оказывает характер соединения и выбранная клеточная линия.

Помимо изменения температуры CETSA также можно использовать для исследования влияния различных концентраций соединений, поддерживая постоянную температуру и изменяя дозы. Это называется изотермическим отпечатком «доза-реакция» (ITDRF CETSA). Было показано, что эксперименты вида «доза-реакция» дают абсолютные константы связывания только в конкретных случаях, когда может быть создана полностью обратимая система [12, 13]. Для идеально ведущих себя систем сдвига ITDRF начинаются выше температуры плавления. Однако многие белки выпадают в осадок при разворачивании; следовательно, система необратима и не находится в равновесии. Однако определенные температуры агрегации при высоких концентрациях соединения T_{agg} часто близки к температуре плавления T_m и могут использоваться в качестве относительной меры для ранжирования сродства [12, 13]. Когда система не находится в равновесии, кривые доза-реакция, основанные на измерениях T_{agg} или T_m , будут комплексными и основаны на множестве параметров. В этих случаях кривые «доза-реакция» будут более плавными; для достижения более явного ответа потребуются высокие концентрации соединений.

Таким образом, результатом проведенного анализа CETSA являются кривые термического плавления белков, в которых степень разворачивания измеряется с использованием либо флуориметрических подходов (DSF), либо методов статического светорассеяния (DLS) [14, 15]. Было показано, что температурные сдвиги при высоких концентрациях соединений коррелируют со значениями концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) и аффинностью, измеренными другими методами. Так же, очевидна практическая польза данного анализа для структурной биологии и при скрининге лекарств в широком диапазоне структурного разнообразия.

1.3 Методы обнаружения белков после проведения CETSA

Интерсно, что TSA традиционно применялся к очищенным белкам, где термически индуцированные изменения в структуре можно обнаружить с помощью собственной флуоресценции триптофана [16]. В пионерских работах команды Пэра Нордлунда [8] определение целевого белка в растворимой фракции клеточного лизата проводилось с помощью вестерн-блоттинга, метода с очень ограниченным динамическим диапазоном и производительностью. Однако, острая необходимость тотального ускорения и удешевления каждого этапа разработки лекарств [17] способствовала появлению высокопроизводительных методов CETSA (HT-CETSA). Недавние исследования [18] показали, что HT-CETSA можно проводить в стандартных 96-, 384- и 1536-луночных микротитровальных планшетах с использованием таких методов, как репортеры бета-галактозидазы, нанолуциферазы, а также анализы AlphaLISA.

После первоначального отчета были опубликованы другие эксперименты, описывающие профилирование протеома с помощью CETSA [19, 20] и применение этого метода к мембранным белкам [21] с использованием показаний масс-спектрометрии. Эти подходы расширили CETSA до полного протеома, включая мембранные белки, и описали методы,

которые давали информацию как о целевых, так и нецелевых взаимодействиях. В основном выделяют методы детектирования, направленные на эндогенный белок, либо на репортерный тег. Однако между ними существуют гибридные схемы, при которых сигнальную метку можно внедрить в эндогенный локус с помощью инструментов редактирования генома, таких как CRISPR/Cas9 [22, 23].

1.3.1 Методы детектирования, направленные на эндогенный белок

CETSA можно разделить на две общие категории, в которых анализ направлен либо на эндогенный белок, либо на белок, меченный репортером. Анализы, измеряющие эндогенные белки, более физиологически значимые, поскольку экспрессия регулируется из природного локуса, последовательность белка не модифицируется и могут быть приняты во внимание варианты, возникающие в результате альтернативного сплайсинга.

В качестве примера того, какие результаты может давать CETSA можно рассмотреть работу Шоу и его коллег [24], в которой исследовали целевое взаимодействие B-Raf при помощи анализа теплового сдвига в формате высокопроизводительного скрининга. Было идентифицировано 13 соединений из библиотеки 896 ингибиторов киназ, которые термически стабилизировали белок. Все 13 соединений ранее имели доказательства связывания B-Raf и были протестированы в нескольких концентрациях, чтобы получить значения pEC_{50} (таблица 1).

ITDRF CETSA показывает четкие доказательства взаимодействия как для уже описанных ингибиторов B-Raf – Дабрафениб, LY3009120, AZ628, Вемурафениб, PLX4720 и альтернативный аналог Вемурафениба (рисунок 4), так и для новых соединений, которые изначально разрабатывались против других биологических мишеней, а также позволяет предсказать значения полумаксимальной эффективной концентрации.

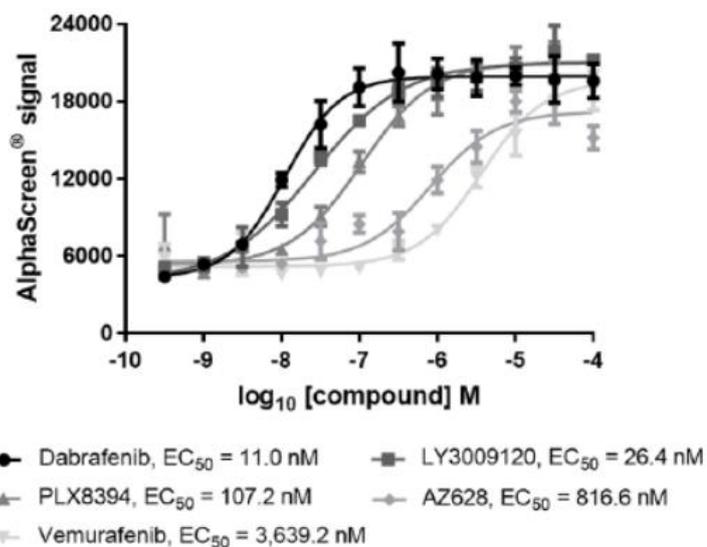
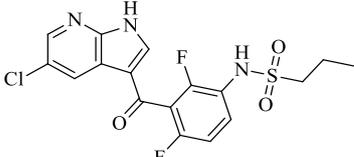
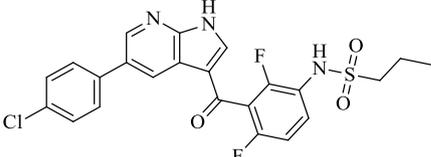
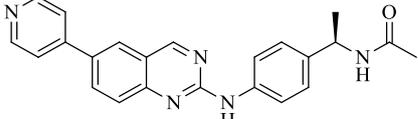
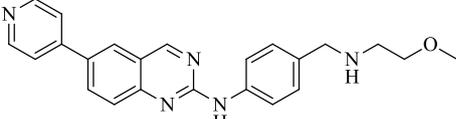
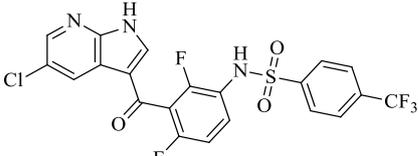
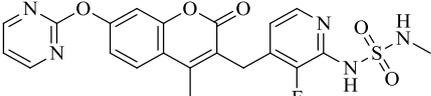
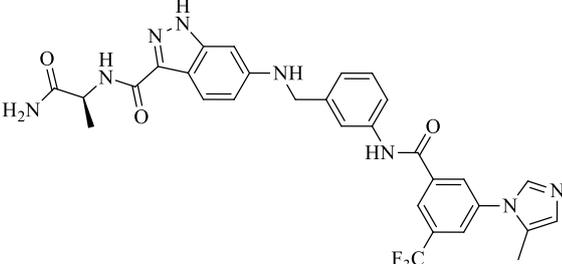
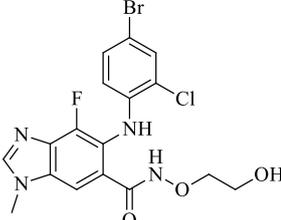
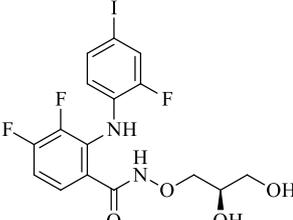


Рисунок 4 – Результаты ITDRF CETSA на клеточной линии A375 для известных ингибиторов B-Raf при 49 °С

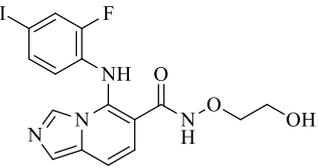
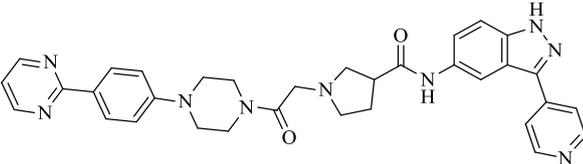
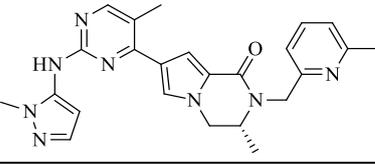
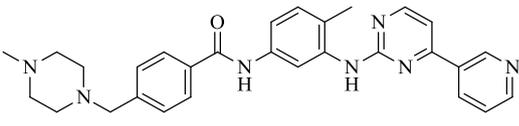
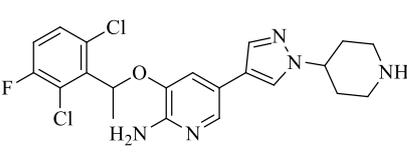
Таблица 1 – Результаты ITDRF CETSA при скрининге киназной библиотеки

Соединение	Структурная формула	Значения pEC ₅₀ для B-Raf
1	2	3
Dabrafenib		7.8 ± 0.1
LY3009120		7.6 ± 0.2
AZ628		6.4 ± 0.1
Vemurafenib analog		6.2 ± 0.1

Продолжение таблицы 1

1	2	3
PLX4720		5.8 ± 0.1
Vemurafenib		5.8 ± 0.5
AZ12823138		5.6 ± 0.1
Compound 4		4.6 ± 0.0
PLX5568		< 4.5
—CH-5126766		5.0 ± 0.4
Compound 10d		< 4.5
Selumetinib		< 4.5
PD0325901		< 4.5

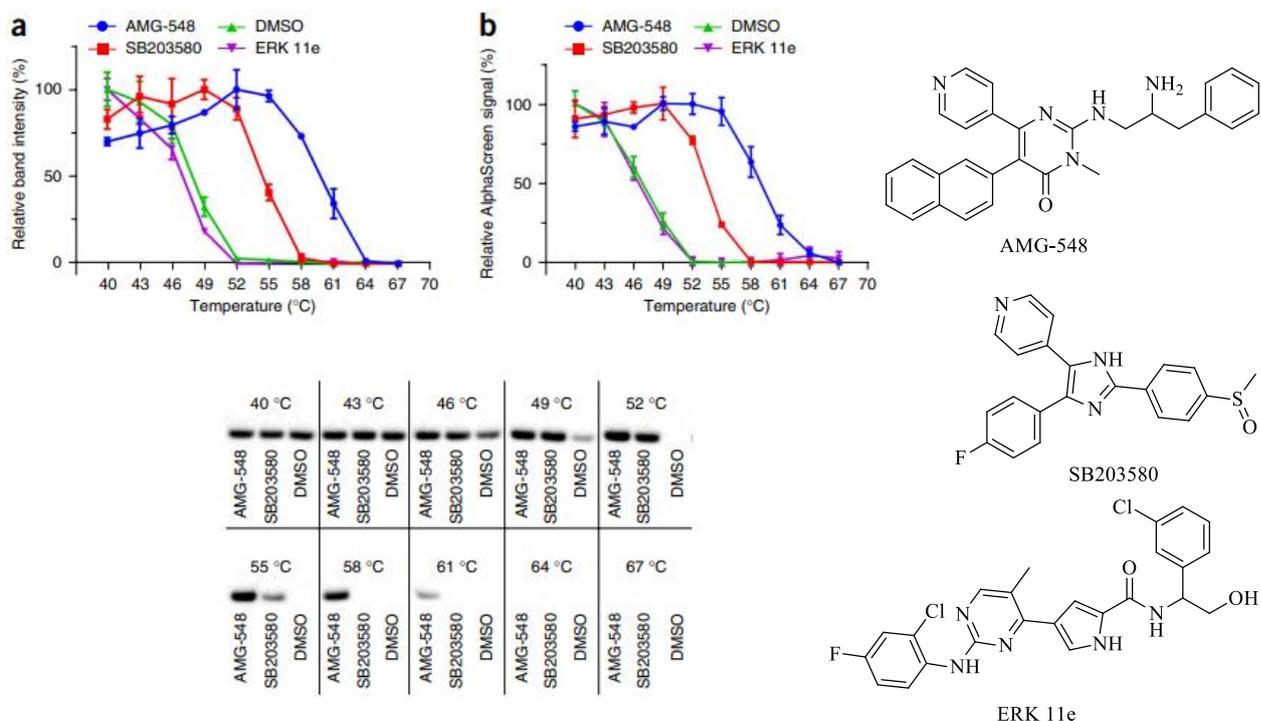
Продолжение таблицы 1

1	2	3
GDC-0623		< 4.5
SCH772984		< 4.5
Compound 35		< 4.5
Imatinib		< 4.5
Crizotinib		< 4.5

В том же исследовании был разработан высокопроизводительный HT-SETSA для поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 (PARP1). Авторы использовали набор из 6288 соединений, которые ранее были идентифицированы как связывающие PARP1 в биохимическом флуоресцентном поляризационном анализе (FP) и подвергли их термическому профилированию. В целом наблюдалась сильная корреляция между FP и SETSA: 81% совпадений по активности с FP. В подгруппе из 112 соединений авторы показали, что 13 из этих соединений были неактивны в SETSA, а также были неактивны в анализе клеточного АДФ-рибозилирования, указывая на недостаточную клеточную проницаемость выделенных соединений как на возможное объяснение. Данное исследование проводилось на клеточной линии A375 представленную клетками меланомы человека. Оценка

результатов CETSA проводилась при помощи AlphaScreen – метода, нацеленного на эндогенный белок.

В похожей работе [25] команда, которая вела пионерские исследования в данной области приводит результаты исследования ингибиторов к киназам p38 α и ERK1/2. Авторами был предложен подробный протокол и дизайн исследования по тестированию лигандов на дозозависимую реакцию. Связывание выбранных соединений подтверждается результатами ITDRF CETSA на клеточной линии лейкемии человека (HL-60) (рисунок 5). Обнаружение белка после термического шока проводилось при помощи AlphaScreen и вестерн-блоттинга.



Количественная оценка была основана либо на вестерн-блоттинге (а), либо на методе SureFire (b); снизу показаны необработанные результаты вестерн-блоттинга при различных температурах

Рисунок 5 – Результаты CETSA на клеточной линии HL-60

Совсем недавно были описаны подходы HT-CETSA, использующие иммунофлуоресценцию в сочетании с визуализацией высокого содержания (HCS). Этот метод количественно определяет «растворимый» белок в прикрепившихся клетках, поскольку антигенный эпитоп становится недоступным при нагревании и агрегации. Джей Мэсси [26] сообщил о таком анализе, названном HCIF-CETSA, и продемонстрировал термозависимую агрегацию и потерю иммунофлуоресценции серин/треониновой протеинкиназы Chk1. Интересно, что обработка ингибитором V158411 приводила к более быстрой потере иммунофлуоресценции при нагревании, в отличие от термостабилизации, наблюдаемой с этим соединением с помощью традиционного CETSA [27]. Это несоответствие является интересной особенностью, и подчеркивает возможность того, что методы обнаружения CETSA могут показывать противоречивые результаты. По предположению автора статьи такой результат может указывать на то, что соединение индуцирует конформационные изменения, которые повышают термическую стабильность, а также маскируют сайт связывания эпитопа, используемый для иммунофлуоресцентного обнаружения.

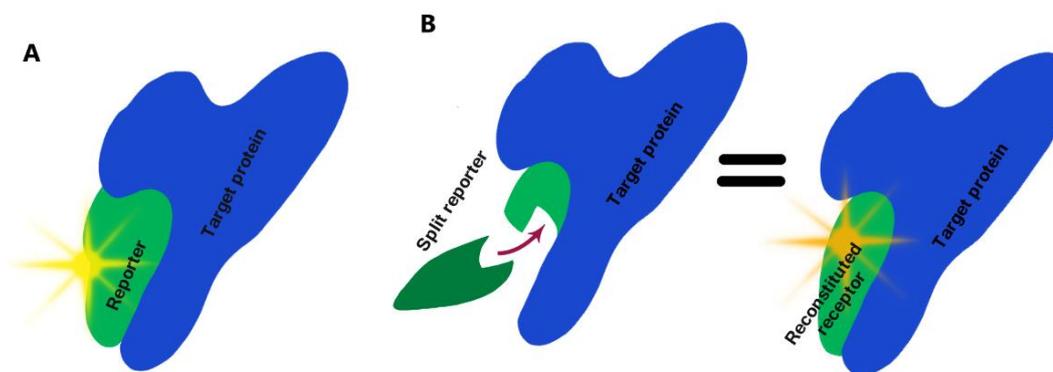
На сегодняшний день во всех отчетах, посвященных HT-CETSA, в которых измерялись эндогенные белки в клеточных лизатах, использовалась технология Alpha-bead. Ожидается, что другие форматы анализа, особенно гомогенные анализы, такие как FRET с временным разрешением (TR), будут совместимы с HT-CETSA. В связи с ужесточением требований к пропускной способности ведутся попытки адаптировать другие методы обнаружения антител, например, дот-блоттинг с акустическим переносом лизата [28] или полуавтоматический капиллярный вестерн-блоттинг. Для всех иммуноанализов специфичность антител имеет первостепенное значение, и в этом заключается основной недостаток такого подхода. Как при любом иммунохимическом методе анализа, есть вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Другие инструменты, обеспечивающие специфическое связывание с белками,

например, аптамеры нуклеиновых кислот, можно рассматривать как альтернативные методы обнаружения, однако такой подход не избавляет полностью от ошибок, связанных со специфичностью. Также было продемонстрировано, что использование масс-спектрометрии является мощным методом изучения термостабильности клеточных белков без меток [21]. CETSA на основе масс-спектрометрии для отдельных мишеней не подходит как метод с высокой пропускной способностью, но может быть осуществим с использованием высокопроизводительного анализа проб при помощи технологии RapidFire [29].

1.3.2 Методы детектирования с использованием репортерных систем

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 стабильными. В некоторых случаях репортеры могут повысить чувствительность, комбинируя яркий выходной сигнал со сверхэкспрессией мишени, особенно когда эндогенный белок не может быть обнаружен в формате HTS. Примечательно, что некоторые из этих преимуществ также можно считать недостатками. Например, сверхэкспрессия белка может изменить функцию, локализацию или белок-белковые взаимодействия. Кроме того, тег-репортер может существенно повлиять на результаты анализа, изменив температуру агрегации. Таким образом, для получения достоверных данных требуется всесторонняя оценка поведения меченого белка по сравнению с его эндогенным аналогом, что может оказаться трудоемкой задачей.

В процессе развития репортерных систем выделилось два основных направления – полноформатные репортеры и сплитированные (рисунок 6).



А – полноразмерный репортер; В – сплитированный репортер

Рисунок 6 – Репортерные системы для обнаружения белков

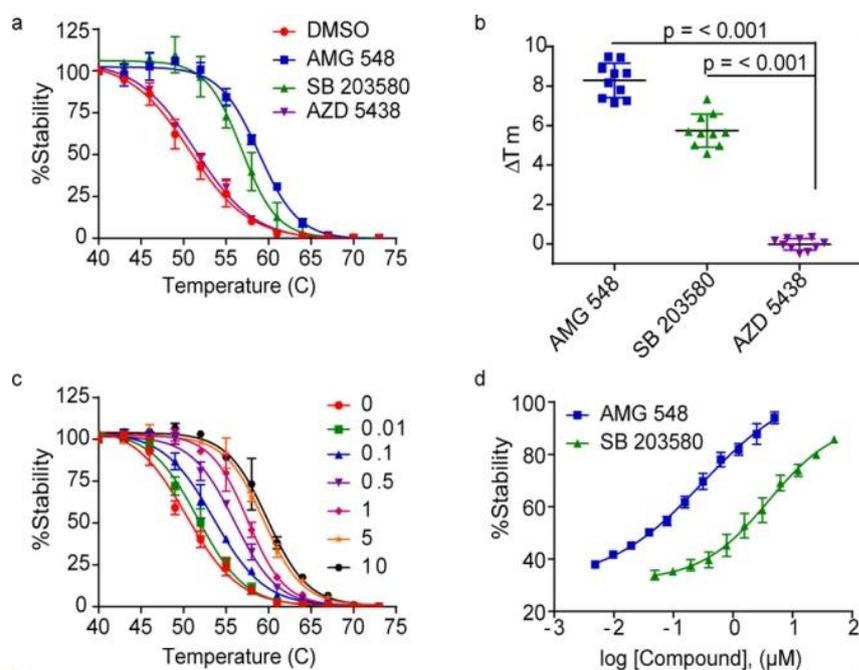
Первые потенциально могут быть использованы для CETSA, однако температура плавления репортера должна быть выше, чем температура плавления интересующего белка. По этой причине некоторые распространенные системы, такие как люцифераза светлячка ($T_m \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$) [30], люцифераза Renilla ($T_m \sim 42 \text{ }^\circ\text{C}$) [31] и β -галактозидаза ($T_m \sim 59 \text{ }^\circ\text{C}$) [32], не подходят для протокола CETSA. Репортерные варианты с повышенной термостабильностью, такие как люцифераза светлячка YY5, mCherry ($T_m \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$) [33], усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) ($T_m \sim 78 \text{ }^\circ\text{C}$) [34], или ультрастабильный GFP [35], могут оказаться более подходящими.

Чтобы обойти ограничения, связанные с использованием полноразмерных репортеров, несколько групп использовали подходы белковой комплементации, при которых репортеры разделяются на два фрагмента, а активность восстанавливается при их рекомбинации. В контексте CETSA это позволяет присоединить небольшую метку к интересующему белку и уменьшить влияние дериватирующего агента на результаты анализа, а более крупный фрагмент присоединяется на стадии обнаружения после нагревания. Системы комплементации были разработаны для ферментов люциферазы, включая люциферазу Renilla [36], люциферазу светлячка [37], люциферазу Gaussia [38] и нанолуциферазу [39]. Также

доступны флуоресцентные системы на основе распространённого зеленого флуоресцирующего белка – система комплементации GFP (splitGFP) [40].

На сегодняшний день в стратегиях CETSA в основном используются люминесцентные подходы с селитруемыми ферментными репортерами. Научная команда Дарта [41] продемонстрировали HT-CETSA с использованием NanoLuciferase (NanoLuc), белка массой 19 кДа с ярким и стабильным люминесцентным излучением [42]. В этом подходе, также известном как NaLTSA, нанолюцифераза была слита с N- или C-концом мишени и экспрессирована в клетках HeLa путем трансфекции репортера, на основе цитомегаловируса (CMV). Внутренняя термическая стабильность NanoLuc выше, чем у белков млекопитающих, и результаты исследований Дарта показывают, что добавленная люцифераза не изменяет профиль термической денатурации целевого белка. Анализ был нацелен на киназу p38α в клетках HeLa, временно экспрессирующие Nluc-p38α. Данные клетки обрабатывали либо ДМСО (в качестве контроля), либо ингибиторами киназ AMG-548, SB203580 и AZD5438 в течение 1 часа при 37°C. Затем образцы подвергали воздействию термического шока с последующим измерением биолюминесценции. Значения, полученные при каждой температуре в пределах температурного градиента, использовались для расчета кажущихся кривых термической денатурации. Кажущаяся T_m для Nluc-p38α составляла 50.7 °C в присутствии ДМСО, но увеличивалась до 59.0 и 56.8 °C в присутствии известных ингибиторов p38α AMG-548 и SB203580 соответственно (рисунок 7).

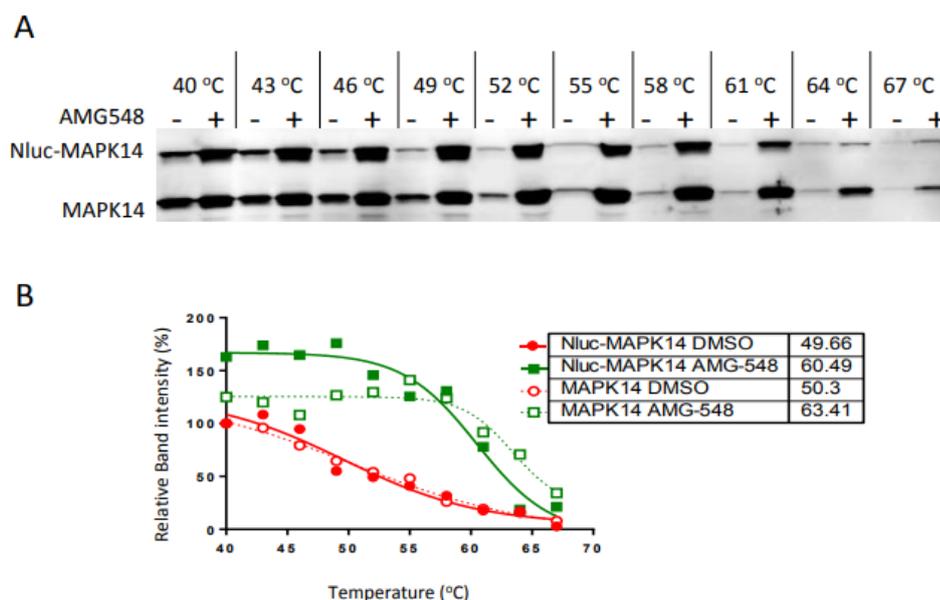
Напротив, AZD 5438, ингибитор, селективный в отношении киназы CDK2 и предположительно не связывающийся с исследуемой киназой, не вызывал значительного термического сдвига.



а – Кривые температурного сдвига Nluc-p38 α после обработки ДМСО и ингибиторов киназ; б – демонстрация воспроизводимости для 10 повторений; с – Кривые плавления для AMG 548 при различных концентрациях; д – ITDRF CETSA для двух активных соединений при 54 °С

Рисунок 7 – Результаты NaLTSA

Чтобы определить, влияет ли метка Nluc на взаимодействие с мишенью, был проведен сравнительный анализ профилей термического сдвига Nluc-p38 α с эндогенным p38 α . Идентичные условия анализа для обеих конфигураций были обеспечены путем применения CETSA (посредством вестерн-блоттинга) к клеткам HeLa, экспрессирующим Nluc-p38 α на уровне, сравнимом с эндогенной киназой. Перед анализом клетки пермеабелизировали с помощью дигитонина и обработали ингибитором AMG-548. Было обнаружено, что кажущаяся T_m для Nluc-p38 α и нативного p38 α составляет 49.7 °С и 50.3 °С соответственно; аналогичные сдвиги T_m , в присутствии ингибитора составили 60.5 °С и 63.4 °С (рисунок 8).



А – Репрезентативные результаты вестерн-блоттинга; В – Профили плавления для p38 α (MAPK14) и Nluc-p38 α (MAPK14-Nluc)

Рисунок 8 – Сравнительный анализ профилей термического сдвига

Крайне перспективный подход SplitNanoLuciferase также был реализована для CETSA. В этом подходе фрагмент нанолуциферазы из 15 аминокислот (вариант HiBiT [43]; также известный как 86b) был слит с представляющими интерес белками, а большой фрагмент нанолуциферазы (11S) и субстрат фуримазин добавлялись после нагревания для количественного определения количества неагрегированного белка. Мартинес с коллегами [44] провели скрининг низкомолекулярных ингибиторов лактатдегидрогеназы А (LDHA), используя библиотеку из 1850 соединений, ориентированную на онкологические заболевания. В качестве модели была использована универсальная клеточная линия эмбриональных клеток почки человека HEK 293T. Эта методология позволяет избежать необходимости создания стабильных клеточных линий или специализированных для мишени реагентов для трансдукции таких как VasMat, что значительно упрощает анализ. В результате был идентифицирован единственный стабилизирующий LDHA хит — GSK2837808A. Однако исследователи также столкнулись с существенным недостатком CETSA. Было показано нарушение корреляции результатов

теплового сдвига и биохимических анализов, в которых измерялся выход лактата. В редких случаях соединение из библиотеки для скрининга могло повышать термостабильность белка интереса при CETSA, однако его связывание проходило в аллостерическом сайте белка и не приводило к ингибированию. Данный процесс является ярким примером ложноположительных результатов, которые с некоторой вероятностью может выдавать анализ теплового сдвига.

Дополнительные репортерные метки, которые облегчают количественный анализ белка могут модифицировать CETSA. Например, взаимодействие с мишенью NUDT7 было продемонстрировано с использованием белка, меченного FLAG [45]. Другие небольшие эпитопные метки, такие как Мус или Strep II, также могут подходить для CETSA, однако их полноценное использование в высокопроизводительном формате на сегодняшний день затруднено.

Таблица 2 – Разнообразие подходов репортерного обнаружения белка при CETSA

Наименование метода	Система обнаружения	Размер репортера а. о.	Субстрат для детекции	Температура плавления репортера T_m °C
NaLTSA	NanoLuc	156/13	Фуримазин	69.6
SplitLuc-CETSA	SplitLuc	15	Фуримазин	> 90
HTDR- CETSA	enhanced ProLabel (B-gal comp.)	42	ONPG	≈ 60
CETSA	RLuc	311	Целентеразин	60-70
CETSA	splitGFP	214/16	–	65

1.4 Роль RNF4 в убиквитинировании и протеасомной деградации

RNF4 представляет собой E3 убиквитин-белковую лигазу, содержащую N-концевой домен, который связывается с polySUMO-субстраты, и C-концевой домен RING, ответственный за димеризацию. Сумойлирование белков представляет собой ковалентную модификацию остатков лизина с помощью небольших белков семейства убиквитиноподобных модификаторов SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) [46]. Это происходит по биохимическому пути, аналогичному убиквитилированию, который представлен каталитическим каскадом E1-E2-E3. RNF4 регулирует деградацию нескольких белков, включая PML и активатор транскрипции PEA3.

Кроме того, RNF4 является также транскрипционным фактором и представляет интерес как мишень для лечения раковых заболеваний, т. к. взаимодействует со множеством онкогенных белков. Было показано, что RNF4 усиливает фенотип опухоли и необходима для выживания раковых клеток. Высокие уровни мРНК RNF4 коррелируют с плохой выживаемостью пациентов с раком молочной железы, а уровни белка RNF4 повышены в 30% аденокарцином толстой кишки человека [47].

Другим интересным применением данной лигазы является конструирование на ее основе PROTAC для целенаправленной деградации белков. В рамках данной стратегии разрабатывается комбинированная молекула, имеющая два фрагмента, соединённых линкером, и активирующая выборочный протеолиз целевого белка [48]. Этот метод возник как ортогональный подход к использованию низкомолекулярных ингибиторов против классических мишеней. В начале 2019 года в клинику прибыли первые целевые деструкторы белка, что привлекло внимание к PROTAC как к одной из наиболее привлекательных технологий в сфере разработки лекарств. Несмотря на эти многообещающие результаты, PROTAC имеют недостатки, связанные с плохой клеточной проницаемостью из-за их высокой

молекулярной массы и большой площади открытой полярной поверхности (PSA).

Эффективным решением может оказаться использование CETSA для обнаружения ковалентносвязываемых фрагментов для RNF4, что позволит собирать химерную молекулу из довольно мелких частей. Вовлеченность данного белка в биохимический процесс протеолитической деградации делает его перспективным кандидатом на роль убиквитин-E3-лигазы. Для RNF4 получено множество рентгеноструктурных данных, что позволяет подробным образом изучить структуру мишени в состоянии близком к физиологическому.

Данная биологическая мишень весьма перспективна в контексте проектирования PROTAC, т. к. относится к классу убиквитинлигаз E3 и принимает непосредственное участие в протеосомной деградации сумоилированных белков [49].

2 Результаты и их обсуждение

По результатам литературного обзора можно заключить, что анализ клеточного термического сдвига является удобным методом для идентификации связывания белка с лигандом в скрининговом формате. Благодаря использованию репортерной системы люциферазы NanoLuc можно детектировать термическую денатурацию с помощью люцинометра. Преимущества рассматриваемого метода заключаются в относительной простоте проведения, возможности адаптации для скринингового формата и условия, максимально приближенные к физиологическим в клетках и тканях.

В данной работе при помощи CETSA исследуются потенциальные ковалентные ингибиторы для RNF4, которые были выбраны и оценены методами молекулярного моделирования. Дизайн исследования включает в себя получение трансфицированных клеток, их обработку потенциальными ингибиторами RNF4 и проведение CETSA в формате скрининга (рисунок 9).

В ходе проделанной работы, мы стремились выявить соединения с наибольшей аффинностью к исследуемой лигазе при помощи лиганд-опосредованной стабилизации на линии эмбриональных клеток почки человека HEK 293, которая экспрессирует рекомбинантный RNF4 с меткой NanoLuc.

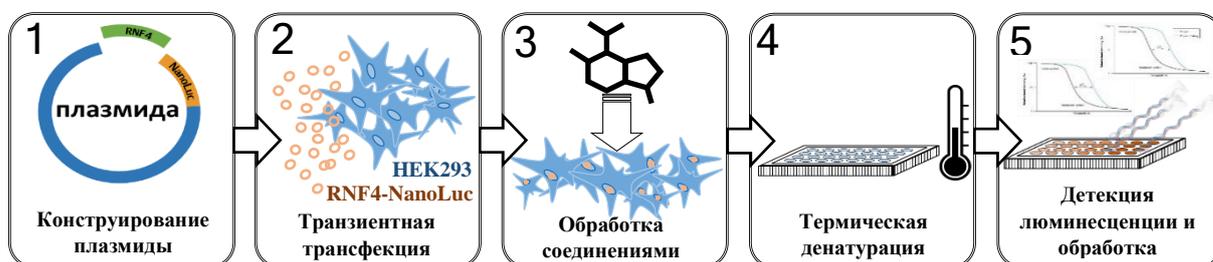


Рисунок 9 – Общая схема исследования

была определена высокая степень корреляции с первым вариантом (V1), при котором целевой ген после сплайсинга состоял из 528 пар нуклеотидов (рисунок 12).

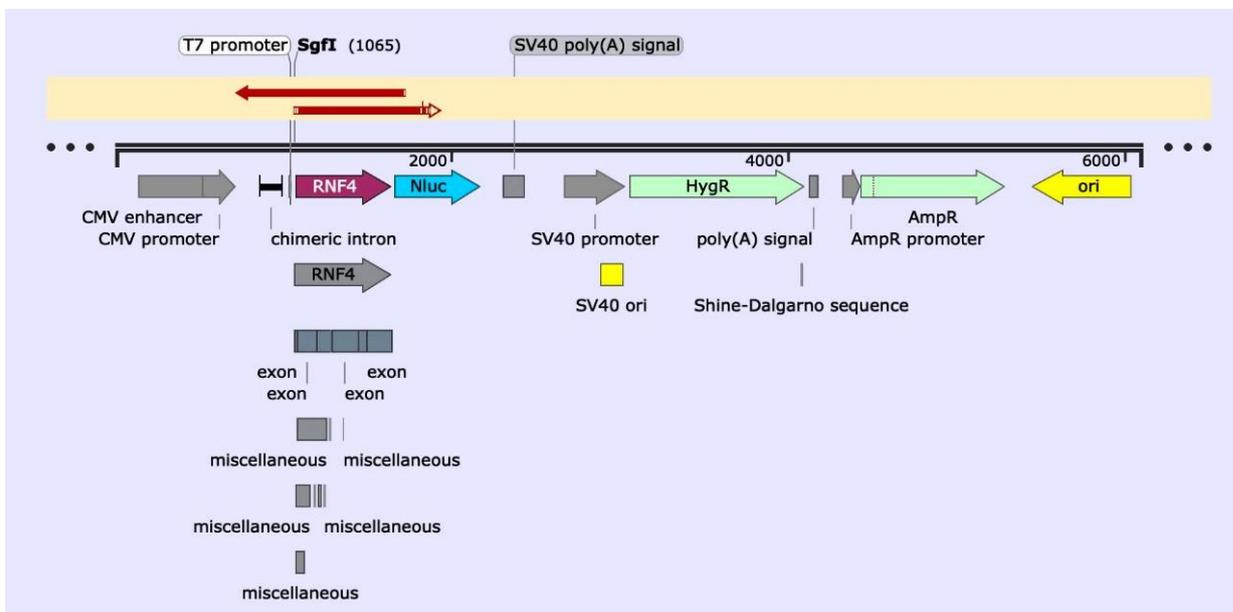
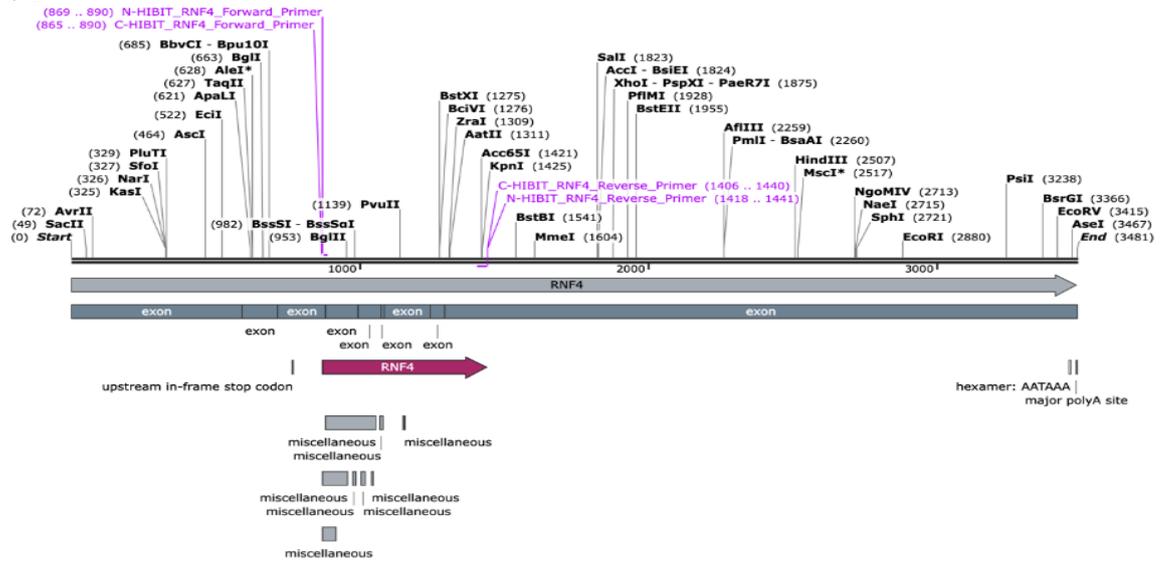


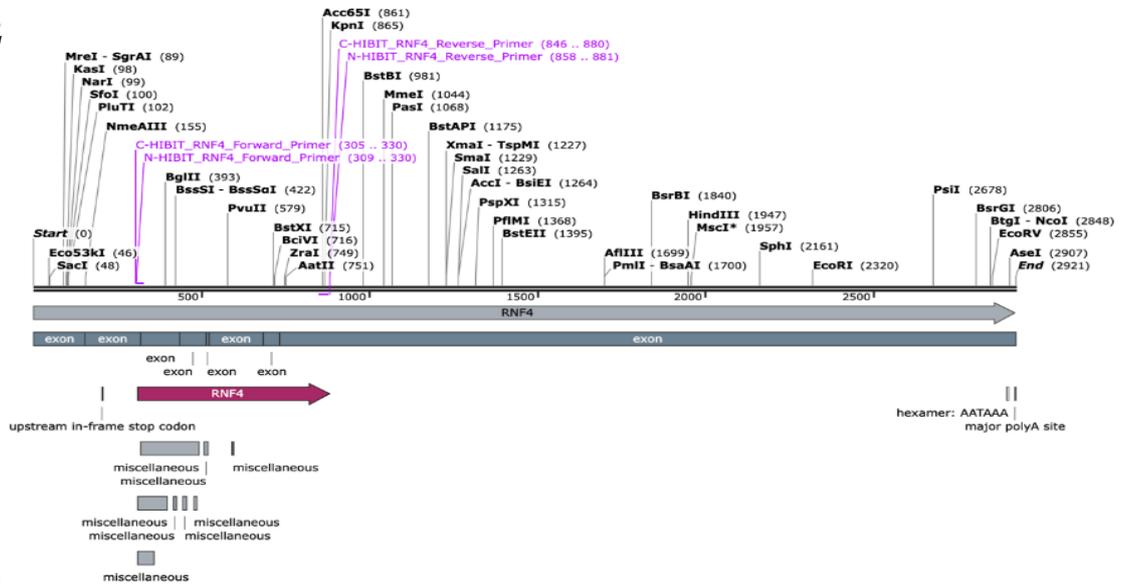
Рисунок 11 – Результаты секвенирования по Сэнгеру

Следует отметить, что общая проблема метода секвенирования, которая заключается в низком качестве определения первых 15–40 оснований последовательности, была решена путем сдвига рамки считывания при прямой и обратной репликации. В таких условиях происходило взаимное перекрывание трудносеквенируемых зон и достраивание пробелов по принципу комплементарности.

V1



V2



V3

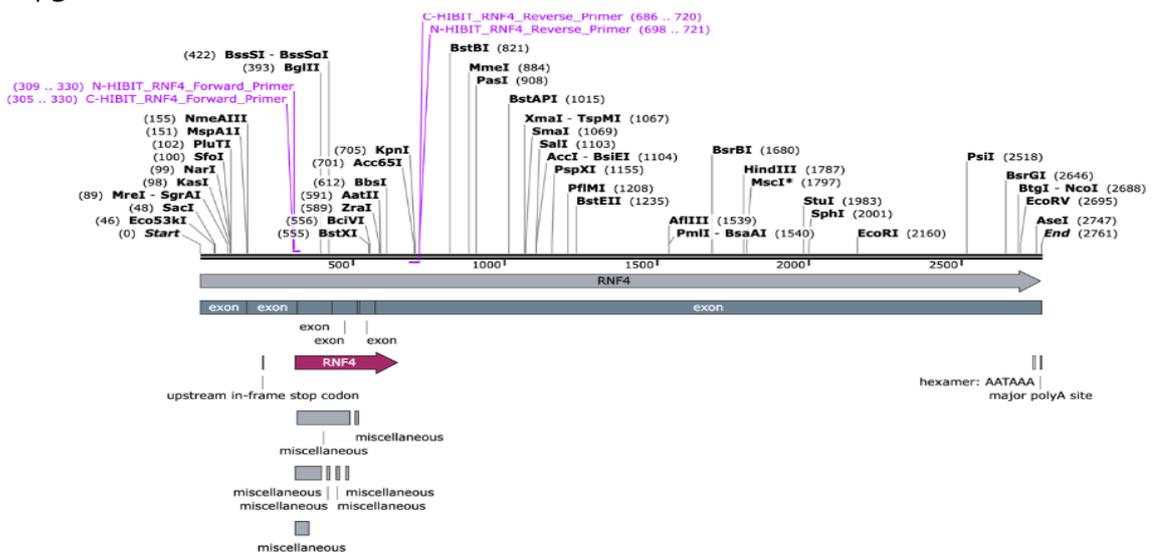


Рисунок 12 – Вариабельность альтернативного сплайсинга гена RNF4

Для увеличения концентрации кДНК провели амплификацию. Нуклеотидная последовательность праймеров была построена таким образом, чтобы охватить обширную область 5'-концов целевого гена, для повышения специфичности, и небольшого участка за его пределами, в состав которых входят сайты рестрикции (рисунок 13).

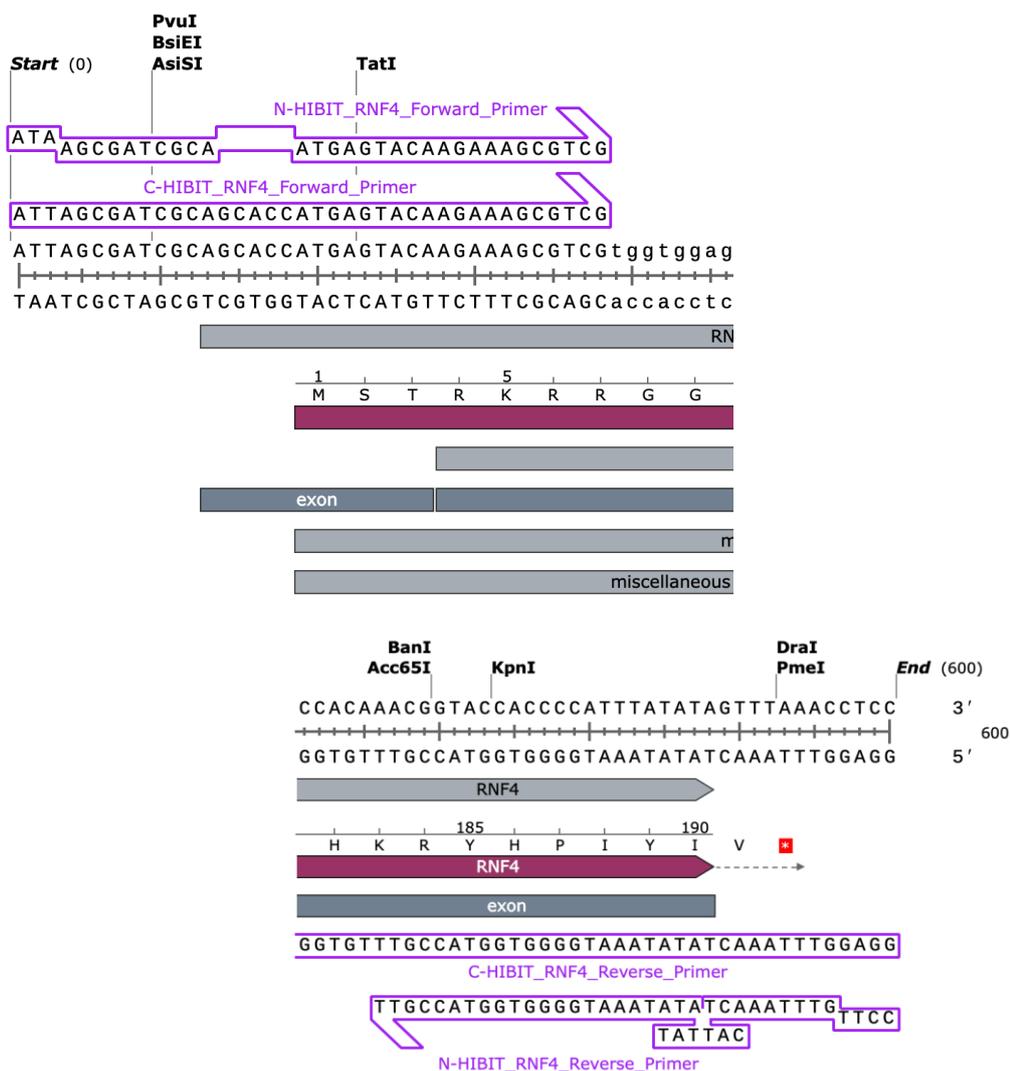


Рисунок 13 – Определение нуклеотидной последовательности для прямого и обратного праймера

Оптимальные условия отжига праймеров были определены путем проведения ПЦР в градиенте температур. Как показано на рисунке 14 наилучшая температура отжига по С-концу составила 65.5 °С. При данной

температуре на гель-электрофорезе продукт движется наиболее быстро и светится интенсивнее за счет наибольшей концентрации.

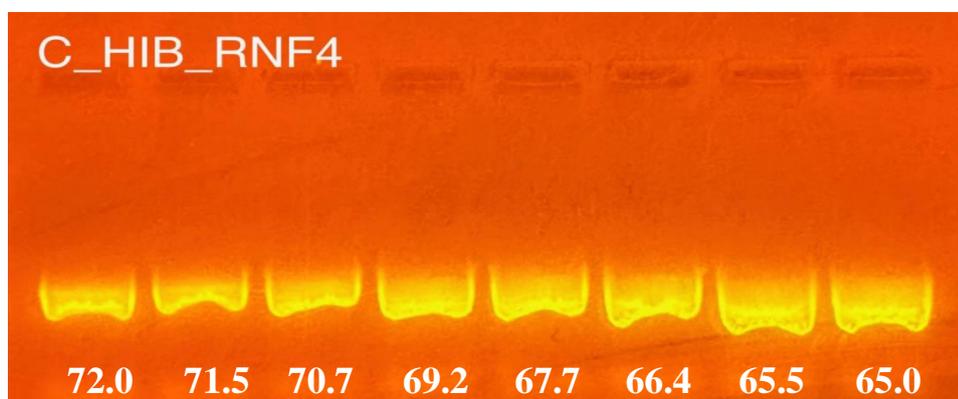


Рисунок 14 – Результаты гель-электрофореза после проведения ПЦР с градиентом температуры

2.2 Определение температуры плавления белка интереса

Перед началом проведения CETSA в скрининговом формате необходимо построить кривую плавления для интересующего белка в широком диапазоне температур и определить его температуру плавления без добавления стабилизирующих факторов.

Кривая плавления была основана на измеренных уровнях люминесценции при градиенте температур в диапазоне от 37 до 65 °С. Получен профиль термической денатурации рекомбинантного белка RNF4-NanoLuc (рисунок 15). Высокий уровень люминесценции при комнатной температуре указывает на плотно свернутый белок. Интенсивность излучения уменьшается с повышением температуры, что приводит к появлению сигмоидальной кривой, которая указывает на разворачивание белка. Постпиковая агрегация комплекса RNF4-NanoLuc приводит к подавлению сигнала люминесценции.

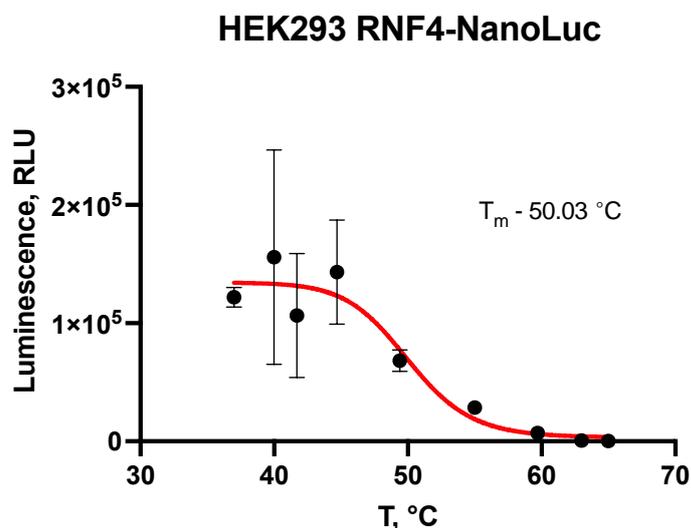


Рисунок 15 – Кривая плавления белка RNF4-NanoLuc

Обработка полученных данных позволяет определить кажущуюся температуру плавления RNF4-NanoLuc равной 50.03 °C, которая соответствует уменьшению интенсивности излучаемого света в половину.

2.3 Скрининг ингибиторов RNF4

В качестве потенциальных лигандов к RNF4 была рассмотрена библиотека со структурно разнообразным набором производных хлорацетамида. По результатам молекулярного моделирования были определены наиболее перспективные соединения (рисунок 16).

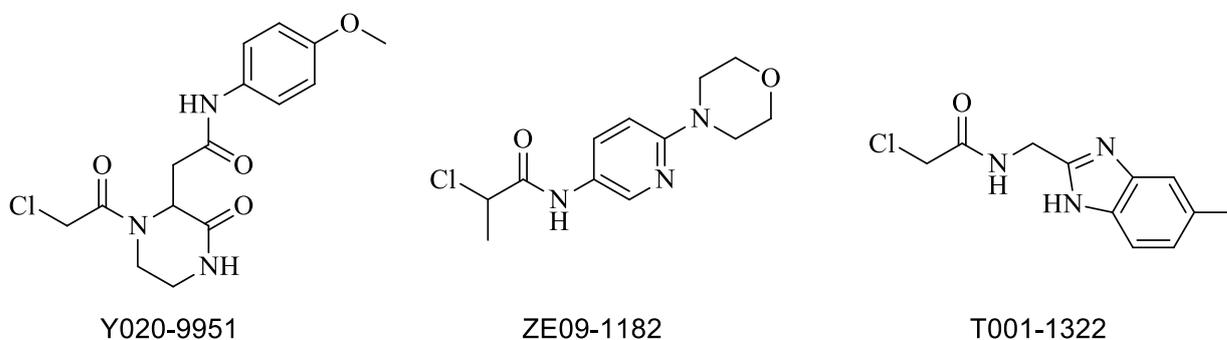


Рисунок 16 – Структуры исследуемых соединений

Для выбранных трех соединений был проведен анализ CETSA на клеточной линии HEK 293 и получены кривые плавления в температурном диапазоне от 37 до 65 °С. При сопоставлении результатов люминесценции RNF4-NanoLuc без добавления соединений с обработанными образцами был отмечен температурный сдвиг, свидетельствующий о лиганд-опосредованной стабилизации (рисунок 17).

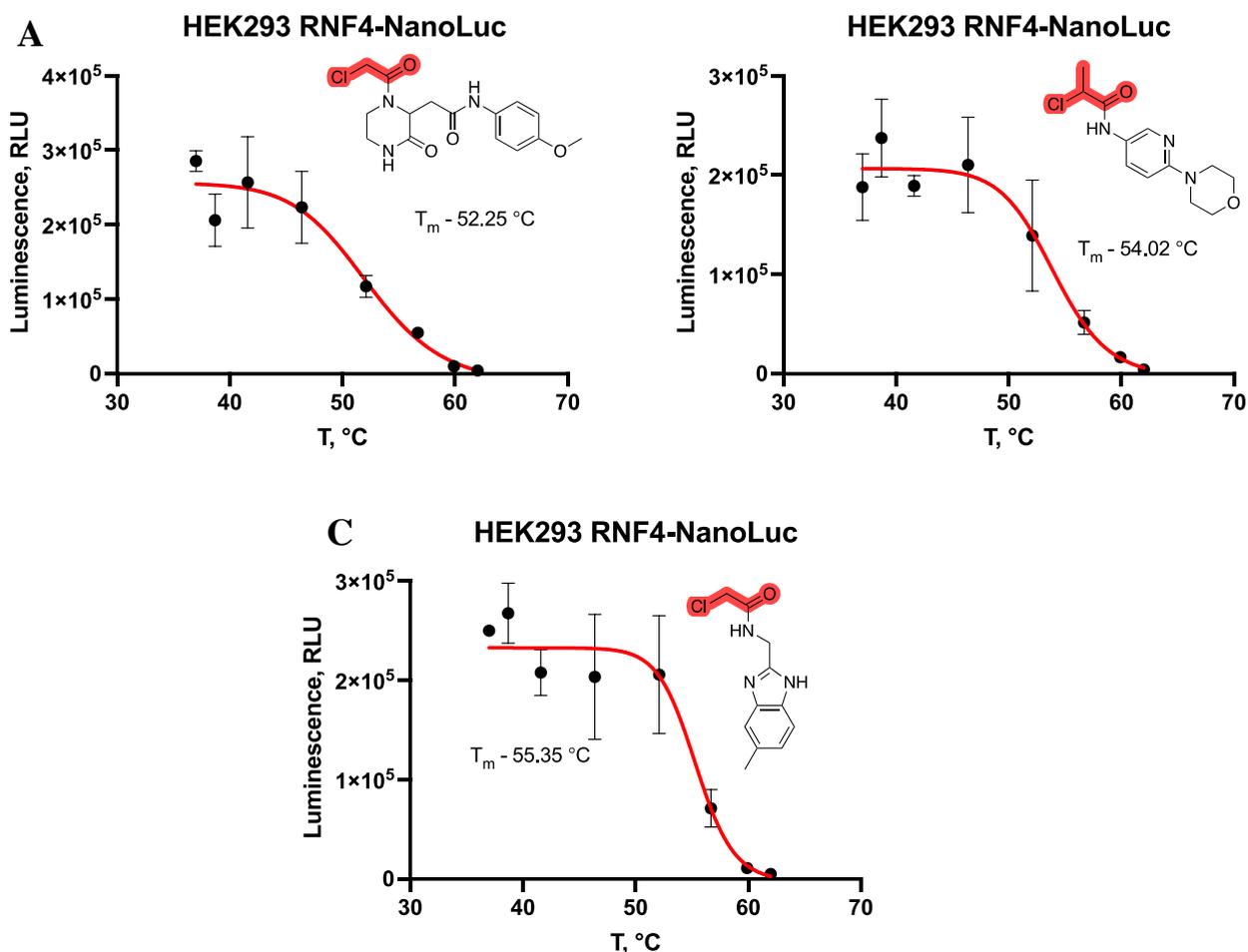
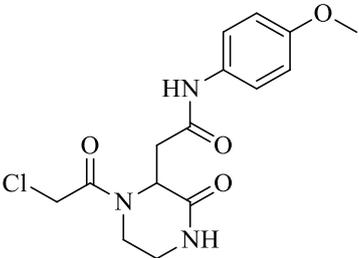
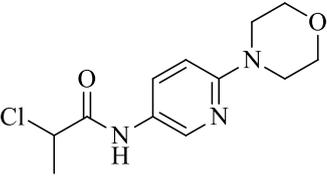
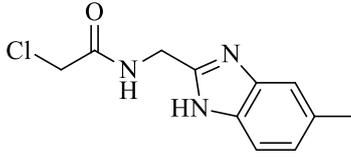


Рисунок 17 – Кривые плавления белка RNF-NanoLuc, обработанного соединениями

Таблица 3 – Результаты анализа SETSA с расчетом сдвига температуры плавления

Соединение	Структурная формула	Концентрация; μМ	Температурный сдвиг (ΔT _m); °С
Y020-9951		10	2.22
ZE09-1182		10	3.99
T001-1322		10	5.32

Из графиков термопрофилирования видно, что наибольшим стабилизирующим действием обладает соединение T001-1322, которое увеличивает температуру плавления на 5.32 °С (таблица 3).

3 Экспериментальная часть

3.1 Оборудование и материалы

В работе использовались следующие оборудование и материалы:

Ламинарный бокс (SafeFAST Elite, Germany); 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); криохранилище (Thermo Fisher, USA); термошейкер ES-20 (Biosan, Latvia); термоциклер (T100 Bio-Rad, USA); центрифуга 5430 R (Eppendorf, Germany); источник питания PowerPac Basic (BioRAD, USA); люминометр Glomax MultiPlus (Promega, USA); культуральный флакон с обработанной поверхностью T75 (Eppendorf, Germany); 6-ти луночные планшеты для адгезивных культур (Eppendorf, Germany); наконечники для микродозатора 0.5-1000 мкл (Vertex, USA); серологические пипетки на 5, 10, 50 мл (Eppendorf, Germany); центрифужные пробирки на 15 мл (Eppendorf, Germany); ПЦР пробирки DNA LoBind Tube 2мл. (Eppendorf, Germany); спин колонки (Qiagen Genomic-tip 20/G, Germany); 0.4% раствор трипанового синего (Merck, Germany); DMSO (Gibco, UK); абсолютный метанол (Merck, Germany); 50x трис-ацетатный электродный буфер (Евроген, Россия); FuGENE HD Transfection reagent (Promega, USA); гигромицин (capricorn scientific, Germany); агароза (); культуральная среда LB Miller + amp. (AppliChem, Germany); культуральная среда DMEM (Gibco, UK); эмбриональная бычья сыворотка FBS (Gibco, UK); TrypLE Express (Gibco, UK); фосфатно-солевой буфер PBS (Capricorn Scientific, Germany); QBT буфер (Qiagen, Germany); QC буфер (Qiagen, Germany); QF буфер (Qiagen, Germany); набор NanoLuc Kit (Promega, USA).

3.2 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). 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, Capricorn Scientific, Germany). Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению красителя (трипанового синего).

3.3 Получение плазмид

3.3.1 Клонирование RNF4

Ген, кодирующий RNF4, был получен из линии крупноклеточного рака легкого NCI-H460 путем ПЦР с обратной транскрипцией. Для этого, из биологического материала выделили целевую RNA при помощи комплекта RNeasy (Qiagen). Для получения кДНК использовали набор Evrogen и протокол производителя. В пробирку на 200 мкл помещалось 30 мкл р-ра totalRNA с концентрацией 250 нг/мкл, 10 мкл CDS-адаптера (10 мкМ) и 10 мкл PlugOligo-адаптера (10 мкМ). Инкубировали полученную смесь в термоциклере 2 мин при 70 °C и 3 мин. при 42 °C. Затем приготовили master-mix RT по протоколу с масштабированием в 10 раз и добавили к подготовленному раствору RNA, осторожно перемешивая пипеткой и оставили инкубироваться в течение 1 ч при 42 °C. После инкубации поместили пробирку на лед, чтобы обрезать первую цепь кДНК. Последующая наработка соответствующей кДНК проводилась при помощи амплификации в термоциклере (T100 Bio-Rad, USA).

3.3.2 Рестрикция и лигирование

Наработанная кДНК RNF4 была вставлена в плазмиду pNLF1-C [CMV/Hygro] (Promega, USA) через сайт рестрикции Sgf I, который дает липкие концы и PmeI с тупыми концами. Для рестрикции плазмидной ДНК готовили реакционную смесь исходя из стандартной схемы. На 20 мкл смеси добавили 2 мкл рестрикционного буфера (10x), 1 мкг плазмидной ДНК, 10 единиц эндонуклеазы рестрикции и дистиллированной воды до конечного объема.

Реакцию лигирования проводили при 6 °С в течение ночи. В качестве соотношения для сшиваемых фрагментов ДНК использовали пропорцию 1:5. Для лигирования фрагментов ДНК использовали лигазу T4 и стандартный протокол. На 10 мкл реакционной смеси брали 1 мкл реакционного буфера (10x), 1 мкл фрагмента плазмидной ДНК, 5 мкл фрагмента кДНК, 1 мкл (100 ед.) T4 ДНК лигазы и воду Milli-Q до конечного объема. Инкубацию проводили 16 ч при 6 °С. Перед последующей трансформацией прогрели смесь 10 мин при 70 °С для инактивации лигазы.

3.4 Транзиентная трансфекция

Клеточную линию НЕК293 после разморозки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5% концентрации углекислого газа. Замену культуральной среды провели через 48 часов, в результате чего клетки были отмыты от криопротектора. На вторые сутки произвели пассаж клеток в шестилуночный планшет с плотностью посева 550×10^3 клеток/на лунку. Для пересадки провели трипсинизацию клеток в культуральном флаконе 2 мл TrypLE 5 мин. и центрифугировали клеточную суспензию 3 мин. при 500g. Подсчет клеток произвели на автоматическом счетчике клеток (TC20 Bio-Rad, USA), предварительно обработав образец красителем трипановый синий.

Через 48 часов культивирования в шестилуночной планшете провели трансфекцию с использованием соотношения 1:3 плазмидной ДНК RNF-NanoLuc и реагента для трансфекции FuGENE HD (Promega, USA) в базальной среде OptiMEM (Gibco, UK). Конструкцию для трансфекции получали разведением 1 мкг плазмидной ДНК в 250 мкл базальной среды Opti-MEM I, последовательно вносили 6 мкл FuGENE HD и 6.1 мкл DNA Transfection carrier (Promega, USA). Смесь инкубировали 15 мин. при комнатной температуре, после чего вносили в лунки с клетками. Для выявления наилучшего клона кДНК данная процедура была проделана для двух вариантов – RNF4-NanoLuc Clone 1 и RNF4-NanoLuc Clone 6.

Через 48 часов после трансфекции сняли клетки с обеих лунок при помощи стандартного протокола и перенесли в белый планшет (Corning Inc. Costar, USA) по три ряда каждого клона, с плотностью 40×10^3 клеток/на лунку. Оставшиеся пустые лунки заполнили PBS буфером для предотвращения краевого эффекта высыхания.

Спустя сутки провели тест на люминесценцию, для чего приготовили стоковую смесь из лизирующего буфера и 80 мкл фуримазина, перемешали и добавили по 100 мкл в каждую лунку с клетками. Свечение детектировали при помощи люменометра (GloMax multi detection system, Promega).

3.5 Анализ клеточного теплового сдвига

Влияние тестируемых соединений на термостабильность белка-мишени определяли методом анализа клеточного теплового сдвига (CETSA) с использованием полученной клеточной линии, экспрессирующей RNF4-NanoLuc.

Для определения температуры плавления белка интереса суспензию трансфицированных клеток перенесли в ПЦР пробирки (Eppendorf, Germany) по 100 мкл. с концентрацией 50×10^3 клеток. Температурную денатурацию проводили в термоциклере (T100 Bio-Rad, USA) в трех повторах с

температурным диапазоном от 40 до 65 °С. Протоколом для температурной обработки является стабилизация образцов при 37 °С, последующий 3-минутный нагрев суспензии клеток до выставленных температур и лимитирующим охлаждением до 4 °С.

Для измерения уровня люминесценции 70 мкл каждого образца перенесли в белый планшет (Corning Inc. Costar, USA) в трех повторах с концентрацией 35×10^3 клеток/на лунку и добавили 140 мкл фуримазина в лизирующем буфере в каждую лунку. Свечение детектировали при помощи люменометра (GloMax multi detection system, Promega).

Заключение

Проведение исследований по оценке связывания потенциальных лекарственных молекул с белковыми мишенями на начальных этапах разработки новых ЛС является крайне актуальной задачей. Кроме того, для этих нужд требуются экономически выгодные методы, которые могли бы давать результаты максимально приближенные к реальным биологическим системам.

В данной работе рассмотрен и воспроизведен такой метод хемотреомики как анализ клеточного теплового сдвига (CETSA). Нами был произведен скрининг соединений, которые показывали перспективные результаты при молекулярном моделировании *in silico* для мишени RNF4. Серия проведенных экспериментов позволяют оценить степень стабилизации белковой мишени относительно контроля и, как следствие, сродство выбранных лигандов к белку на живых клетках. Отмечен значительный температурный сдвиг для трех соединений, что коррелирует с результатами молекулярного моделирования, так как именно эти лиганды были выбраны в качестве соединений хитов.

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

– выделен ген *RNF4* и сконструирована плазида с функциональной вставкой RNF4-NanoLuc.

– получена линия трансфицированных клеток стабильно экспрессирующих RNF4-NanoLuc.

– проведен анализ клеточного теплового сдвига для серии лигандов.

Дальнейшие исследования могут быть направлены на масштабирование и оптимизацию данного анализа для больших выборок лигандов как к RNF4, так и для других перспективных мишеней. Полученные результаты показывают, что CETSA является убедительным и надежным методом *in vivo* оценки аффинности для потенциальных лекарственных средств.

Список используемой литературы

1. Rask-Andersen M. Trends in the exploitation of novel drug targets / M. Rask-Andersen, M. S. Almen, H. B. Schiöth // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2011. – Vol. 10, № 8. – P. 579-590.
2. Mark J. Henderson. High-Throughput Cellular Thermal Shift Assays in Research and Drug Discovery / Mark J. Henderson. Marc A. Holbert, Anton Simeonov, Lorena A. Kallal et. al. // *SLAS Discovery.* – 2020. – Vol. 25, № 2. – P. 137-147.
3. F. R. Salemme. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery / Michael W. Pantoliano, Eugene C. Petrella, D. Joseph, Pamela Lane, F.R. Salemme // *SLAS Discovery.* – 2001. – Vol. 6, № 6. – P. 429-440.
4. J. A. Schellman. Macromolecular binding // *Biopolymers.* – 1975. – Vol. 14, № 5. – P. 999-1018.
5. Mine Y. Thermally induced changes in egg white proteins / Y. Mine, T. Noutomi, N. Haga // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1990. – Vol. 38, № 12. – P. 2122-2125.
6. Nordlund P. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination / M. Vedadi, O. Y. Fedorov, P. Nordlund, A. M. Edwards et. al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103, № 43. – P. 15835-15840.
7. Mateus A. Thermal proteome profiling for interrogating protein interactions / A. Mateus, N. Kurzawa, I. Beche, S. Sridharan, M. M. Savitski et. al. // *Mol. Syst. Biol.* – 2020. – Vol. 3. – P. e9232.
8. Nordlund P. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay / D. Martinez Molina, R. Jafari, M. Ignatushchenko, P. Nordlund // *Science.* – 2013. – Vol. 341, № 6141. – P. 84-87.

9. Yin S. Q. The development of MetAP-2 inhibitors in cancer treatment / S. Q. Yin, J. J. Wang, C. M. Zhang, Z. P. Liu // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 19, № 7. – P. 1021-1035.
10. Ruiz-Garcia A. Pharmacokinetics in drug discovery / A. Ruiz-Garcia, M. Bermejo, A. Moss, V. G. Casabo et. al. // *J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 97, № 2. – P. 654-690.
11. Auld D. S. Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression / D. S. Auld, N. Thorne, W. F. Maguire, J. Inglese // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, № 9. – P. 3585-3590.
12. Matulis D. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor / D. Matulis, J. K. Kranz, F. R. Salemm, M. J. Todd // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, № 13. – P. 5258-5266.
13. Hammond M. Profiling cellular protein complexes by proximity ligation with dual tag microarray readout / M. Hammond, R. Y. Nong, O. Ericsson, K. Pardali, U. Landegren // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. e0119890.
14. Aled M. Edwards. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination / Masoud Vedadi, H. Frank, Abdellah Allali-Hassani, Aled M. Edwards et. al // *PNAS* – 2006. – Vol. 43. – P. 15835-15840.
15. Kurganov B. I. Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation // *Biochemistry (Mosc).* – 2002. – Vol. 67, № 4. – P. 409-422.
16. Magnusson A. O. NanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development / A. O. Magnusson, A. Szekrenyi, H. J. Joosten, W. D. Fessner et. al. // *FEBS J.* – 2019. – Vol. 286, № 1. – P. 184-204.
17. Pangalos M. N. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework // D. Cook, D. Brown, R. Alexander, M. N. Pangalos // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2014. – Vol.13, № 6. – P. 419-431.

18. Mark J. Henderson. High-Throughput Cellular Thermal Shift Assays in Research and Drug Discovery / Mark J. Henderson, Marc A. Holbert, Anton Simeonov, Lorena A. Kallal // *SLAS Discovery*. –2020. – Vol. 25, № 2. – P 137-147.
19. Nordlund P. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome / M. M. Savitski, F. B. Reinhard, Martinez D. Molina, B. Kuster, P. Nordlund, et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 346, № 6205. – 1255784. – P. 1-10.
20. Savitski M. M. Thermal proteome profiling for unbiased identification of direct and indirect drug targets using multiplexed quantitative mass spectrometry / H. Franken, T. Mathieson, D. Childs, M. M. Savitski et. al. // *Nat. Protoc.* – 2015. – Vol. 10, № 10. – P. 1567-1593.
21. Savitski M. M. Thermal proteome profiling monitors ligand interactions with cellular membrane proteins / F. B. Reinhard, D. Eberhard, T. Werner, M. M. Savitski // *Nat. Methods*. – 2015. – Vol. 12. – P. 1129-1131.
22. Sontheimer E. J. Barrangou R. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution // *Hum. Gene Ther.* – 2015. – Vol. 26, № 7. – P. 413-424.
23. Kyung S. K. Generation of a PDX1–EGFP reporter human induced pluripotent stem cell line, KSCBi005-A-3, using the CRISPR/Cas9 system / L. Youngsun, A. Kwon, P. Hyeyeon, S. K. Kyung et. al. // *Stem Cell Research* – 2019. – Vol. 41. – P. 101632
24. Martinez M. D. Positioning High-Throughput CETSA in Early Drug Discovery through Screening against B-Raf and PARP1 / J. Shaw, I. Dale, M. D. Martinez, M. Dabrowski et. al. // *SLAS Discov.* – 2019. – Vol. 24, № 2. – P. 121-132.
25. Martinez M. D. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells / R. Jafari, H. Almqvist, H. Axelsson, P. Nordlund, D. Martinez Molina // *Nat. Protoc.* – 2014. – Vol. 99. – P. 2100-2122.

26. Massey A. J. A high content, high throughput cellular thermal stability assay for measuring drug-target engagement in living cells // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, № 4. – P. e0195050.

27. Geneste C. C. Massey A. J. Cell Density Affects the Detection of Chk1 Target Engagement by the Selective Inhibitor V158411 // SLAS Discov. – 2018. – Vol. 2. – P. 144-153.

28. Iannotti M. J. Detecting Secretory Proteins by Acoustic Droplet Ejection in Multiplexed High-Throughput Applications / M. J. Iannotti, R. MacArthur, R. Jones, Inglese J. // ACS Chem. Biol. – 2019. – Vol. 14, № 3. – P. 497-505.

29. Maureen K. High-Throughput Screening Assay for Sphingosine Kinase Inhibitors in Whole Blood Using RapidFire® Mass Spectrometry / K. Maureen, P. Matthew, V. Olga, M. Marek, Nagiec // SLAS Discovery. – 2011. – Vol. 16, № 2. – P. 272-277.

30. White P. J. Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354 / P. J. White, D. J. Squirrell, P. Arnaud, J. A. Murray et. al. // Biochem J. – 1996. – Vol. 319. – P. 343-350.

31. Shigehisa M. Stabilization of luciferase from *Renilla reniformis* using random mutations / M. Shigehisa, N. Amaba, M. Tokunaga, M. Ishibashi et. al. // Protein Eng. Des. Sel. – 2017. – Vol. 1. – P. 7-13.

32. Edwards R. A. Jacobson A. L. Huber R. E. Thermal denaturation of beta-galactosidase and of two site-specific mutants // Biochemistry. – 1990. – Vol. 29, №. 49. – P. 11001-11008.

33. Wannier T. M. Moore M.M. Computational Design of the β -Sheet Surface of a Red Fluorescent Protein Allows Control of Protein Oligomerization // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 6. – P. e0130582.

34. Tsien R. Y. The green fluorescent protein // Annu Rev. Biochem. – 1998. – Vol. 67. – P. 509-544.

35. Scott D. J. A Novel Ultra-Stable, Monomeric Green Fluorescent Protein For Direct Volumetric Imaging of Whole Organs Using CLARITY / D. J. Scott, N.

J. Gunn, V. C. Wimmer, M. D. Griffin et. al. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 667.

36. Paulmurugan R. Gambhir S. S. Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation // *Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 75, № 7. – P. 1584-1589.

37. Paulmurugan R. Umezawa Y. Gambhir S. S. Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 24. – P. 15608-15613.

38. Remy I. Michnick S. W. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase // *Nat. Methods.* – 2006. – Vol. 12. – P. 977-979.

39. Dixon A. S. Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells / A. S. Dixon, M. K. Schwinn, M. P. Hall, K. V. Wood et. al. // *ACS Chem. Biol.* – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 400-408.

40. Feng S. Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling / S. Feng, S. Sekine, B. Huang et. al. // *Nat. Commun.* – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 370.

41. Dart M. L. Homogeneous Assay for Target Engagement Utilizing Bioluminescent Thermal Shift / M. L. Dart, T. Machleidt, K. Zimmerman, K. V. Wood et. al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2018. – Vol. 9, № 6. – P. 546-551.

42. Hall M. P. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate / M. P. Hall, J. Unch, B. F. Binkowski, K. V. Wood et. al. // *ACS Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. 1848-1857.

43. Hirata Y. Application of a novel HiBiT peptide tag for monitoring ATF4 protein expression in Neuro2a cells / Oh-Hashi K. Furuta E. Fujimura K. Hirata Y. // *Biochem. Biophys. Rep.* – 2017. – Vol. 12. – P. 40-45.

44. Martinez N. J. A widely-applicable high-throughput cellular thermal shift assay (CETSA) using split Nano Luciferase / N. J. Martinez, R. R. Asawa, M. J. Henderson et. al. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 9472.

45. Resnick E. Rapid Covalent-Probe Discovery by Electrophile-Fragment Screening / E. Resnick, A. Bradley, J. Gan, N. London et. al. // J. Am. Chem. Soc. – 2019. – Vol. 141, № 22. – P. 8951-8968.

46. Matunis M. J. Zhang X. D. Ellis N. A. SUMO: the glue that binds // Dev. Cell. – 2006. – Vol. 5. – P. 596-597.

47. Thomas J. J. RNF4-dependent oncogene activation by protein stabilization / J. J. Thomas, M. Abed, J. Heuberger et al. // Cell Rep. – 2016. – Vol. 16, № 12. – P. 3388-3400.

48. Deshaies R. J. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation / K. M. Sakamoto, K. B. Kim, R. J. Deshaies et. al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, № 15. – P. 8554-8559.

49. Fryrear K. A. The Sumo-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein Tax/ K. A. Fryrear, X. Guo, O. Kerscher et al. // J. Blood. – 2012. – Vol. 119, № 5. – P. 1173-1181.