

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ И ЛИГАНДОВ

© 2019 г. А. В. Коршунова* **, Ю. Н. Лопанская**, Н. Б. Гудимчук* **

*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

**Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119191, Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: gudimchuk@phys.msu.ru

Поступила в редакцию 13.05.2019 г.

После доработки 13.05.2019 г.

Принята к публикации 24.05.2019 г.

Благодаря развитию методов молекулярного моделирования и прогрессу вычислительной техники, стремительно растут возможности компьютерного анализа конформационных свойств белков и характера их взаимодействия с лигандами. Несмотря на это, существующие теоретические методы все еще далеки от идеала, и их предсказания нуждаются в экспериментальной верификации. Поэтому крайне востребованы точные экспериментальные методы измерения параметров взаимодействия белков и малых молекул для решения фундаментальных и прикладных задач, таких как изучение внутриклеточных процессов и создание новых лекарств. В этом обзоре мы рассматриваем три хорошо зарекомендовавших себя современных биофизических подхода для определения аффинности, стехиометрии энергетике взаимодействия белков и лигандов: метод изотермической титрационной калориметрии, метод микротермофореза и метод поверхностного плазмонного резонанса. Особое внимание уделяется развитию технических возможностей этих методов в последние годы, тонкостям их практического использования и иллюстрациям их применения для решения конкретных биофизических задач в фармакологии.

Ключевые слова: изотермическая титрационная калориметрия, микротермофорез, поверхностный плазмонный резонанс, белки, лиганды, разработка лекарств.

DOI: 10.1134/S000630291904001X

Значимость взаимодействия белков и лигандов в живых организмах сложно переоценить. Связываясь с малыми молекулами различной природы, белки могут менять свою конформацию и свойства, и благодаря этому выполнять самые разные задачи – от катализа биохимических реакций до переноса внутриклеточных грузов. Такие лиганды, как природные и синтетические яды, подавляют физиологические функции белков. Лиганды-лекарства создаются или подбираются человеком для того, чтобы непосредственно взаимодействовать с ключевыми участниками биохимических реакций и модифицировать их свойства для достижения нужного медицинского эффекта. Так, например, большинство антибиотиков с точки зрения влияния на внутриклеточные процессы являются ингибиторами жизненно

важных путей метаболизма в бактериальной клетке [1].

Современные методы предоставляют широкие возможности для поиска новых лигандов для задач фармакологии. В классическом варианте для отбора молекул-лигандов используют многоэтапный процесс, включающий в себя предварительный биоинформатический анализ потенциальных лигандов, экспериментальную проверку взаимодействия, дальнейшую модификацию молекулы для улучшения ее лекарственных свойств [2,3]. Вычислительные методы позволяют моделировать взаимодействие лигандов с выбранной мишенью *in silico* и предсказывать с помощью молекулярного докинга и других методов вероятность связывания конкретного лиганда с активным центром выбранной мишени. Это дает возможность отсеять малоперспективные соединения еще до начала эксперимента *in vitro* и уменьшить временные и ресурсные затраты [2]. Однако отобранные на этом этапе молекулы в дальнейшем требуют экспериментальной проверки по ряду параметров, целью которой в

Сокращения: ИТК – изотермическая титрационная калориметрия, МТФ – микротермофорез, ППР – поверхностный плазмонный резонанс, LrxC – уридиндифосфат-3-О-ацил-N-ацетилглюкозаминадацетилаза.

первую очередь является установление факта взаимодействия потенциальных лигандов с белком-мишенью. Во-вторых, следует учитывать, что понимание взаимодействия белка и лиганда в терминах поиска эффективного лекарственного средства лежит за пределами простого принципа «все или ничего», есть взаимодействие или нет. Для эффективной оценки молекулы в качестве потенциального ингибитора требуются количественные характеристики, такие как аффинность и специфичность образования комплекса. Для определения этих величин на помощь классической биологии приходит физика, а именно термодинамика и оптика.

На настоящий момент существует несколько методик, позволяющих экспериментально измерять ключевые параметры взаимодействия лигандов с белком-мишенью. Они широко применяются в фармакологии и лабораторных исследованиях для создания новых лекарственных препаратов. Какой из подходов выбрать для проведения исследования зависит от доступности метода, его возможностей, преимуществ и недостатков. Для определения ключевой характеристики взаимодействия молекул, константы связывания, в арсенале современного исследователя есть ряд методик, из которых широкое практическое применение имеют методы изотермической титрационной калориметрии (ИТК) [4], микрокалориметрии (МКФ) [5] и поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [6]. В настоящем обзоре эти три метода будут рассмотрены с точки зрения области применения, точности, информативности и удобства использования для потенциального исследователя.

ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ ТИТРАЦИОННАЯ КАЛОРИМЕТРИЯ

Метод изотермической титрационной калориметрии (ИТК) основан на прямом измерении температуры в системе взаимодействующих молекул. Выделение или поглощение тепла является практически универсальным свойством реакций взаимодействия и наблюдается как при образовании ковалентных связей, так и при перестройке и образовании нековалентных, в первую очередь водородных, связей [7]. В отличие от оптических и химических методов, измерение тепла в системе не требует специальных реагентов и модификаций изучаемых веществ, таких как, например, присоединение флуорофора. Все это позволяет изучать методом ИТК взаимодействие широкого спектра молекул в водном растворе в среде, приближенной к естественной. На настоящий момент метод ИТК является общепринятым и одним из наиболее употребительных способов измерения основных термодинамических показателей взаимодействия в системе «белок–

лиганд» [8,9]. Под основными термодинамическими параметрами подразумеваются изменение энтальпии (ΔH), изменение энтропии (ΔS), изменение свободной энергии Гиббса (ΔG), а также равновесная константа диссоциации (K_d) и стехиометрия (n) взаимодействия лиганда с белком-мишенью.

Впервые титрационная калориметрия была предложена для измерения константы равновесия реакций формирования металл-ионных комплексов и окислительно-восстановительных реакций [10]. В оригинальных работах были оценены погрешности метода: случайные, привносимые в процессе титрования погрешности составили 0,4%, ошибка оценки калориметром выделяемого тепла не превышала 0,1%. В сумме метод позволял вычислить равновесную константу ассоциации в пределах 10^4 – 10^5 M^{-1} . С появлением более чувствительных калориметров метод ИТК был применен для изучения биологических объектов [11]. В последующем развитие метода шло в плоскости количественной оценки равновесной константы диссоциации биологических молекул. Более широкое практическое применение метод получил после создания первого коммерческого прибора MicroCal. В работе [4] приводится подробная схема работы прибора и принцип метода ИТК. На сегодняшний день производится несколько модификаций калориметров с разной степенью автоматизации процесса и производительностью.

Рассмотрим принцип работы ИТК. Если создать условия, отвечающие понятию «закрытая система», и измерить тепло, выделяемое или поглощаемое в результате взаимодействия молекул в этой системе, то мы можем рассчитать изменение энтальпии системы и связанные с ней параметры [7]. Этот принцип и лежит в основе метода ИТК. Измерительная часть прибора для определения констант равновесия методом ИТК состоит из двух ячеек, контрольной и рабочей, окруженных адиабатической оболочкой. К каждой ячейке подсоединен сверхчувствительный калориметр, сенсор и нагреватель (рис. 1). В рабочую ячейку с раствором макромолекул с помощью шприца вносится определенное количество растворенного лиганда с последующим автоматическим перемешиванием (шприц оснащен ротационной установкой, которая позволяет перемешивать раствор в ячейке с образцом). Изменение тепла регистрируется сверхчувствительным калориметром (чувствительность $\pm 0,5$ ккал). При взаимодействии внесенной доли лиганда с белком выделяется тепло ΔQ согласно следующему уравнению:

$$\Delta Q = \Delta H \Delta[L_b]V, \quad (1)$$

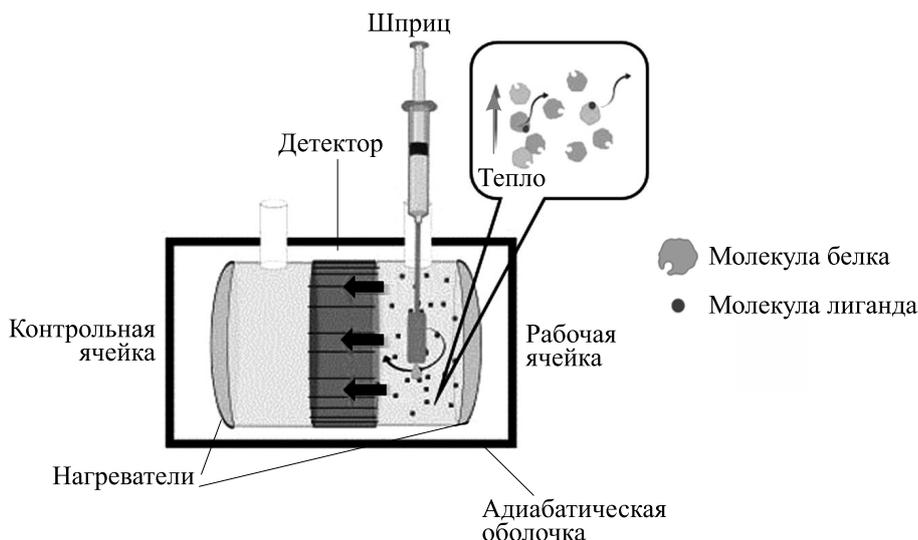


Рис. 1. Схема устройства изотермического титрационного калориметра с рабочей и контрольной ячейками, шприцом для введения раствора лиганда и детектором изменения температуры.

где ΔH – удельная энтальпия взаимодействия одного белка и одного лиганда, $\Delta[L_b]$ – изменение концентрации связанного лиганда при добавлении очередной инъекции лигандов в раствор с белком, V – объем экспериментальной камеры.

В ответ на введение очередной порции лиганда в раствор с белком-мишенью сенсор обнаруживает разницу температур между ячейками, происходит включение нагревателей и температура выравнивается до исходного уровня. В результате

прибор регистрирует сигнал в виде пика мощности, потребовавшейся для компенсации выделенной в результате взаимодействия теплоты (рис. 2). Высота и ширина регистрируемого пика зависят от разницы температур и времени, потребовавшегося на возвращение температуры к исходной [4]. Затем процесс повторяется с равным шагом по времени для следующего объема добавленного лиганда. В результате система достигает момента, когда добавление очередной порции лиганда уже не приводит к детектируемому изменению темпе-

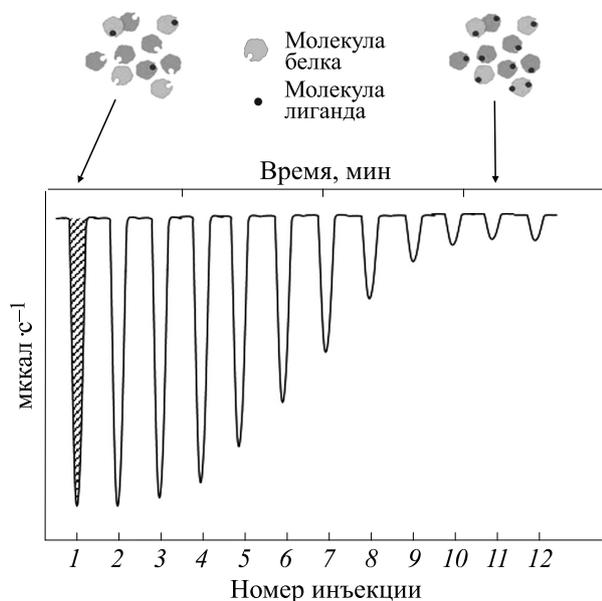


Рис. 2. Схематическое изображение изменения температуры в рабочей камере изотермического титрационного калориметра при титровании лиганда.

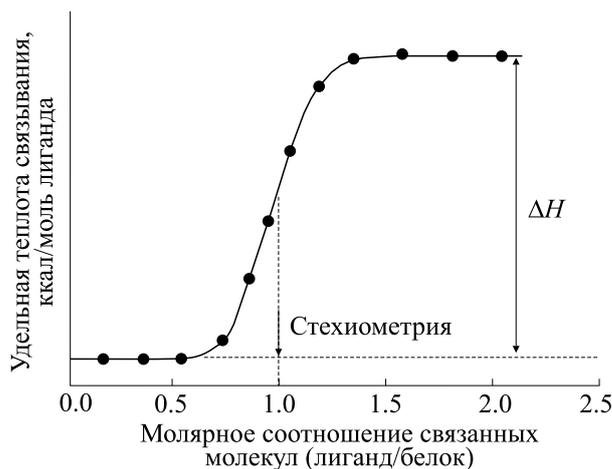


Рис. 3. Схематическое изображение кривой зависимости удельной теплоты связывания лиганда от их молярного соотношения, получаемой в результате обработки экспериментальных данных, полученных методом изотермической титрационной калориметрии.

ратуры ячейки, так как весь белок образовал комплекс с лигандами.

Затем каждый пик, соответствующий изменению температуры в системе, интегрируется по времени (рис. 2, заштрихованная область) и делится на количество добавленных лигандов для получения зависимости удельной теплоты реакции от молярного соотношения концентраций белка и лиганда (рис. 3). Этот график позволяет вычислить термодинамические параметры взаимодействия «белок–лиганд» следующим образом.

Рассмотрим связывание лиганда L с белком P, предполагая простейшую реакцию их взаимодействия:



Константа связывания K_a такой реакции выражается как соотношение концентраций комплекса «белок–лиганд» [PL] и произведения концентраций свободного белка [P] и свободного лиганда [L]:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}. \quad (3)$$

Параметр связывания v в случае n независимых эквивалентных сайтов связывания на поверхности белка определим как отношение концентрации связанных лигандов $[L_b]$ к полной концентрации белка $[P_T]$ [12]

$$v = \frac{[L_b]}{[P_T]} = \frac{n[PL]}{[P] + [PL]} = \frac{nK_a[P][L]}{[P] + K_a[P][L]} = \frac{nK_a[L]}{1 + K_a[L]}. \quad (4)$$

Суммарное количество тепла Q после добавления некоторого количества инъекций лиганда к раствору белка можно представить в виде следующего уравнения:

$$Q = \Delta H [L_b] V = \Delta H v [P_T] V = \Delta H \frac{nK_a[L]}{1 + K_a[L]} [P_T] V. \quad (5)$$

Точная концентрация несвязавшихся лигандов [L] в каждый момент времени неизвестна, но

может быть вычислена как разность между общей концентрацией лигандов $[L_T]$ и концентрацией связанных лигандов $[L_b]$:

$$[L] = [L_T] - [L_b] = [L_T] - \frac{Q}{\Delta H V}. \quad (6)$$

Подставляя уравнение (6) в уравнение в (5), получим:

$$\frac{K_a}{\Delta H V} Q^2 - (1 + K_a [L_T] + nK_a [L_T]) Q + \Delta H n K_a [P_T] [L_T] V = 0. \quad (7)$$

Отсюда можем выразить Q :

$$Q = \frac{\Delta H V}{2K_a} \left(1 + K_a [L_T] + nK_a [P_T] - \sqrt{(1 + K_a [L_T] + nK_a [P_T])^2 - 4nK_a^2 [P_T] [L_T]} \right). \quad (8)$$

При условии, что смешивание происходит небольшими порциями, можем приближенно считать:

$$\frac{\Delta Q}{\Delta [L_T]} \approx \frac{dQ}{d[L_T]}. \quad (9)$$

Значит, для получения графика зависимости удельной теплоты, выделившейся при добавлении лиганда к раствору белка, от молярного соотношения лиганда и белка $\frac{[L_T]}{[P_T]}$, можем продифференцировать выражение (8) по $[L_T]$ и разделить обе части уравнения на объем экспериментальной камеры V :

$$\frac{1}{V} \frac{dQ}{d[L_T]} = \frac{\Delta H}{2} \left(1 - \frac{1 + K_a [L_T] - nK_a [P_T]}{\sqrt{(1 + K_a [L_T] + nK_a [P_T])^2 - 4nK_a^2 [P_T] [L_T]}} \right). \quad (10)$$

Это уравнение описывает кривую на рис. 3. При стремлении соотношения $\frac{[L_T]}{[P_T]}$ к нулю получаем значение удельного изменения энтальпии ΔH при связывании лиганда с белком. Оно представляет собой количество тепла, выделенного или поглощенного системой, которое отражается на графике как высота кривой от основания до плато. При известных K_a и ΔH можно рассчитать такие термодинамические параметры как свободную энергию Гиббса (ΔG) и изменение энтропии системы (ΔS). Эти параметры связаны с вычисленными K_a и ΔH следующим уравнением:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a = \Delta H^0 - T\Delta S^0, \quad (11)$$

где R – газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Таким образом, метод ИТК позволяет количественно оценить целый ряд термодинамических параметров взаимодействия белка и лиганда: K_a , n , ΔH , ΔG , ΔS . При этом только K_a , n и ΔH измеряются напрямую из уравнения (10), а ΔG и ΔS вычисляются косвенно на основе уравнений (11).

От чего зависит точность определения этих параметров? В межлабораторном исследовании, проведенном Ассоциацией биомолекулярных исследовательских центров (Association of Biomolecular Resource Facilities – ABRF, Bethesda, США), метод ИТК применяли для изучения взаимодействия хорошо изученной пары «фермент – ингибитор». Один из выводов этого исследования состоял в том, что наибольший вклад в ошибку измерения константы связывания вносят неточности приготовления растворов при взвешивании и растворении [8]. Вторым фактором, влияющим на точность измерения, является соотношение концентраций белка и лиганда в эксперименте. Чтобы более детально понять характер этой зависимости, обратимся к формуле (10).

Рассмотрим случай, когда $\frac{[L_T]}{[P_T]} = n$, вводя параметр $C = nK_a[PT]$:

$$\frac{1}{V} \frac{dQ}{d[L_T]} = \frac{\Delta H}{2} \left(1 - \frac{1}{\sqrt{1+4C}} \right). \quad (12)$$

На рис. 4 схематически представлены кривые с разным значением C при равных K_a . Как видно, при достаточно большом C на графике различимы ΔH и точка перегиба функции, абсцисса которой дает значение стехиометрического коэффициента n , а наклон графика в этой точке дает константу равновесия K_a . При малых значениях параметра C определение характеристик взаимодействия «белок–лиганд» становится затруднительным, так как не удается легко определить

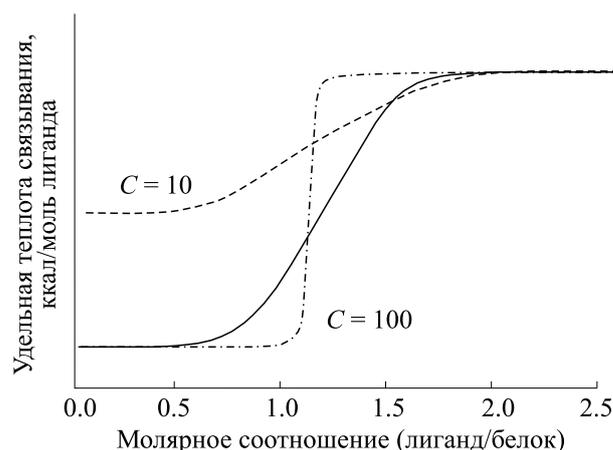


Рис. 4. Схематическое изображение кривых, получаемых при обработке экспериментальных данных, полученных методом изотермической титрационной калориметрии, при разных значениях параметра C . Пунктирные линии соответствуют значениям $C = 10$ и $C = 100$. Для сравнения приведена кривая при оптимально подобранном параметре C около 30 (сплошная линия).

точку перегиба. Как правило, при $C < 20$ ошибка измерения K_a становится существенной [8].

Само значение аффинности связывания «белок–лиганд» определяет требования к минимальной концентрации белка, необходимой для измерения методом ИТК. Чем выше аффинность связывания «белок–лиганд», тем меньшая концентрация белка требуется. Так, для пар «белок–лиганд» с высокой аффинностью взаимодействия, например, антитело и его мишень, требуется низкая концентрация белка в растворе [13]. При проведении поиска веществ в качестве лигандов для некоторого белка-мишени, как в случае скрининга потенциальных лекарств, константа связывания априори неизвестна, а значит, проблематично не только выбрать оптимальную концентрацию белка для измерений, но и соотношение белка и лиганда, определяющее значение параметра C . В таких случаях общими эмпирическими рекомендациями являются следующие: концентрация лиганда должна быть в 10 раз больше концентрации белка, концентрация белка – не менее 5 мкМ [14].

Следует также учитывать, что изменения энтальпии, регистрируемые при измерениях, происходят от различных взаимодействий, включающих перегруппировку молекул, образование неспецифических связей, перемешивание растворителей и прочее [9]. Поскольку прибор ИТК не в состоянии различить источники появления разницы температур в системе, чрезвычайно важна постановка соответствующих контролей. Для проведения реакции желательно использовать препараты белка и лиганда высокой степени очистки, сравнимой с требованиями для

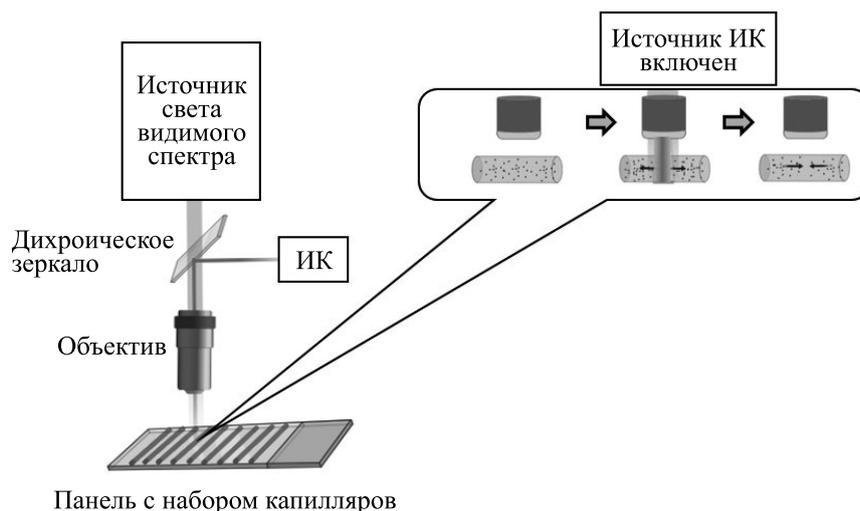


Рис. 5. Схема устройства прибора для измерения равновесной константы диссоциации методом микротермофореза с двумя источниками света — видимого и инфракрасного. На врезке — процесс термодиффузии и диффузии флуоресцентно меченого белка в капилляре в результате включения и выключения инфракрасного света соответственно.

кристаллизации белка в рентгеноструктурном анализе [15].

Таким образом, постановка эксперимента методом ИТК требует тщательной предварительной подготовки, включающей в себя внимательное приготовление растворов исследуемых веществ и оптимальный подбор соотношения их концентраций для получения релевантных данных. Учитывая существенный объем исследуемого препарата (около 300 мкл), необходимый для проведения одного эксперимента, для скрининга новых лигандов требуется большое количество белка высокой степени очистки. Это объясняет, почему ИТК в настоящее время часто используют для вторичного скрининга целевых молекул, способность которых связываться с белком-мишенью уже была установлена другими методами [16–18].

МИКРОТЕРМОФОРЕЗ

Метод микротермофореза основан на явлении термодиффузии молекул в растворе с градиентом температуры. Это явление было обнаружено и описано в 1856 г. [19], однако практическое применение явление получило только с появлением современных оптических технологий и точных методов детекции флуоресценции.

Для измерения аффинности молекул методом микротермофореза небольшую область стеклянного капилляра (около 25 мкм) с образцами в растворе облучают инфракрасным лазером, в результате чего происходит нагрев на 2–6 К (рис. 5). Под действием градиента температуры молекулы начинают диффундировать в нагретую область или из нее. Скорость и направление движения молекул зависят от размера, заряда, сольватной

оболочки и других параметров [20,21]. Чаще это движение направлено из области с более высокой температурой в область с более низкой [5]. Таким образом, в области нагрева инфракрасным лазером концентрация молекул изменяется. Если молекулы пометить флуоресцентной меткой, то изменение концентрации приведет и к изменению флуоресценции в области нагрева. Измеряя относительное изменение флуоресценции, можно судить об изменении концентрации вещества.

При отсутствии внешних сил устанавливается равновесие между потоками молекул, стремящимися выйти или зайти в нагретую область пространства из-за термодиффузии и потоками молекул, стремящимися выровнять концентрацию из-за обычной диффузии. В результате в более нагретой и менее нагретой частях пространства устанавливается соотношение концентраций [21]:

$$\frac{C_{\text{hot}}}{C_{\text{cold}}} = \exp(-S_i \Delta T), \quad (13)$$

где C_{hot} и C_{cold} — концентрации молекул в теплой и холодной областях соответственно; ΔT — разность температур между этими областями, S_i — коэффициент Сорэ, равный отношению коэффициента термодиффузии к коэффициенту обычной диффузии молекул.

Теория термофореза на данный момент до конца не построена и продолжают разрабатываться модели этого явления. Ниже приведем некоторые соображения, которые были предложены для расчета коэффициента Сорэ. Предполагая, что малые изменения концентрации молекул в нагретой области (δc) приводят к малым изменениям свободной энергии

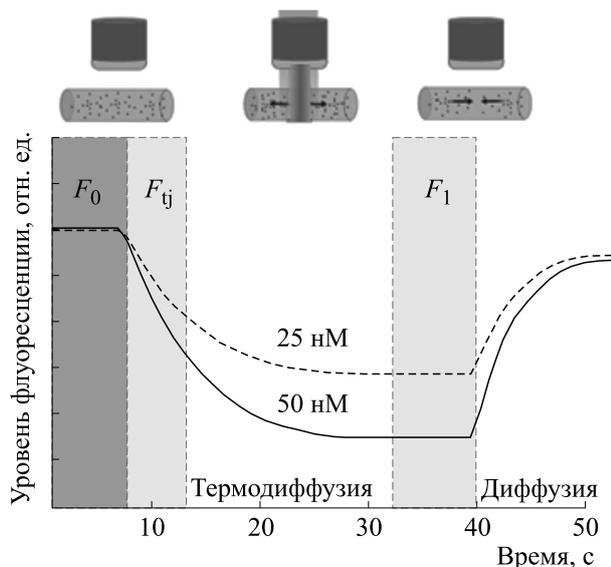


Рис. 6. Схема кривой изменения уровня флуоресценции при микротермофорезе, где F_0 – начальный уровень флуоресценции до включения инфракрасного лазера, F_{tj} и F_1 – изменение флуоресценции в измеряемой области капилляра после включения инфракрасного лазера. На рисунке схематично представлены графики для двух концентраций лиганда – 50 и 25 нМ.

(δG), можно записать уравнение термодинамического равновесия: $\delta c/c = \delta G/kT$ [20]. С другой стороны, $\delta c/c = S_t \delta T$. Отсюда коэффициент S_{ore} можно вывести как производную свободной энергии по температуре:

$$S_t = D_t/D = (kT)^{-1} \times \frac{\partial G}{\partial T}. \quad (14)$$

Изменение свободной энергии ∂G можно представить как сумму: $\partial G = -S\partial T + V\partial p + \mu\partial N$, где S – энтропия системы, V – объем, p – давление, μ – химический потенциал, N – число частиц. Отсюда при постоянном давлении и для отдельной частицы имеем, что коэффициент S_{ore} равен отрицательной энтропии системы «частица–растворитель», выраженной в единицах абсолютной температуры (kT). Основной вклад в энтропию S вносят два слагаемых: энтропия гидратации (ΔS_{hyd}) и энтропия экранирования заряженной частицы ионами [22]. Вынося за скобки площадь поверхности частицы и выражая энтропию экранирования ионами через поверхностный заряд (σ_{eff}) и Дебаевский радиус экранировки (λ_{DH}), имеем [20]:

$$S_t = \frac{A}{kT} \left(-\Delta S_{hyd} + \frac{\beta \sigma_{eff}^2}{4\epsilon \epsilon_0 T} \Delta \lambda_{DH} \right), \quad (15)$$

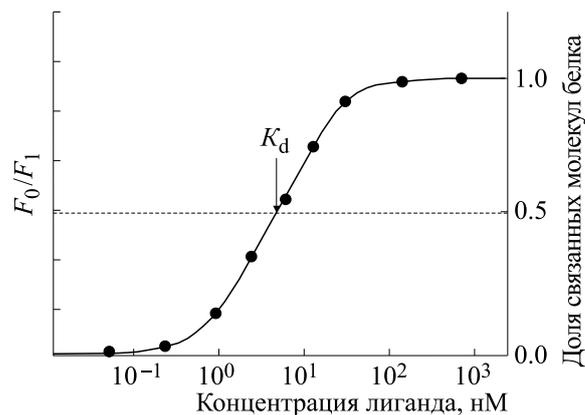


Рис. 7. Схема графика зависимости удельного уровня флуоресценции ΔF_{norm} от концентрации лиганда для определения равновесной константы диссоциации по данным микротермофореза

где A – эффективная площадь поверхности частицы, ΔS_{hyd} – приведенная энтропия гидратации (на единицу поверхности), ϵ – диэлектрическая проницаемость среды; ϵ_0 – электрическая постоянная; β – фактор, вычисляемый по зависимости диэлектрической проницаемости раствора от температуры.

Таким образом, из формулы (15) становится очевидно, что на термодиффузию частицы влияет ряд ее характеристик, изменение каждой из которых при связывании частицы с другой частицей (например, лигандом) может менять величину коэффициента S_{ore} . Так, например, взаимодействие двух белков будет изменять площадь поверхности молекулы A и приведенную энтропию гидратации ΔS_{hyd} . Взаимодействие небольших заряженных молекул с белком должно повлиять на поверхностную плотность заряда комплекса σ_{eff} .

Применение термофореза для определения констант связывания биомолекул предложено сравнительно недавно [23]. Довольно скоро после начальной формулировки концепции метода был проведен ряд экспериментов на пробной установке для капиллярного термофореза. Эта постановка измерений получила название микротермофорез [5]. Современные приборы для измерения аффинности взаимодействий биомолекул методом МТФ совмещают в себе элементы флуоресцентного микроскопа и капиллярного электрофореза (рис. 5). Одним из основных производителей является компания NanoTemper Technologies (Германия). Производимый ею прибор включает источник инфракрасного излучения (инфракрасный лазер, 1480 нм), источники света с разной длиной волны, детектор флуоресценции и подложку с 16 тонкими капиллярами.

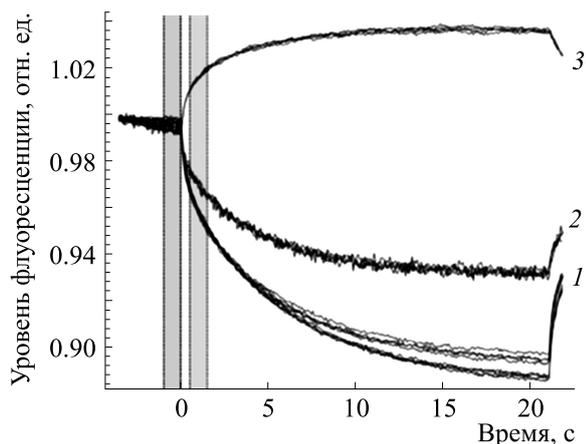


Рис. 8. Вид кривых изменения уровня флуоресценции относительно начальной флуоресценции при проведении микротермофореза в оптимальных условиях (отсутствие адсорбции и агрегации меченых молекул): 1 – изменение уровня флуоресценции контрольных образцов (меченая молекула в буфере) в результате термодиффузии, 2 – изменение уровня флуоресценции в результате термодиффузии при взаимодействии меченой мишени с лигандом А, 3 – изменение уровня флуоресценции в результате термодиффузии при взаимодействии меченой мишени с лигандом Б.

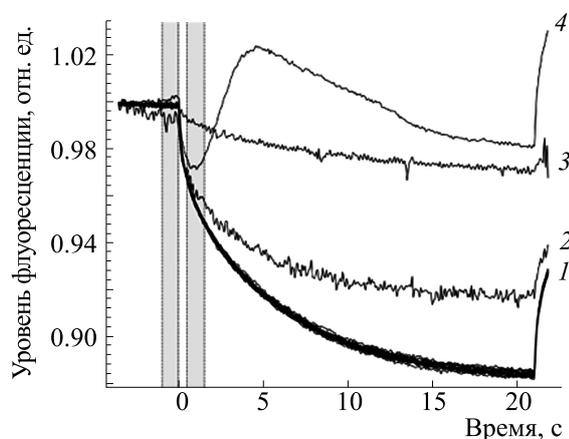


Рис. 9. Вид кривых изменения уровня флуоресценции относительно начальной флуоресценции в экспериментах по микротермофорезу при возникновении проблем: 1 – изменение уровня флуоресценции контрольных образцов (меченая молекула в буфере) в результате термодиффузии, 2 – изменение уровня флуоресценции в результате термодиффузии при низком уровне начальной флуоресценции с высоким шумом (слабая степень мечения молекулы), 3 – изменение уровня флуоресценции в результате термодиффузии при адсорбции меченой мишени на стенках капилляра в контрольных образцах (наблюдается слабая термодиффузия), 4 – изменение уровня флуоресценции в результате термодиффузии при образовании агрегатов меченой мишени в контрольных образцах.

Съемка уровня флуоресценции в областях с высокой и низкой температурой происходит в режиме реального времени. На рис. 6 представлен цикл работы прибора МТФ, включающий в себя регистрацию флуоресценции раствора белка до включения инфракрасного источника (участок F_0), затем изменение флуоресценции после включения инфракрасного лазера в процессе термофореза (участок F_1), и последующее восстановление уровня флуоресценции в результате диффузии молекул после его выключения. Оценка термодиффузионной подвижности молекул опирается на изменение флуоресценции ΔF_{norm} согласно следующему уравнению: $\Delta F_{\text{norm}} (\%) = \frac{F_0}{F_1}$.

Измеряя изменение флуоресценции ΔF_{norm} для различных концентраций добавленного лиганда, определяется константа его взаимодействия с белком K_d (рис. 7). Вид кривых изменения относительной флуоресценции в реальном эксперименте представлен на рис. 8.

Метод МТФ основан на оптическом измерении флуоресценции, что накладывает свои ограничения и требования при подготовке и проведении эксперимента. В частности, поскольку большинство флуоресцентных органических красителей присоединяется через генно-инженерные таги или аминокислотные остатки цистеина или лизина, процесс мечения требует предварительного анализа структуры белка и в некоторых случаях – внесения модификаций, что может

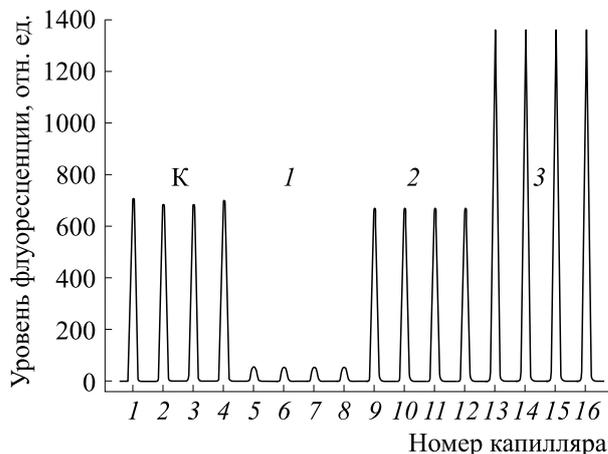


Рис. 10. Влияние лигандов на начальную флуоресценцию меченой молекулы в экспериментах по микротермофорезу: 1–4 – капилляры с контролем к (меченая молекула в буфере), 5–8 – капилляры с меченой молекулой и веществом 1 (гашение флуоресценции), 9–12 – капилляры с меченой молекулой и веществом 2 (нет влияния на начальный уровень флуоресценции), 13–16 – капилляры с меченой молекулой и веществом 3 (усиление начальной флуоресценции) (наши экспериментальные данные)

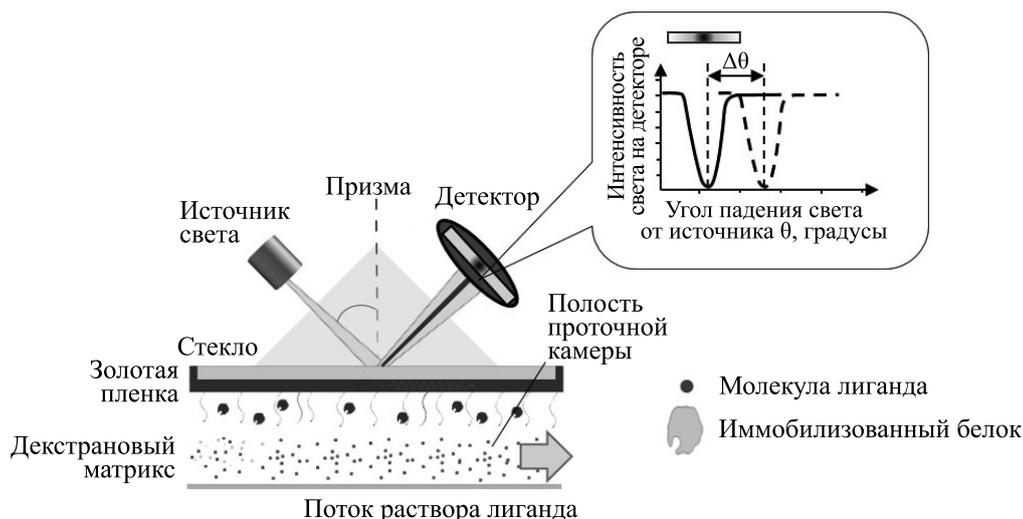


Рис. 11. Схема устройства прибора для измерения равновесной константы диссоциации методом поверхностного плазмонного резонанса с источником света, детектором отраженного света и чипом с иммобилизованным белком. На врезке – изменение интенсивности отраженного света, регистрируемое детектором при возникновении плазмона и принцип регистрации резонансного угла θ .

повлиять на функциональную активность исследуемой мишени и исказить данные о связывании с лигандом [24–26]. На настоящий момент существует подход измерения термодиффузии в МТФ без внесения флуоресцентной метки по внутренней флуоресценции остатков тирозина в белке [27]. Однако этот подход требует использования высокоочищенного белка из-за неспецифичности возникающего флуоресцентного сигнала и подходит не для всех белков.

Поскольку измерение флуоресценции проводится в небольшом объеме капилляра, любые погрешности в толщине стенки и диаметре капилляра будут сказываться на наблюдаемом уровне флуоресценции. Как следствие, метод требователен к качеству капилляров с точки зрения прозрачности стекла и допустимого диапазона размеров [28]. Погрешности в методе может внести адсорбция флуоресцентно меченых молекул на стенки капилляра или их агрегация в растворе, что приводит к искажению кривых термодиффузии (рис. 9). Избавиться от нежелательной адсорбции можно, используя специальные капилляры с гидрофобным или гидрофильным покрытием, а также добавляя детергент в раствор [29,30].

В некоторых случаях лиганды могут вызывать гашение или усиление начальной флуоресценции молекул еще до включения инфракрасного лазера, что также может отразиться на результатах расчета K_d методом МТФ [16,31,32]. На рис. 10 представлены данные, полученные с помощью прибора Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Германия), иллюстрирующие гашение и усиление начальной флуоресценции в эксперименте по исследованию взаимодействия белка с присо-

единенным зеленым флуоресцентным белком EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) в концентрации 50 нМ с тремя разными веществами в сравнении с контролем (белок с растворителем). Изменение флуоресценции в присутствии лиганда может происходить по различным механизмам, наиболее распространенными из которых являются динамическое и статическое тушение [33]. При динамическом тушении квантовый выход флуоресценции уменьшается за счет повышения вероятности безызлучательных переходов флуорофора из возбужденного состояния. Это может происходить как в результате столкновительных взаимодействий между лигандом и белком, так и при их непосредственном связывании. В этих случаях тушение может быть обусловлено ферстеровским резонансным переносом энергии от флуорофора белка к лиганду или изменением локального водно-ионного окружения флуорофора в результате связывания лиганда в его окрестности [34]. При статическом тушении флуоресценции лиганд ингибирует, наоборот, само формирование возбужденного состояния флуорофора, с которым он связан, полностью подавляя его флуоресценцию. Метод МТФ, как правило, не учитывает изменение флуоресценции при добавлении лиганда, поскольку уровень сигнала до нагревания всегда принимается за единицу, и рассматривается его относительное изменение в результате повышения температуры. При наличии тушения появляется выраженное изменение интенсивности сигнала МТФ (temperature-related intensity change). Это происходит потому, что квантовый выход флуоресценции понижается с повышением температуры при динамическом ту-

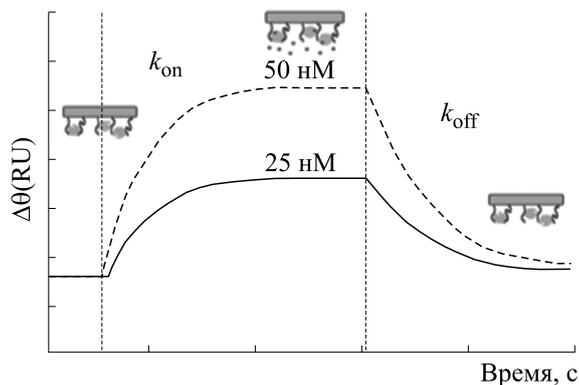


Рис. 12. Общий вид кривой зависимости от времени изменения угла $\Delta\theta$, при котором возникает плазмонный резонанс в металлическом покрытии чипа, при связывании лиганда с иммобилизованной молекулой. На рисунке схематично представлены графики для двух концентраций лиганда – 50 и 25 нМ.

шении, и, наоборот, повышается при статическом тушении (из-за уменьшения аффинности в системе «лиганд–белок») [35]. При этом, как понятно из описания его природы, данный эффект не обязательно свидетельствует о существовании прямого взаимодействия между белком и лигандом и может иметь, например, столкновительный механизм. Поэтому для правильной интерпретации результатов экспериментов требуется контрольное дополнительное измерение в присутствии флуорофора без белка и с тем же лигандом [33].

Отличить вклад влияния лиганда на флуоресценцию от термофореза можно по кинетике наблюдаемого явления. Термофорез занимает несколько секунд, в то время как температурная зависимость эффекта лиганда как правило проявляется значительно быстрее, с постоянной времени до 100 мс. Это позволяет использовать зону быстрой кинетики (F_{ij} на рис. 6) для расчета константы связывания вместо зоны F_1 при классическом подходе. В работе [29] показано, что вы-

числяемая величина K_a может различаться в пять раз в зависимости от выбранной зоны сравнения.

Отдельного внимания заслуживает проблема неклассической формы кривой зависимости изменения флуоресценции от концентрации лиганда. Определение K_a методом МТФ по умолчанию предполагает стехиометрию связывания 1:1. При наличии в системе «белок–лиганд» двух сайтов связывания и более возникает наложение кривых связывания, что затрудняет вычисление K_a [28,36]. Расчет констант для каждого сайта связывания по данным МТФ возможен только при условии достаточной разницы между K_a первого и второго сайта связывания [37].

ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПЛАЗМОННЫЙ РЕЗОНАНС

Измерение равновесных констант связывания «белок–лиганд» с помощью поверхностного плазмонного резонанса основано на регистрации уменьшения доли отраженного от металлической

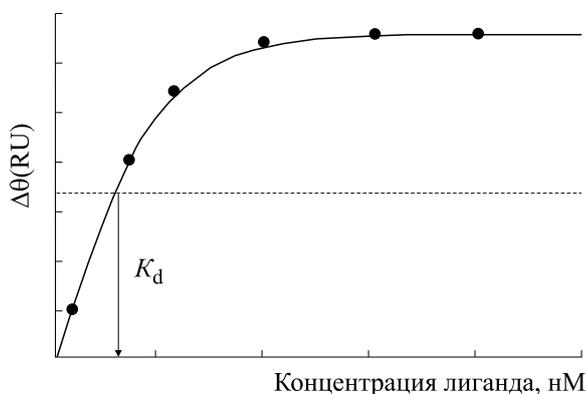


Рис. 13. Схематическое изображение графика зависимости $\Delta\theta$ от концентрации лиганда для расчета равновесной константы диссоциации методом поверхностного плазмонного резонанса.

пленки света в результате перехода части энергии в плазмон. Плазмон называют волну электронной плотности, которая возникает в тонких металлических пленках (толщина несколько десятков нанометров) при облучении электромагнитным излучением, например, видимым светом, под определенным углом. Этот угол называется резонансным и обозначается θ .

Впервые метод ППР для измерения аффинности биологических объектов был применен в 1983 г. [38], а его широкое практическое применение началось после выпуска первого коммерческого прибора «Viasage» (Упсала, Швеция) [6,39]. Основа аппарата для измерения равновесных констант методом ППР включает в себя оптическую часть и чип (рис. 11).

Оптическая часть прибора в классическом варианте включает в себя источник поляризованного света, призму с большим коэффициентом преломления n_p и детектор для измерения интенсивности отраженного света (рис. 11). Световая волна источника, распространяющаяся в призме, падает на металлическую пленку чипа. Часть света при этом отражается на детектор, а часть проходит в металл в форме экспоненциально затухающей волны перпендикулярно поверхности раздела сред. При падении света под резонансным углом волна способна возбудить поверхностный плазмон в металлической пленке. При этом интенсивность отраженного света на детекторе резко падает (рис. 11), что регистрируется прибором.

Вторая часть прибора (чип) представляет собой проточную камеру, одна сторона которой покрыта тонким слоем металла (толщиной порядка десятков нанометров). Материалом для металлической пленки обычно служат золото или серебро. К поверхности пленки прикрепляется (иммобилизуется) один из участников взаимодействия в планируемом эксперименте. На сегодняшний день компаниями производится огромное разнообразие готовых чипов с покрытием на металле для иммобилизации целевой молекулы широким набором способов [40]. На рис. 11 показан пример чипа с декстрановым слоем для ковалентного связывания белка на поверхности [41]. Второй партнер взаимодействия прокачивается в водном растворе через проточную камеру при постоянной скорости потока.

При введении раствора лиганда в проточную камеру, по мере его связывания с целевой молекулой белка, резонансный угол θ начинает смещаться в результате изменения локального коэффициента преломления на поверхности чипа, что регистрируется прибором в реальном времени в виде графика, представленного на рис. 12. Угол θ изменяется в узком диапазоне, поэтому для оценки его величины применяют условные единицы ответа (response unit, RU). Смещение угла θ на $0,1^\circ$

соответствует 1000 RU. Обычно величина 1 RU соответствует изменению плотности связывания белка на чипе в 1 пг/мм^2 .

На основании полученных данных вычисляется константа скорости ассоциации белка и лиганда $k_{\text{он}}$. После достижения плато в проточную камеру вводится раствор без лиганда для регистрации процесса диссоциации связавшихся молекул с последующей оценкой константы скорости диссоциации ($k_{\text{офф}}$, рис. 12). Затем в камеру можно ввести следующий раствор лиганда и т.д. На основании полученных кинетических констант можно рассчитать равновесную константу диссоциации: $K_d = \frac{k_{\text{офф}}}{k_{\text{он}}}$.

Альтернативно равновесную константу диссоциации (K_d) получают при построении графика зависимости изменения резонансного угла на плато кинетического графика от концентрации лиганда в серии экспериментов (рис. 13).

Таким образом, метод ППР позволяет напрямую определить кинетические константы взаимодействия молекул без использования каких-либо меток. При проведении серии экспериментов методом ППР по связыванию пары «белок—лиганд» при разных температурах можно рассчитать изменение энтальпии ΔH , энтропии и свободной энергии Гиббса по измеренной зависимости K_d от температуры [42]. Получаемые с помощью метода ППР термодинамические параметры сравнимы с данными, полученными в экспериментах с ИТК [8]. Дополнительно, используя уравнение Эйринга, по температурным зависимостям кинетических констант ассоциации и диссоциации белка можно рассчитать энтропию и энтальпию активации в рамках теории активированного комплекса [42].

Метод ППР подходит для скрининга больших библиотек веществ благодаря относительно высокой скорости (2300 веществ в сутки) и проверке не только факта связывания, но и получения количественных параметров реакции. Возможность использовать чип повторно в серии опытов существенно снижает расход белка и сокращает время подготовки и проведения эксперимента.

Метод ППР имеет ряд своих особенностей, которые могут отразиться на точности получаемого результата. Так, при взаимодействии молекул метод ППР дает более точные результаты при большой массе связывающегося лиганда (чем больше масса связывающегося лиганда, тем больше сигнал, получаемый на приборе и тем легче и точнее его можно измерить). Таким образом, в экспериментах с проверкой взаимодействия малых молекул с белками целесообразнее иммобилизовать белки на поверхности чипа, а свободный белок вводить в раствор. Однако стандарт-

Таблица 1. Сравнение параметров методик по определению равновесной константы связывания белка и лиганда

Параметры	ИТК	МТФ	ППР
Измеряемые параметры в одной реакции	$K_a, n, \Delta H, \Delta G, \Delta S$	K_a	K_a, k_{on}, k_{off}
Чувствительность определения константы связывания	$10^{-9} < M < 10^{-2}$	$10^{-9} < M < 10^{-2}$	$10^{-7} < M < 10^{-3}$
Где измеряется взаимодействие?	В растворе	В растворе	На металлической подложке (чипе)
Объем образца белка для одной реакции	280–370 мкл	4 мкл	30 мкл
Концентрация белка для одной реакции	До 5 мкМ	1–10 нМ	Зависит от эксперимента и способа иммобилизации
Объем раствора лиганда для одной реакции	40–300 мкл	< 1 мкл	30 мкл
Концентрация раствора лиганда для одной реакции	До 100 мкМ	В 20 раз больше ожидаемой K_d	не менее 1 нМ для молекул меньше 10 кДа
Чистота образца белка и лиганда	Необходима как можно более высокая степень очистки	Не важно, можно использовать клеточный лизат или сыворотку крови	Рекомендуется (желательно) хорошо очищенный препарат
Требование дополнительных модификаций мишени	Нет	Да, флуоресцентный краситель	Нет
Временные затраты на эксперимент	42 образца за 24 ч (автоматические приборы); 8–12 образцов за 8 ч (неавтоматические приборы)	8–16 образцов за 8 ч	15 образцов за 5–15 мин; до 400 образцов за 24 ч; до 5000 образцов для автоматических приборов (зависит от их конфигурации)

Примечание. Данные приведены на основе методических пособий к приборам MicroCal (Malvern Instruments Limited, Великобритания), Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, Германия), Biacore (GE Healthcare, США).

ная химия иммобилизации не всегда позволяет проводить эксперимент в таком режиме, что ограничивает чувствительность метода.

В свою очередь, процесс иммобилизации белка может изменить его функциональность и доступность активного сайта для связывания, внося ошибку в измеряемую равновесную константу в результате двух эффектов – ограниченности скорости транспорта вещества в измерительной камере и возникновения дополнительных сайтов связывания. Ограниченность скорости транспорта вещества оказывает влияние на доступ лиганда к ППР-чипу, что может мешать правильному определению кинетики изучаемой реакции. Такое явление играет большую роль в случае высокой константы ассоциации в паре «белок–лиганд» при низкой скорости диффузии лиганда к поверхности. Для борьбы с этим эффектом важно устанавливать достаточно высокую скорость потока, более 30 мкл/мин, и использовать низкую плотность белка на поверхности [43]. Учесть и скорректировать наблюдаемые негативные эффекты также можно при построении и анализе модели взаимодействия на основе экспериментальных данных [44].

При иммобилизации и использовании проточной камеры может наблюдаться частичная деградация белка. В некоторых случаях это приводит к появлению искусственных низкоаффинных сайтов связывания, взаимодействие изучаемых молекул с которыми может регистрироваться как ложноположительный сигнал [43]. Учесть данную ошибку можно постановкой различных контрольных реакций.

Следует учитывать, что метод оценивает общее изменение свойств поверхности, но не показывает напрямую специфичность и стехиометрию взаимодействия. Эти данные можно получить в результате анализа модели взаимодействия изучаемых молекул [45].

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ РАССМОТРЕННЫХ МЕТОДОВ

Рассмотренные в статье три биофизических метода измерения равновесной константы связывания (диссоциации) имеют свои особенности и специфические характеристики, которые влияют на дизайн эксперимента по определению аффинности взаимодействующих веществ (таблица).

Метод ИТК зарекомендовал себя как высокоточный и дающий наибольшее количество термодинамических показателей взаимодействия в одном эксперименте [46,47]. Метод применяется для исследования взаимодействия белков и пептидов с различными молекулами в диапазоне размеров от отдельных ионов до полимерных струк-

тур, таких как микротрубочки [48–50]. Однако необходимость использовать большой объем реагентов и высокие требования к их чистоте и концентрации затрудняет его применение для массового скрининга молекул. На настоящий момент данный метод, как правило, используется при проверочном скрининге для подтверждения связывания лигандов, отобранных более высокопроизводительными и низкокзатратными методами, например, такими как МТФ, ППР или ядерный магнитный резонанс [16–18,51]. Большим преимуществом метода ИТК является определение стехиометрии и удельной энтальпии взаимодействия. Изменение энтальпии зависит от количества образованных связей между молекулами и степени погружения лигандов в глобулу белка [9,52], что помогает оценивать более перспективные лиганды согласно уравнению эффективности энтальпии (ЕЕ) для выработки стратегии дальнейшей модификации потенциальных лекарственных препаратов [46]: $EE = \frac{\Delta H}{M_L}$, где M_L – молекулярная масса лиганда, ΔH – изменение энтальпии.

Оценка термодинамических параметров взаимодействия позволяет получать представление о механизме связывания молекул с белком, что способствует более глубокому пониманию клеточных процессов [31,53–55] и оптимизации дизайна потенциальных лекарственных средств [56–58]. В качестве иллюстрации приведем пример поиска ингибиторов LpxC-2 и LpxC-4 к бактериальному ферменту уридиндифосфат-3-О-ацил-N-ацетилглюкозаминадацетилазе (LpxC). LpxC – ключевой фермент в синтезе компонентов наружной мембраны грам-отрицательных бактерий, что делает его перспективной мишенью для разработки новых антибиотиков [59]. Однако 20 лет поиска ингибиторов к этому белку не привели к обнаружению вещества с действием на широкий спектр патогенных видов бактерий. Были обнаружены лишь узкоспецифичные ингибиторы к конкретным вариантам этого белка, синтезируемым у двух разных видов бактерий [60,61]. При молекулярном моделировании взаимодействия этих белков с лигандами оба ингибитора образовывали по две водородные связи с белком при примерно равных расчетных константах диссоциации. Экспериментальная оценка K_d методом ИТК также показала равные значения константы диссоциации. Однако значения ΔH и ΔS у этих веществ различались, что указывало на образование дополнительных связей при взаимодействии с белком [62]. Последующие исследования с использованием методов флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии циркулярного дихроизма показали изменения конформации белка при взаимодействии с лигандами.

Эти данные и результаты по изменению энтальпии и энтропии позволили вычислить наиболее вероятные конформационные изменения LpxC и построить более точную модель взаимодействия в молекулярном докинге, что имеет важное значение для разработки перспективных антибиотиков следующего поколения.

Микротермофорез позволяет исследовать взаимодействие молекул в широком диапазоне размера и химической природы. Малый объем используемых компонентов и нетребовательность к составу буфера делает его удобным для первичного скрининга потенциальных лигандов. В обзорной статье [63] подробно разобраны примеры использования метода для определения констант равновесия для взаимодействия различных молекул. Наиболее успешно МТФ применяют для проверки и определения K_d белков и нуклеиновых кислот, в том числе аптамеров [23,30,64], что связано с высокой термофоретической подвижностью таких заряженных молекул, как ДНК и РНК [65]. Линейная зависимость коэффициента Соре от размера частиц позволяет использовать МТФ для поиска лигандов к агрегатам белков, что важно, например, для изучения болезней Альцгеймера и Паркинсона [21,66]. Обе патологии развиваются на фоне образования в клетках мозга агрегатов белков, богатых бета-слоями (например, альфа-синуклеин в случае болезни Паркинсона, тау-белок и АВ40/42 в случае болезни Альцгеймера). Повышенная склонность подобных белков к олигомеризации и агрегации затрудняет изучение взаимодействия их нативных форм с малыми молекулами методами ИТК и ППР и вынуждает использовать в исследовании короткие фрагменты, стабильные в мономерном состоянии [67–70].

Зависимость метода МТФ от многих физических и химических параметров позволяет использовать его для скрининга структурно близких молекул. Например, при изучении связывания зеленого флуоресцентного белка GFP (green fluorescent protein) со специфическим к нему антителом GBP (GFP-binding protein) замена всего одной аминокислоты в паратопе антитела привела к увеличению термодиффузии молекулы белка почти в два раза (изменение флуоресценции на 4,5% по сравнению с исходной, составившей 2,1%) [5]. Это открывает возможности для более эффективного поиска лигандов к белкам из разных генетических аллелей, что важно при разработке лекарств [16,71,72].

Метод ППР, в свою очередь, отличается от ИТК и МТФ большей производительностью. Сейчас на основе ППР производятся различные аппараты для определения аффинности молекул с пропускной способностью от 400 до 5000 образцов в сутки и с дополнительными модификация-

ми оптической части прибора и чипов [47,73]. Учитывая малые объемы реагентов, из трех рассмотренных в обзоре методик именно ППР является наиболее привлекательным выбором с точки зрения скрининга больших библиотек веществ (таблица) при разработке новых лекарственных препаратов [74–77]. Метод хорошо подходит для исследования взаимодействия широкого спектра веществ и измерения аффинности как белок-белковых взаимодействий [78], так и взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами [79] и вирусами [80,81].

Отдельного упоминания заслуживает возможность исследовать методом ППР взаимодействия с мембранными белками. Мембранные белки представляют собой привлекательный объект для разработки лекарственных препаратов, поскольку они составляют около трети всех белок-кодирующих генов в геноме эукариот [82,83] и включают в себя рецепторы и ионные каналы, которые часто ассоциированы с различными заболеваниями. Однако в растворе без мембран эти белки часто имеют неправильную конформацию, что затрудняет определение аффинности их взаимодействия с лигандами в растворе. В случае ППР можно создать на чипе липидный бислой, который позволит иммобилизовать такие белки в условиях, приближенных к естественным. Применение ППР для исследования мембранных белков хорошо освещено в обзоре [84].

Возможность измерения термодинамических параметров, как и в случае ИТК, позволяет применять метод для оптимизации лигандов [85] и исследования механизма взаимодействия [77].

Хотя все рассматриваемые методики зарекомендовали себя как надежные в отношении вычисления констант равновесия на контрольных хорошо изученных парах белок-ингибитор, в экспериментах по поиску новых лигандов результаты, полученные разными методами, могут не перекрываться в той или иной степени. Например, при первичном скрининге 500 малых молекул методом ППР выявил 12 веществ с положительным ответом, в то время как методом ядерно-магнитного резонанса обнаружено 19 положительных сигналов. Только четыре вещества в этих библиотеках совпали. Вторичная проверка всех этих молекул проводилась методом ИТК, в результате чего только одно вещество вызвало экзотермическую реакцию и позволило определить константу связывания. Константы диссоциации, полученные методами ИТК и ППР для этого вещества, были близки по значению [17]. В другом недавнем исследовании при скрининге малых молекул для выявления специфического связывания с белком AroE аллеля гена $\epsilon 4$, который, в отличие от аллелей $\epsilon 2$ и $\epsilon 3$, ассоциирован с повышенным риском развития болезни Альцгеймера у

человека, первичный скрининг из 707 кандидатов выявил 14 веществ с положительным ответом [16]. Вторичная проверка была проведена методом МТФ, в результате которой только восемь веществ дали положительный сигнал в термофорезе. Дополнительно эти восемь кандидатов были проверены методом ИТК (шесть веществ подтвердилось, два не показали активности). Вычисленные константы связывания в целом совпадали по значению, однако в ряде случаев одним из методов, ИТК или МТФ, не удавалось вычислить точное значение K_d .

Таким образом, методы ИТК, МТФ и ППР позволяют определить равновесные константы связывания изучаемых веществ в диапазоне от нано- до микромолярных концентраций. Однако каждый из методов может дать как ложноположительный, так и ложноотрицательный результат, что трудно отследить в экспериментах по исследованию неизученных пар «лиганд—мишень». Выходом из этого положения является продуманное использование нескольких методов для одной библиотеки веществ и внимательный дизайн эксперимента с учетом возможностей и ограничений каждого из подходов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20152).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. Kapoor, S. Saigal, and A. Elongavan, *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **33** (3), 300 (2017).
- W. P. Walters and M. Namchuk, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2** (4), 259 (2003).
- J. Hughes, S. Rees, S. Kalindjian, and K. Philpott, *Br. J. Pharmacol.* **162** (6), 1239 (2011).
- T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, and L.-N. Lin, *Anal. Biochem.* **179** (1), 131 (1989).
- C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, et al., *Nat. Commun.* **1** (7), 100 (2010).
- M. Raghavan and P. J. Bjorkman, *Struct. Lond. Engl.* 1993, **3** (4), 331 (1995).
- P. W. Atkins and J. De Paula, *Physical chemistry for the life sciences*, 2nd ed. (W. H. Freeman and Co., New York; Oxford University Press, Oxford, 2011).
- D. G. Myszka, et al., *J. Biomol. Tech.* **14** (4), 247 (2003).
- G. A. Holdgate and W. H. J. Ward, *Drug Discov. Today* **10** (22), 1543 (2005).
- J. J. Christensen, R. M. Izatt, L. D. Hansen, and J. A. Partridge, *J. Phys. Chem.* **70** (6), 2003 (1966).
- N. V. Beaudette and N. Langerman, *Anal. Biochem.* **90** (2), 693 (1978).
- J. C. Martinez, J. Murciano-Calles, E. S. Cobos, et al., in: *Applications of Calorimetry in a Wide Context – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, Ed. by A. A. Elkordy (Intech, Croatia, 2013), Chapt. 4, pp. 74–104.
- M. M. Pierce, C. S. Raman, and B. T. Nall, *Methods* **19** (2), 213 (1999).
- Protein-ligand interactions: methods and applications*, Ed. by M. A. Williams and T. Daviter, 2nd ed. (Humana Press, Springer, New York, 2013).
- J. A. Liberman, J. T. Bogue, J. L. Jenkins, M. Salim, and J. E. Wedekind, *Methods Enzymol.* **549**, 435 (2014).
- L. Kraft, L. Serpell, and J. Atack, *Biomolecules* **9** (2), 48 (2019).
- S. Nagatoishi, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **26** (8), 1929 (2018).
- D. Wu, et al., *Haematologica* **103** (9), 1472 (2018).
- C. Ludwig, *Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösung*. Aus der K.K. Hof- und Staatsdruckerei, in Commission bei W. Braumüller, Buchhändler des K. K. Hofes und der K. Akademie der Wissenschaften, 1856.
- S. Duhr and D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103** (52), 19678 (2006).
- M. Wolff, E. Nicholls, A. M. Reynolds, et al., *Sci. Rep.* **6** (1), 32612 (2016). DOI: 10.1038/srep32612.
- M. Reichl, M. Herzog, A. Götz, and D. Braun, *Phys. Rev. Lett.* **112** (19), 198101 (2014).
- P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **49** (12), 2238 (2010).
- C. P. Toseland, *J. Chem. Biol.* **6** (3), 85 (2013).
- M. M. Baksh, A. K. Kussrow, M. Mileni, et al., *Nat. Biotechnol.* **29** (4), 357 (2011).
- V. Ratner, E. Kahana, M. Eichler, and E. Haas, *Bioconjug. Chem.* **13** (5), 1163 (2002).
- S. A. I. Seidel, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51** (42), 10656 (2012).
- S. A. I. Seidel, et al., *Methods* **59** (3), 301 (2013).
- T. H. Scheuermann, S. B. Padrick, K. H. Gardner, and C. A. Brautigam, *Anal. Biochem.* **496**, 79 (2016).
- C. Entzian and T. Schubert, *J. Vis. Exp.* **119**, 55070 (2017). DOI: 10.3791/55070.
- T. Rogez-Florent, et al., *J. Mol. Recognit.* **27** (1), 46 (2014).
- T. Rogez-Florent, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **137**, 113 (2017).
- M. van de Weert and L. Stella, *J. Mol. Struct.* **998** (1), 144 (2011).
- P. R. Callis and T. Liu, *J. Phys. Chem. B* **108** (14), 4248 (2004).

35. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. (Springer US, 2006).
36. M. Jerabek-Willemsen, et al., *J. Mol. Struct.* **1077**, 101 (2014).P
37. S.-C. Tso, Q. Chen, S. A. Vishnivetskiy, et al., *Anal. Biochem.* **540–541**, 64 (2018).
38. B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, *Sens. Actuators* **4**, 299 (1983).
39. R. L. Rich and D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **14** (4), 223 (2001).
40. B. Johnsson, S. Löfås, G. Lindquist, et al., *J. Mol. Recognit.* **8** (1–2), 125 (1995).
41. B. Johnsson, S. Löfås, and G. Lindquist, *Anal. Biochem.* **198** (2), 268 (1991).
42. Y. S. N. Day, C. L. Baird, R. L. Rich, and D. G. Myszka, *Prot. Sci. Publ. Prot. Soc.* **11** (5), 1017 (2002).
43. P. Schuck and H. Zhao, *Methods Mol. Biol.* **627**, 15 (2010).
44. D. G. Myszka, X. He, M. Dembo, et al., *Biophys. J.* **75** (2), 583 (1998).
45. J.-P. Renaud, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **15** (10), 679 (2016).
46. M. Ui and K. Tsumoto, *Recent Pat. Biotechnol.* **4** (3), 183 (2010).
47. V. Linkuvienė, G. Krainer, W.-Y. Chen, and D. Matulis, *Anal. Biochem.* **515**, 61 (2016).
48. I. Y. Petrushanko, et al., *PloS One* **11** (7), e0158726 (2016).
49. S.-J. Lin, Y.-F. Chen, K.-Ch. Hsu, et al., *Toxins* **11** (4), 233 (2019).
50. P. O. Tsvetkov, A. A. Makarov, S. Malesinski, et al., *Biochimie* **94** (3), 916 (2012).
51. E. H. Mashalidis, P. Śledź, S. Lang, and C. Abell, *Nat. Protoc.* **8** (11), 2309 (2013).
52. J. Cramer, S. G. Krimmer, A. Heine, and G. Klebe, *J. Med. Chem.* **60** (13), 5791 (2017).
53. Ф. О. Цветков, А. А. Куликова, Ф. Девред и др., *Молекуляр. биология* **45** (4), 697 (2011).
54. M. K. Zia, T. Siddiqui, S. S. Ali, et al., *Int. J. Biol. Macromol., Apr.* (2019).
55. W. Du, et al., *J. Biol. Chem., Apr.* (2019).
56. M. Amaral, et al., *Nat. Commun.* **8** (1), 2276 (2017).
57. Q. Dan, et al., *Food Res. Int. Ott. Ont.* **120**, 255 (2019).
58. J. D. Chodera and D. L. Mobley, *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 121 (2013).
59. T. J. Wyckoff, C. R. Raetz, and J. E. Jackman, *Trends Microbiol.* **6** (4), 154 (1998).
60. J. M. Clements, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** (6), 1793 (2002).
61. M. C. Pirrung, et al., *J. Med. Chem.* **45** (19), 4359 (2002).
62. X. Du, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2), 144 (2016).
63. M. Asmari, R. Ratih, H. A. Alhazmi, and S. El Deeb, *Methods* **146**, 107 (2018).
64. A. M. Mueller, D. Breitsprecher, S. Duhr, et al., *Methods Mol. Biol.* **1654**, 151 (2017).
65. P. Reineck, C. J. Wienken, and D. Braun, *Electrophoresis* **31** (2), 279 (2010).
66. E. Fisher, et al., *ACS Chem. Neurosci.* **8** (9), 2088 (2017).
67. С. А. Хмелёва и др., *Молекуляр. биология* **49** (3), 507 (2015).
68. Ф. О. Цветков, А. А. Макаров, А. Н. Арчаков и С. А. Козин, *Биофизика* **54** (2), 197 (2009).
69. L. M. F. Gomes, et al., *Chem. Sci.* **10** (6), 1634 (2018).
70. C. Cheignon, et al., *Chem. Sci.* **8** (7), 5107 (2017).
71. S. A. Khmeleva, et al., *J. Alzheimers Dis.* **54** (2), 809 (2016).
72. F. Wu, T. Song, Y. Yao, and Y. Song, *PloS One* **14** (5), e0216203 (2019).
73. S. Zeng, D. Baillargeat, H.-P. Ho, and K.-T. Yong, *Chem. Soc. Rev.* **43** (10), 3426 (2014).
74. E. Fabini and U. H. Danielson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **144**, 188 (2017).
75. A. Meneghello, S. Tartaggia, M. D. Alvau, et al., *Curr. Med. Chem.* **25** (34), 4354 (2018).
76. R. Mowla, Y. Wang, S. Ma, and H. Venter, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **1860** (4), 878 (2018).
77. P. Taghipour, M. Zakariazadeh, M. Sharifi, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **183**, 11 (2018).
78. D. G. Drescher, D. Selvakumar, and M. J. Drescher, in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, vol. 110, Ed. by R. Donev (Academic Press, 2018), pp. 1–30.
79. M. F. Rollins, J. T. Schuman, K. Paulus, et al., *Nucl. Acids Res.* **43** (4), 2216 (2015).
80. L. Dai, et al., *Cell Host Microbe* **19** (5), 696 (2016).
81. X. Meng, R. Deng, X. Zhu, and Z. Zhang, *Virology* **15** (1), 21 (2018).
82. E. Wallin and G. von Heijne, *Prot. Sci. Publ. Prot. Soc.* **7** (4), 1029 (1998).
83. L. Fagerberg, K. Jonasson, G. von Heijne, et al., *Proteomics* **10** (6), 1141 (2010).
84. S. G. Patching, *Biochim. Biophys. Acta* **1838** (1, Pt A), 43 (2014).
85. C. Rechlin, et al., *ACS Chem. Biol.* **12** (5), 1397 (2017).

Modern Approaches to Analysis of Protein–Ligand Interactions

A. V. Korshunova* **, J. N. Lopanskaya**, and N. B. Gudimchuk* **

**Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

***Physics Department of Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119191 Russia*

The development of molecular simulation methods and advances in computing technology provide rapidly growing opportunities for computational analysis of conformational properties of proteins and the nature of their interaction with ligands. Nevertheless, existing theoretical methods are not entirely satisfactory, and their predictions are in dire need of validation experiment. Therefore, precise experimental methods for quantifying strength of interaction between proteins and small molecules are in great demand. These methods are important both for deciphering the fundamental mechanisms of regulation of protein functions by small molecules in living cells, as well as for creating new medical drugs. In this review, we consider three well-proven modern biophysical techniques for the determination of affinity, stoichiometry, and energetics in protein–ligand interactions such as isothermal titration calorimetry, microscale thermophoresis, and surface plasmon resonance. Special attention is focused on the development of the technical advances of these methods in recent years, the subtleties of their practical use and illustrations of their application for solving specific biophysical problems in pharmacology.

Keywords: isothermal titration calorimetry, microscale thermophoresis, surface plasmon resonance, proteins, ligands, drug development