

ХИМИЧЕСКАЯ ПРОТЕОМИКА НА ОСНОВЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ЗАДАЧАХ ПОИСКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ МИШЕНЕЙ

Мини-обзор

© 2022 И.И. Федоров^{1,2}, В.И. Линева², И.А. Тарасова¹, М.В. Горшков^{1*}

¹ ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики РАН им. Н.Н. Семенова РАН, Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, 119334 Москва, Россия; электронная почта: mike.gorshkov@gmail.com

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 27.05.2022

После доработки 04.07.2022

Принята к публикации 06.07.2022

Быстроразвивающаяся в последние годы химическая протеомика представляет собой основной метод для идентификации взаимодействий малых молекул и белков в масштабах всего протеома и картирования сигнальных и/или метаболических путей этих взаимодействий. Метод позволяет не только идентифицировать белки-мишени для лекарств, охарактеризовать их токсичность и выявить возможные нецелевые белки, участвующие в побочных взаимодействиях с лекарством, но и выявить фундаментальные механизмы, регулирующие жизнедеятельность клеток в условиях лекарственного воздействия или особенностей физиологического состояния самого организма. Решение этих проблем играет ключевую роль в биологии и клинической практике, расширяя существующие возможности для решения фундаментальных и практических проблем медицины, включая диагностику различных форм тяжелых заболеваний или предсказание эффективности терапевтического воздействия. При этом развитие масс-спектрометрии высокого разрешения в последние годы позволило решать задачи поиска мишеней лекарственного воздействия на уровне всех белков клеточных протеомов. В данном обзоре рассматриваются основные задачи, стоящие перед химической протеомикой на основе масс-спектрометрии, описываются методы и подходы к их решению, а также приведены примеры реализации этих методов в практике биомедицинских исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: химическая протеомика, масс-спектрометрия, лекарственные мишени.

DOI: 10.31857/S0320972522090056, **EDN:** BAVDEB

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на бурное развитие знаний в области биохимии и биомедицины, поиск, разработка и тестирование новых лекарственных препаратов до сих пор является наиболее сложным этапом разработки более эффективных

терапевтических подходов к лечению большинства социально-значимых заболеваний. Персонализированный отклик организма на терапию, а также развитие как индивидуальной, так и популяционной устойчивости патологий к лекарственному воздействию приводят к необходимости разработки новых препаратов и классов

Принятые сокращения: ВЭЖХ-МС/МС – метод анализа сложных смесей органических и биоорганических соединений, включая протеолитические пептиды, основанный на комбинации высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии; МС – масс-спектрометрия; ТМТ – изобарные метки для мультиплексного количественного протеомного анализа на основе тандемной масс-спектрометрии; TPP – температурное профилирование протеомов; АВРР – метод профилирования белков по ферментативной активности; AS-MS – метод аффинного выделения белков в сочетании с масс-спектрометрической идентификацией; CCMS – метод масс-спектрометрической идентификации белков с использованием фотоиндуцированной сшивки; HDX-MS – масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена; LiP-MS – масс-спектрометрия структурно-зависимого протеолиза белков; PISA – метод интегрального измерения растворимости белков; PREPL – пролилэндопептидазоподобный фермент, кодируемый у человека геном *PREPL*.

* Адресат для корреспонденции.

соединений для лечения одних и тех же заболеваний [1]. Тем не менее ни широкий выбор уже имеющихся лекарств, ни разнообразие терапевтических подходов на их основе зачастую не дают желаемый физиологический эффект. Подтверждением этому является, например, непрекращающееся противостояние антибиотиков и бактерий, развивающих устойчивость к ним [2]. Еще более характерным примером является быстроразвивающаяся резистентность клеток злокачественных опухолей практически ко всему спектру зарегистрированных и используемых в настоящее время противоопухолевых химиотерапевтических препаратов [3, 4]. Если говорить о лечении злокачественных опухолей, то одними из наиболее перспективных в последние годы рассматриваются подходы на основе таргетной терапии [5]. Упрощенно, эти подходы можно охарактеризовать как триаду «один организм—одна мишень—одно лекарство», в которой и мишень, и лекарство

определяются индивидуальными, или «персонализированными», особенностями развития патологии в конкретном организме. Однако и в рамках таких персонализированных подходов проблема выработки устойчивости патологических клеток к воздействию остается нерешенной. Кроме того, сама концепция «одно лекарство—одна мишень» является в общем случае ошибочной [6]. Лекарство неизбежно начинает взаимодействовать с другими молекулярными мишенями, причем не только в патологических, но и в здоровых клетках организма, вызывая довольно слабопредсказуемые (и, снова, «персонализированные») последствия, включая побочные эффекты. В свою очередь, побочные эффекты и их разнообразие могут быть обусловлены в том числе взаимодействием препарата не только с «узаконенными» мишенями, но и с иными молекулярными участниками процессов (рис. 1). Таким образом, создание лекарств нового поколения требует не только

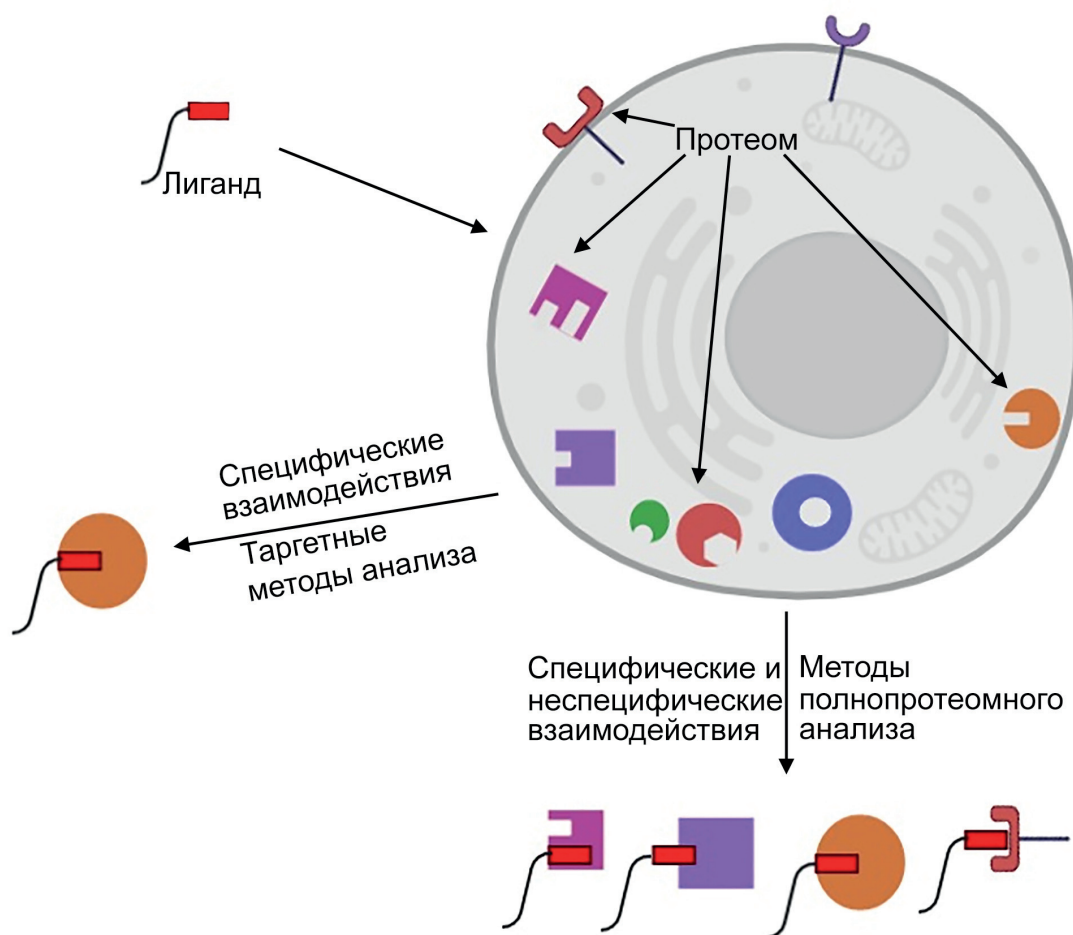


Рис. 1. Задачей химической протеомики является поиск мишеней взаимодействия, как правило, небольших химических соединений с белками. В то время как традиционные методы химической протеомики позволяли выявлять и подтверждать специфические взаимодействия лигандов с конкретными белками, создание лекарств нового поколения требует не только изучения фармакокинетических свойств используемых химических препаратов, но и идентификации полного спектра их мишеней на уровне всего протеома клеток, включая те из них, которые участвуют в неспецифических взаимодействиях, потенциально ответственных за развитие побочных эффектов

тщательного изучения фармакокинетических свойств используемых химических препаратов, но и идентификацию полного спектра их мишеней для минимизации побочных эффектов и усиления эффективности и специфичности воздействия этих препаратов на патологические (и здоровые, в общем случае) клетки [7]. В настоящее время сложилось не только понимание необходимости таких исследований, но и были созданы методы, позволяющие решать эти задачи как на геномном уровне, так и на уровне всего протеома.

Методы химической протеомики являются эффективными инструментами для поиска и идентификации путей и мишеней взаимодействия химических соединений с белками клеток [7, 8]. В то время как аффинная хроматография по-прежнему является основным из таких методов исследования биологических взаимодействий и выделения белков, участвующих в специфических взаимодействиях с лигандами различной природы [9], развитие в последние годы протеомных технологий на основе масс-спектрометрии (МС) высокого разрешения позволило вывести задачу поиска мишеней таких взаимодействий на уровень всего протеома клеток [10]. При этом протеомный эксперимент направлен либо на идентификацию всех белков клетки, которые взаимодействуют с исследуемым химическим соединением, либо целью анализа является определение активности определенной группы белков протеома на основе их взаимодействия с большим набором химических соединений, например, в такой быстрорастущей теме исследований, как лекарственное «репрограммирование» [11].

В целом, персонализированные подходы к терапии являются в настоящее время доминирующими в лечении онкологических заболеваний, когда один и тот же тип ракового заболевания может возникать у пациентов с различными генетическими дефектами, при этом проявляя различные изменения профиля экспрессии белков, в том числе и в ответ на внешнее или терапевтическое воздействие [12]. Таким образом, методы таргетной медицины должны подразумевать персонализированный подход к подбору лекарственных препаратов и их молекулярных мишеней на клеточном уровне. Для реализации этого подхода требуются молекулярные индикаторы или маркеры, благодаря которым можно оценить эффективность терапии [13]. Значительные изменения концентрации отдельных белков протеома в результате воздействия химиопрепаратов могут служить источником информации об активированных каскадах белков-

белковых взаимодействий и являться такими маркерами [14].

При этом количественная МС, основанная на масс-анализаторах высокого разрешения, позволяет в настоящее время выявлять такие изменения не только для отдельных, но и практически для всех белков протеомов [15].

Таким образом, методы химической протеомики являются эффективным инструментом при изучении молекулярных механизмов развития заболеваний, идентификации биомаркеров, а также определении мишеней для таргетной терапии. Развитие высокопроизводительной количественной МС биомолекул позволило вывести решение этих задач на уровень всех белков протеомов. В обзоре рассматриваются развиваемые в последние годы новые подходы, основанные на МС высокого разрешения, к исследованию результатов взаимодействия химических соединений, в первую очередь терапевтических лекарственных препаратов, с белками клеточных протеомов.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОТЕОМИКИ

Идентификация белковых мишеней биоактивных химических соединений уже давно является одним из наиболее популярных направлений исследований в области химической биологии и поиска новых лекарств на основе фенотипического анализа клеток. Классическим примером такого поиска является выявление мишеней и механизмов возможного терапевтического действия веществ, используемых в традиционной медицине [16]. Если говорить о поиске белков, взаимодействующих с тем или иным химическим соединением на уровне всего клеточного протеома, то как наиболее широко используемые, так и находящиеся на начальной стадии своего развития современные методы химической протеомики основаны на использовании МС (рис. 2). В настоящее время МС высокого разрешения является основной технологией, используемой для структурной идентификации белков и панорамного количественного анализа протеомов. В современном исполнении метод позволяет идентифицировать несколько тысяч белковых групп в образцах протеомов клеточных линий и несколько сотен белковых групп в протеомах, характеризующихся высоким динамическим диапазоном концентрации белков, таких как плазма крови. После биоинформатического анализа, включающего идентификацию

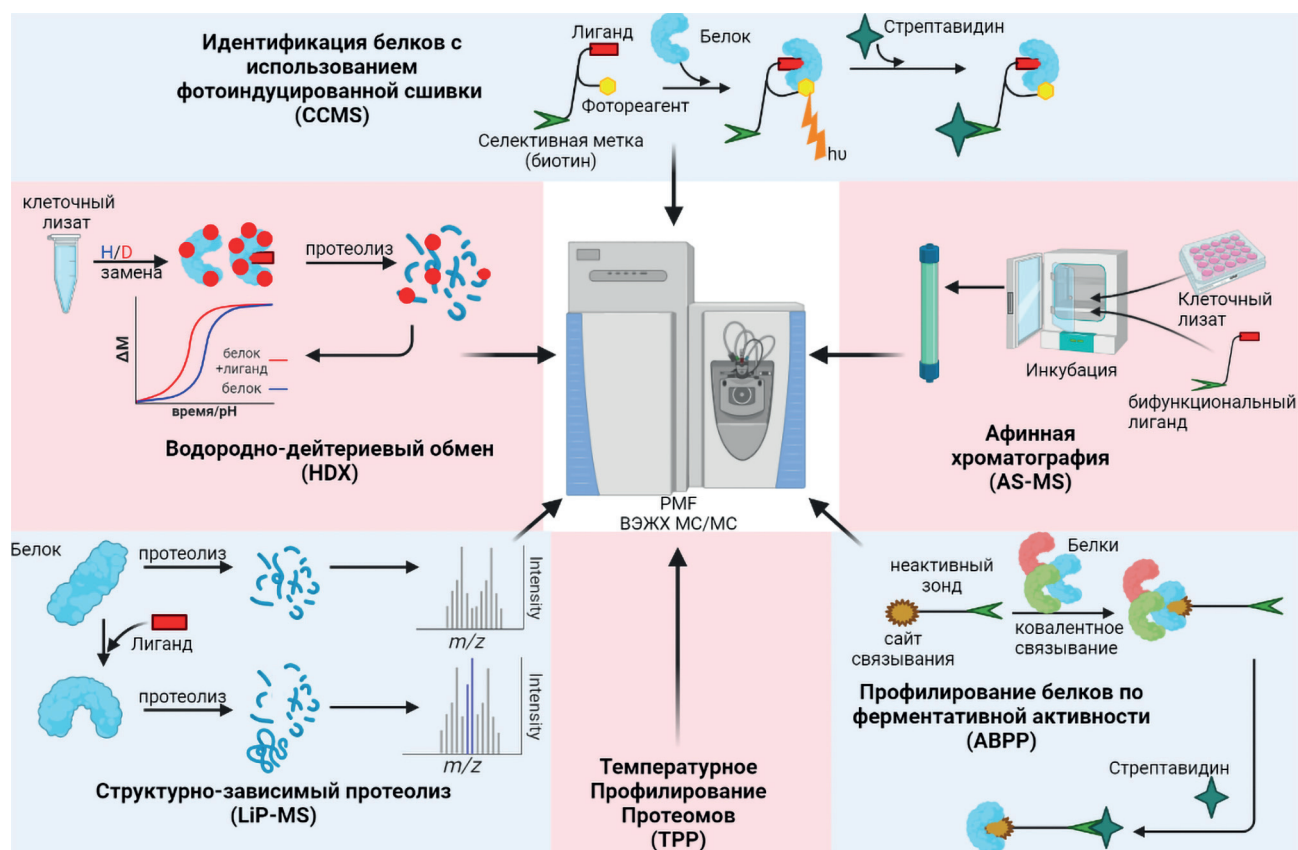


Рис. 2. Развитие технологий полнопротеомного анализа на основе МС высокого разрешения позволяет решать задачу поиска всех мишеней лекарственного воздействия. При этом методы поиска таких белков, основанные на МС-идентификации взаимодействующих с лекарством белков, можно разделить на две группы: структурно-зависимые, в которых МС используется для измерения структурных изменений белков, участвующих во взаимодействиях, и методы, основанные на дериватизации анализируемого химического соединения с целью аффинного выделения всех провзаимодействовавших белков с последующей их идентификацией. В случае одиночных мишеней для их идентификации используется измерение точных масс их протеолитических пептидов. Для идентификации большого количества мишеней или поиска всех возможных мишеней на уровне всего протеома клетки используется «скорострельная» протеомика на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС)

белков, присутствовавших в образце, из полученных экспериментальных данных извлекают количественную информацию об относительном содержании белков, позволяющую определить биологические процессы и механизмы, запускаемые в клетках в ответ на внешнее или терапевтическое воздействие [17]. Использование количественного панорамного полнопротеомного анализа на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), позволяющего измерять изменения концентрации белков на уровне всего протеома клеток, дает возможность выявлять не только известные и ожидаемые мишени для того или иного лекарства, но и дополнительные, неизвестные ранее белки, с которыми оно взаимодействует [18]. Исследования в этом направлении особенно быстро развивались в последние годы в онкопротеомике в связи с развитием МС-технологий количественного анализа белков. Основной целью этих работ является составление

протеомных карт взаимодействия как новых, так и уже известных онкопрепаратов с белками протеомов клеточных линий рака различного типа [19, 20]. Общими проблемами таких исследований является не только необходимость анализировать большое количество систем «лекарство—протеом» для получения биологически значимой информации, но и выявлять возможные мишени того или иного препарата практически для каждого белка протеома, включая белки с посттрансляционными модификациями [21].

Аффинная хроматография в комбинации с масс-спектрометрией (AS-MS). Традиционным методом химической протеомики является аффинная хроматография [9], в основе которой лежит выделение мишеней лекарственного воздействия из клеточных экстрактов с помощью специальных химических соединений — химических зондов, созданных на основе исследуемого биоактивного препарата, специфически взаимодействующего с определен-

ными белками протеома. Химические зонды ковалентно иммобилизованы на стационарной фазе, специфически связываясь с белками протеома, растворенными в подвижной фазе. После промывки аффинной колонки и удаления нецелевых белков мишени, с которыми взаимодействует лиганд, белки-мишени снимаются с фазы элюирующим буфером [22, 23]. Если целевой белок известен или существуют предположения о нем на основе информационных данных [24], иммуноблоттинг с использованием стандартных методов [25] представляет собой простой, чувствительный и проверенный метод идентификации выделенного белка. В случае, например, биотиновой метки, используется аффинное выделение на стационарной фазе, иммобилизованной стрептавидином за счет уникальной по специфичности и силе связывания последнего с биотином способности. Однако в большинстве случаев целевые белки будут неизвестны, по крайней мере изначально, и выделенные белки-мишени идентифицируются масс-спектрометрически. Кроме того, таких белков может оказаться довольно много. В этих случаях методы, основанные на МС, в первую очередь метод пептидных отпечатков масс (Peptide Mass Fingerprinting, PMF [26]) или «скорострельная» протеомика [27], используются для идентификации всех выделенных белков-мишеней. На тех же принципах осуществляется и поиск мишеней химических соединений, например ионов металлов, красителей, кислот в металл-аффинной хроматографии белков (Immobilized-Metal Affinity Chromatography, IMAC [28]), в основе которой лежит обратимое взаимодействие аминокислотных остатков последовательностей, выступающих в качестве доноров электронов, с ионами металлов, хелатированными лигандами, иммобилизованными на поверхности стационарной фазы. Метод AS-MS играет важную роль в фосфопроотеомике, где используется для выделения фракций фосфорилированных пептидов в протеолитических смесях для последующего МС-анализа [29]. Сочетание аффинного обогащения с использованием меченых биоактивных малых молекул и количественной протеомики на основе МС высокого разрешения дает чувствительный и специфический инструмент для всестороннего профилирования взаимодействий лекарств в клеточных протеомах [8, 30].

Масс-спектрометрическое профилирование протеомов по ферментативной активности. В качестве примера использования химической протеомики, основанной на МС, для исследования определенного класса белков можно

привести выявление специфичности ингибиторов протеолитических ферментов методом количественного профилирования белков по ферментативной активности (Activity-Based Protein Profiling, ABPP [31]). Метод ABPP основан на использовании специально разработанных и синтезированных химических соединений (зондов), образующих ковалентные связи с активными сайтами протеаз. Эти соединения, в свою очередь, представляют собой аналоги лекарств, механизм действия которых исследуется. При этом ковалентное связывание зонда с протеазой свидетельствует о связывании и лекарства. Аффинные метки, такие как биотин, которые включают в химическую структуру зондов, позволяют выделить из протеома все ковалентносвязанные протеазы с последующим количественным МС-анализом (рис. 2). Так, например, метод ABPP позволил выявить на уровне всего протеома специфичность ингибиторов металлопротеаз, участвующих в регулировании множества важных физиологических и патологических процессов в клетках. Было показано, что металлопротеазы могут иметь перекрывающуюся чувствительность к ингибиторам. В связи с этим возникает задача оценки ингибиторов по этому классу ферментов в целом для последующей разработки препаратов с требуемой избирательностью [32]. Аналогичным образом можно установить взаимосвязь между избытком или недостатком конкретного белка в организме и возникновением симптомов заболевания. Например, недостаток фермента PREPL, кодируемого геном *PREPL*, в клетках приводит к возникновению симптомов синдрома гипотонии-цистинурии, проявляющихся в появлении нервно-мышечных и легких когнитивных нарушений [33]. В связи с этим возникает задача идентификации физиологических субстратов и путей, контролируемых PREPL, а также ингибиторов активности этого фермента, успешно решаемая с помощью метода ABPP. Еще одним примером использования этого метода химической протеомики в масштабе всего клеточного протеома при выявлении молекулярных механизмов развития заболеваний может служить исследование роли цистеиновых протеаз в выживаемости малярийных паразитов на стадии мерозойта и выявление ингибиторов активности тех из них, которые играли ключевую роль в развитии заболевания, убивающего до 2 млн человек в год [34]. Аналогичный подход на основе ABPP был использован в случае изучения вирусных заболеваний, в частности вируса гепатита С (HCV), в котором основными объектами исследования были белки

протеома хозяина, изменение ферментативной активности которых измерялось на стадии патологического процесса репликации вируса. Белки со статистически значимыми изменениями активности могут отвечать за взаимодействие вируса HCV с клетками хозяина и, соответственно, диагностическими и терапевтическими мишенями [35].

Одной из наиболее популярных областей исследований, в которых в последние годы используются методы химической протеомики в сочетании с МС, является выяснение механизмов и роли фосфорилирования белков при раковых заболеваниях. Фосфорилирование представляет собой модификацию белка после завершения процесса трансляции путем присоединения к белку фосфатной группы [36]. Процесс катализируется особой группой ферментов, которые называются киназами. Киназы фосфорилируют около 30% всех белков человека, в том числе и те, которые отвечают за сложные молекулярные процессы (рост, дифференцировка, пролиферация и апоптоз) [37]. Активность этих ферментов находится под строгим контролем, однако в случае мутации киназ или других генетических изменениях регуляция нарушается, что приводит к возникновению злокачественных опухолей. Таким образом, киназы являются потенциальными мишенями для противоопухолевой терапии [38].

Здесь следует отметить, что при использовании ингибиторов активности большого класса белков, тех же киназ, таргетная терапия сталкивается с существенной проблемой. Ингибиторы распознают консервативные участки, которые одинаковы для многих белков данного класса. В случае киназ в роли такого участка выступает так называемый АТР-связывающий «карман» [39]. Таким образом, ингибиторы, нацеленные на определенный консервативный участок, могут перекрестно взаимодействовать с другими членами класса и другими белками, связанными с этим участком. Возникает задача идентификации возможных мишеней действия конкретного ингибитора среди всех белков клеток, которая в настоящее время может быть решена методами химической протеомики, основанными на полнопротеомном количественном МС-анализе [40, 18].

Масс-спектрометрическая идентификация белков с использованием фотоиндуцированной сшивки. Ингибиторы со специфической активностью по отношению к определенным белкам могут быть модифицированы путем присоединения реакционной группы, которая может образовывать ковалентные связи с аминокислотными остатками последовательностей белков

под действием, например, ультрафиолетового излучения, а также метки, используемой для последующего аффинного выделения таких белков, например биотина. На том же принципе основан поиск всех возможных мишеней взаимодействия исследуемых химических соединений с протеомами в методе МС-идентификации белков с использованием фотоиндуцированной сшивки (Capture Compound Mass Spectrometry, CCMS [41]). Исследуемое химическое соединение модифицируется добавлением двух функциональных групп, одна из которых ковалентно связывается с аминокислотными остатками белка под действием УФ-излучения (фотоиндуцированная сшивка), а другая используется как метка, за которую связанный с этим соединением белок выделяется из протеомной смеси (рис. 2). Основной целью метода CCMS является выявление не только белков-мишеней, специфически связывающихся с исследуемым лекарством, но и неспецифически связывающихся белков, которые тем не менее играют роль в активировании определенных каскадов белок-белковых взаимодействий, ответственных за ответ клеток на лекарственное воздействие и связанных с развитием, например, побочных процессов. При отсутствии ковалентной сшивки белки в большинстве случаев будут потеряны. Выделенные из протеома белки-мишени идентифицируются с использованием «скорострельной» протеомики на основе ВЭЖХ-МС/МС-анализа [27]. Метод CCMS особенно хорошо подходит для поиска как можно большего набора потенциальных взаимодействий малых молекул с белками. Особенностью метода является возможность его реализации непосредственно в растворе при физиологических условиях, в которых белки находятся в нативной форме. В отличие от аффинной хроматографии, связанной с использованием стационарной фазы с заданными свойствами, такими как размер пор, метод не имеет каких-либо ограничений на размер лигандов. Также преимуществом метода в сравнении с АВРР является то, что в случае АВРР выбор анализируемых соединений ограничен исключительно теми, которые ковалентно связываются с активными центрами ферментов, как в случае, например, сериновых протеаз. Метод CCMS может использоваться для исследований специфичности химических соединений, образующих слабые нековалентные связи с белками-мишенями. В качестве известного примера реализации метода CCMS в химической протеомике можно упомянуть работу Fischer et al. [42] по идентификации всех возможных белков, взаимодействующих

с лекарствами толкапон и энтакапон, используемыми для лечения болезни Паркинсона. Оба лекарства являются ингибиторами фермента COMT (catechol-O-methyltransferase), нередко проявляя при этом тяжелые гепатотоксические эффекты в клинической практике [43–45]. В частности, в упомянутой выше работе Fischer et al. [42], методом ССМС было идентифицировано 124 белка клеточной линии НерG2, которые взаимодействовали с толкапоном, часть из которых относилась к белкам, ответственным за возможные побочные эффекты терапии.

Температурное профилирование протеомов – новый метод поиска мишеней лекарственного воздействия на основе панорамной масс-спектрометрии. Метод температурного профилирования протеомов (ТРП) был предложен в 2014 г. Savitski et al. [40] и основан на определении точки денатурации белков при изменении температуры. В результате денатурации белки становятся нерастворимыми в соответствующем буферном растворе. Соответственно, если говорить обо всем протеоме, то происходит разделение всех белков на две фракции: растворимых и нерастворимых при заданной температуре. Если при этом измерять относительную концентрацию всех белков растворимой фазы методом полнопротеомного количественного анализа при разных температурах, то для каждого белка протеома можно построить соответствующую температурную кривую растворимости, как правило, S-образной формы (рис. 3), и определить точку денатурации. Взаимодействие того или иного белка с химическим соединением приводит к изменению точки температурной денатурации таких белков, что проявляется в смещении соответствующих температурных кривых количественных изменений белков в растворимой фазе протеома. Таким образом, полнопротеомный анализ на основе количественной МС дает возможность отслеживания не только каждого уникального состояния белков при взаимодействии с лекарством или другим белком на уровне всего протеома, но и выявления ключевых каскадов белок-белковых взаимодействий, активируемых лекарственным воздействием [46]. Следует отметить, что метод имеет ряд ограничений, в частности, необходимость проведения большого количества полнопротеомных ВЭЖХ-МС/МС-анализов систем «лекарство–протеом» при разных температурах и концентрациях. Так, например, 10 точек по температурам и концентрациям соответствуют 100 фракциям, для каждой из которых требуется осуществлять полнопротеомный количественный анализ,

что потребует несколько недель затрат инструментального времени. Еще одной проблемой метода является потребность в большом количестве клеток для анализа одной такой системы «лекарство–протеом» – от 10^5 до 10^6 клеток на каждую точку сканирования. Хотя процесс денатурации белка считается двухстадийным переходом от свернутого нативного состояния к структуре случайного клубка, часто существуют промежуточные продукты, которые могут приводить к взаимодействию лекарства *in vitro* в процессе пробоподготовки с белками, которые в действительности не являются его мишенями *in vivo*. С другой стороны, сигмоидальная подгонка кривых плавления белков приводит к тому, что белки, для которых такая форма не является характерной, «выпадают» из анализа, что увеличивает риск пропуска важных мишеней.

Структурно-зависимые методы химической протеомики. Одним из следствий связывания белков с лигандами является изменение их конформационной динамики [48]. На этом свойстве основаны так называемые структурно-зависимые методы поиска белков-мишеней, в которых эти изменения измеряются масс-спектрометрически (рис. 2).

Одним из наиболее распространенных структурно-зависимых методов является МС водородно-дейтериевого обмена (Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry, HDX-MS), который в последние годы стал рутинной технологией для исследования структуры и динамики белков в растворах. В методе измеряется обмен дейтерия с водородом в амидной группе основной цепи белка [49, 50]. Водород в амидной группе белковой цепи обменивается с водородом в воде со скоростью, которая зависит от окружения амидной группы и связана с динамикой белка. При этом водород, участвующий во взаимодействиях белок–лиганд, демонстрирует более медленный обмен. Скорость реакции обмена в основной цепи происходит в экспериментально доступной временной шкале, соответственно, информацию о структуре и динамике белка можно получить, наблюдая зависящее от времени включение дейтерия в положение водорода в амидной группе посредством инкубации в дейтерированной воде. Таким образом, в результате связывания лиганда с белком меняется кинетика водородно-дейтериевого обмена, которую можно наблюдать в виде сдвига кинетической кривой при измерении скорости реакции обмена либо во времени, либо при различной кислотности раствора, в котором протекает эта реакция (рис. 2). Количественно эффективность обмена про-

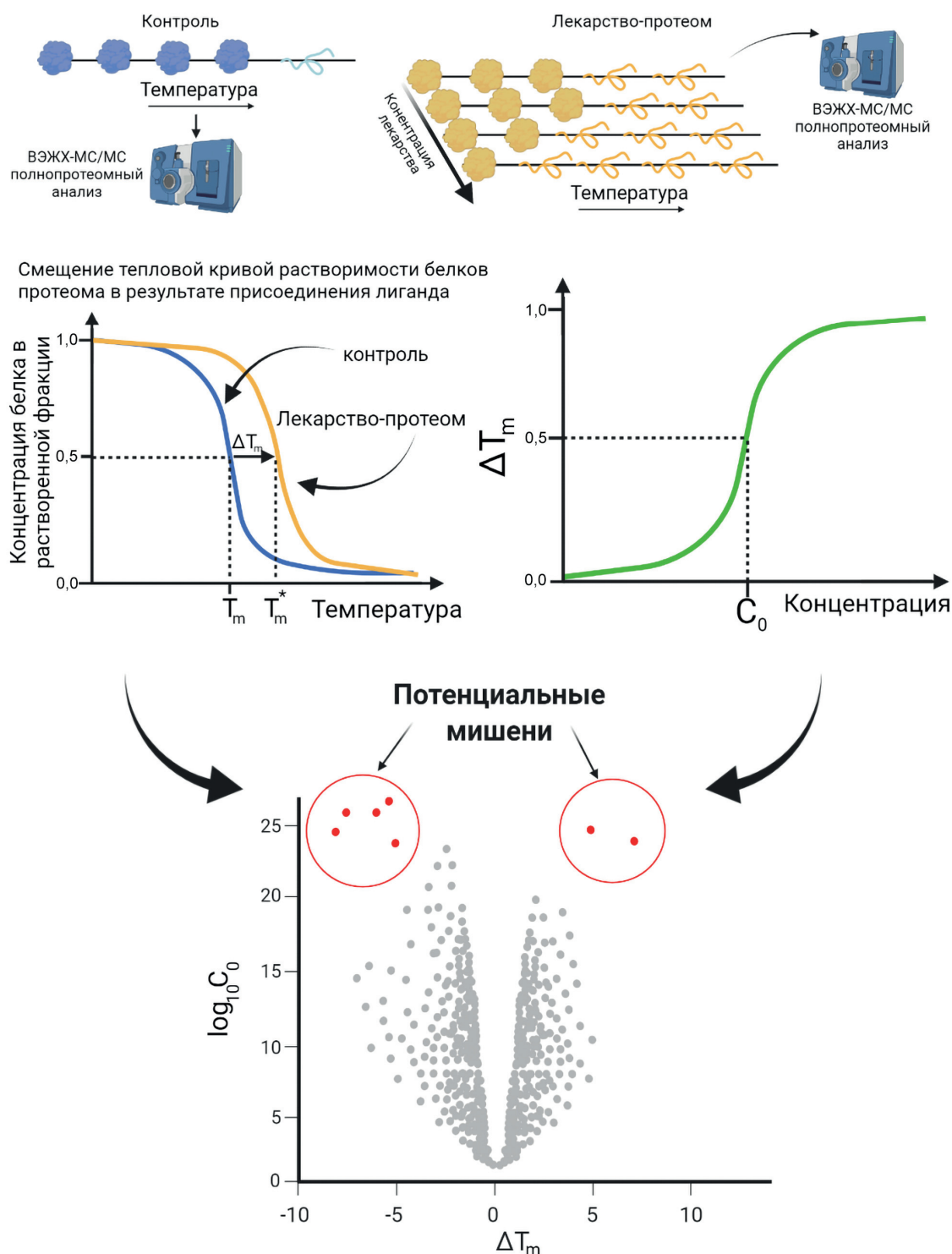


Рис. 3. Иллюстрация метода температурного профилирования протеомов. Клеточный лизат предварительно разделяют на несколько проб, каждая из которых обрабатывается анализируемым препаратом в разных концентрациях. Клеточный лизис осуществляется методом «заморозки-разморозки» (freeze-thaw [47]) с целью сохранения нативной формы белков. В результате обработки те из белков протеома, к которым присоединилось лекарство, изменяют свои термодинамические свойства. Каждую из «концентрационных» проб снова функционируют с последующей инкубацией каждой из фракций при разных температурах в диапазоне 37–67 °С (как правило, до 10 температурных точек). После инкубации ультрацентрифугированием выделяют растворенную в буферном растворе белковую фракцию с последующим количественным полнопротеомным анализом с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Для каждого белка анализируемой системы «лекарство–протеом» строится кривая количественных изменений (кривая растворимости) в координатах (температура, концентрация), которая сравнивается с кривой растворимости этого белка в контрольной пробе, не обработанной лекарством. Статистический анализ на значимость сдвигов температурных кривых растворимости, представленный в виде диаграмм рассеяния, позволяет выявить белки со статистически значимыми изменениями температурных точек денатурации, которые и являются белками-мишенями для исследуемого лекарства

является в сдвиге массы белка или суммарном сдвиге массы его протеолитических пептидов в масс-спектрах. Таким образом, можно осуществлять измерения для всех белков протеома в рамках стандартного полнопротеомного ВЭЖХ-МС/МС-анализа и выявлять взаимодействия белок–лиганд [51, 52]. Одной из проблем метода HDX-MS является его довольно низкая чувствительность, в результате многие из мишеней лиганда остаются вне рамок анализа. Для решения этой проблемы был предложен так называемый гистидин-водородно-дейтериевый обмен (His-HDX). В основе этого подхода лежит обогащение протеолитических смесей гистидин-содержащими пептидами с последующим анализом обогащенной смеси стандартным ВЭЖХ-МС/МС. В частности, этот подход был успешно продемонстрирован для выявления взаимодействий между митоген-активируемой протеинкиназой MARK14 и ее ингибитором в лизатах клеток HEK293 [53].

Еще одним набирающим популярность в последние годы структурно-зависимым методом является ограниченный протеолиз в сочетании с МС-детектированием (Limited Proteolysis-Coupled Mass Spectrometry, LiP-MS [54]). Метод основан на предположении о том, что в результате присоединения лиганда к белку меняется профиль протеолитических пептидов последнего в результате гидролиза высокоспецифичными ферментами. Важной особенностью метода является проведение именно ограниченного протеолиза, не проводя гидролиз полностью, что привело бы к потере информации о связанном с лигандом белке. После проведения ограниченного протеолиза образцы анализируют с помощью МС с целью идентификации белков и оценки изменений в профилях их протеолитических пептидов [55]. Следует отметить, что одним из недостатков метода LiP-MS является длительность пробоподготовки [54], а также невысокая специфичность [56].

Методы и подходы ультракороткой количественной протеомики. Как уже отмечалось выше, решение задач химической протеомики в контексте поиска мишеней лекарственного воздействия на уровне всего протеома требует проведения большого количества полнопротеомных анализов. Так, в случае использования метода TPP речь идет о десятках и сотнях анализов только для одной системы «лекарство–протеом». Даже в случае использования альтернативных методов разнообразие возможных химиотерапевтических средств и подходов, а также персонализированный отклик протеомов клеток на их использование требуют значительных затрат инструментального времени.

Одним из наиболее широко используемых решений проблемы производительности полнопротеомного анализа является мультиплексинг проб на основе изобарных меток (Tandem Mass Tags, TMT), позволяющий одновременно анализировать несколько протеомов в рамках одного ВЭЖХ-МС/МС-эксперимента [57]. Метод заключается в присоединении к протеолитическим пептидам каждой из проб изобарных меток одной массы, в состав которых входят так называемые «репортерные» части, отличные по массе. Меченые таким образом пептиды разных проб объединяются в одну, однако в процессе анализа при фрагментации конкретного пептида происходит диссоциация не только самого пептида, но и его «репортерной» части TMT-метки. В спектре фрагментации пептида, на основе которого происходит его идентификация, присутствует также и спектр ионов-репортеров метки, относительные интенсивности которых соответствуют относительным интенсивностям данного пептида в разных пробах и, соответственно, относительным концентрациям белка, которому данный пептид соответствует. Реализация 10-плексного протеомного анализа [58] позволяет, таким образом, на порядок сократить затраты инструментального времени на количественный протеомный анализ каждой пробы.

С целью дальнейшего сокращения времени анализа в задачах химической протеомики в недавней работе Gaetani et al. [59] был представлен новый метод, так называемого интегрального изменения растворимости белков (Protein Integral Solubility Alteration, PISA). В анализе PISA объединяются образцы по всему температурному градиенту. Содержание белка в объединенном образце, которое представляет собой площадь под кривой плавления, используется для измерения влияния лиганда на термостабильность белка. Основной метрикой в методе PISA является показатель разницы между площадями под кривыми плавления обработанных и контрольных образцов (ΔS_m). Также такой метрикой может служить кратность изменений белков в объединенных обработанных образцах по сравнению с интегральными контрольными образцами. Как ΔS_m , так и кратность изменения связаны со сдвигом температур плавления (ΔT_m) и, следовательно, с изменением термостабильности белка. В анализе PISA экспериментальная ΔS_m аппроксимируется путем нормализации этой разницы между обработанными и контрольными образцами по контрольным образцам, в то время как кратные изменения не требуют дополнительной нормализации данных. Метод PISA позволяет

дополнительно сократить время анализа одной системы «лекарство—протеом» на порядок.

Объединения фракций в перечисленных выше подходах дает двойной выигрыш: во-первых, значительно увеличивается производительность анализа одной системы «лекарство—протеом» и, во-вторых, существенно сокращается расход образца. Например, использование мультиплексных TMT-меток в сочетании с методом PISA позволяет на два порядка сократить затраты инструментального времени в задачах химической протеомики на основе температурного полнопротеомного профилирования. Недавно представленные реагенты TMTpro для количественного полнопротеомного анализа позволяют использовать 16–18 интегральных образцов в одном эксперименте [60].

Основной проблемой метода температурного полнопротеомного профилирования и его модификаций является то, что он основан на сигмоидальной форме кривых плавления белков. Однако существует большая группа белков, для которых это условие не выполняется, и кривые плавления не могут быть воспроизведены с достаточно высокой точностью для измерения соответствующего сдвига в температуре денатурации [61], что потенциально может служить источником ложноположительных результатов в определении мишеней лекарственного воздействия. Также количество белков во фракциях резко снижается при высоких температурах, особенно белков с низкими температурами денатурации (T_m), что потенциально затрудняет обнаружение соответствующего сдвига [62]. В свою очередь, использование более узкого диапазона температур для построения кривых плавления также повышает риски пропуска целевых белков лекарственного воздействия.

Как уже отмечалось выше, при использовании мультиплексного и интегрального подходов затраты инструментального времени для одной системы «лекарство—протеом» в методе TPP сокращаются на два и более порядков. Однако даже в этом случае разнообразие как групп лекарств, так и объектов их воздействия настолько велико, что проблема дальнейшего повышения производительности полнопротеомного анализа по-прежнему остается критически важной в задачах химической протеомики.

Первые работы по разработке методов ультракороткого полнопротеомного анализа для широкомасштабных скрининговых исследований в области сравнительной протеомики появились буквально в последние несколько лет [63–66]. Среди них метод прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1 является одним из подходов к

реализации быстрого количественного полнопротеомного анализа за счет возможности использования ультракоротких градиентов разделения протеолитических смесей [67]. Понятие «прямая» подразумевает исключение стадии последовательного получения масс-спектров фрагментации протеолитических пептидов смеси, являющейся одной из основных причин увеличения затрат инструментального времени или уменьшения глубины анализа при использовании коротких градиентов разделения. При этом прямая идентификация белков осуществляется за счет использования всей совокупности экспериментальных данных о пептидах, комплементарных к масс-спектрометрическим, в частности, хроматографическим временам или ионной подвижности, а также специфических особенностей последовательностей белков, которым эти пептиды соответствуют. Существенными составляющими метода являются программные средства для обработки масс-спектров ионов пептидов и идентификации их изотопных кластеров [68], ранжирование идентификаций, соотнесение их с белками в соответствующих базах данных и определение уровня достоверности [69]. Важно, что в отличие от подходов, основанных на MS/MS, метод DirectMS1 позволяет идентифицировать белки с существенно (почти на порядок) большим покрытием последовательности, что, в свою очередь, дает более точные измерения относительного содержания белков в пробах на основе измерения интенсивностей спектров ионов, соответствующих этим белкам пептидов. Как было показано в недавних работах, метод позволяет в настоящее время количественно идентифицировать более 2000 белков протеомов в рамках 5-минутного хроматомасс-спектрометрического эксперимента [70].

Еще одним методом ультракороткого полнопротеомного количественного анализа является метод ScanningSWATH, основанный на одновременной фрагментации ионов пептидов смесей в широком окне отношений масс к заряду (m/z), так называемом методе слепого сбора данных фрагментации (Data Independent Acquisition, DIA) с одновременным непрерывным сканированием окна фрагментации. Используя непрерывное сканирование окна фрагментации прекурсорных ионов пептидов, метод продемонстрировал возможности его использования в режиме ультракоротких, порядка 0,5–5 мин, градиентов разделения протеолитических смесей пептидов при высокой глубине анализа протеомов клеточных линий человека, достигающей в отдельных экспериментах нескольких тысяч белков [71, 72].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химическая протеомика на основе количественного профилирования протеомов является в настоящее время основным методом выявления белков-мишеней лекарственного воздействия. В то время как на ранней стадии своего развития химическая протеомика внесла существенный вклад в понимание механизмов действия конкретных классов ферментов и выявление белков-мишеней специфического взаимодействия с различными классами химических соединений, большая часть протеома организма до сих пор оставалась за рамками этих работ. В то время как аффинная хроматография продолжает широко использоваться в таких исследованиях, доминирующими подходами в настоящее время становятся методы, основанные на количественном полнопротеомном анализе с использованием МС высокого разрешения. В первую очередь это относится к так называемой «лекарство-центричной» области химической протеомики, задачей которой является поиск всех возможных мишеней специфического и неспецифического взаимодействия анализируемого соединения на уровне всего протеома клетки. Развитие новых методов ультрабыстрого протеомного анализа позволяет масштабировать решение основных задач химической протеомики по поиску мишеней лекарственного воздействия и разработке новых химиотерапевтических подходов к лечению социально-значимых заболеваний человека. Среди методов химической протеомики, которые особенно активно развивались в последние годы, следует выделить методы, основанные на измерении малых изменений в конформации или стабильности белков, с которыми связался лиганд (такие как TPP, HDX-MS и LiP-MS) и которые не требуют дополнительной дериватизации исследуемого химического соединения. Большинство методов не решают проблему поиска мишеней лекарственного воздействия среди мембранных белков, поскольку, как правило, лекарства образуют с ними слабые, нековалентные связи, и соответствующий эффект в изменении той же термической стабильности белка становится

ниже порога чувствительности измерений. Кроме того, в структурно-зависимых методах ставится задача поиска взаимодействий лекарств с неденатурированными последовательностями белков в их нативной форме, и клеточный лизис осуществляется с использованием соответствующих методик, таких как «заморозка-разморозка» при криогенных температурах. В этом случае, как правило, идет потеря мембранных белков. Решение этих проблем видится в использовании методов, основанных на фотоиндуцированном связывании белков, в первую очередь ССМС, в котором анализируемый лиганд дериватизируется добавлением фотореагирующей группы, которая под действием УФ-излучения образует ковалентные связи с аминокислотными остатками белка-мишени лиганда. В целом, высокопроизводительный полнопротеомный МС-анализ позволяет не только решать в короткие сроки задачи поиска всех возможных мишеней лекарственного воздействия для быстрорастущего разнообразия разрабатываемых химиотерапевтических препаратов, но использовать методы химической протеомики в таких перспективных областях исследований, как перепрограммирование существующих лекарств и персонализированный подбор лекарств с заданными терапевтическими свойствами.

Вклад авторов. И.И. Федоров, В.И. Линева – подбор и анализ литературы по теме обзора, написание текста обзора; И.А. Тарасова – обсуждение темы обзора и описываемых методов; М.В. Горшков – руководство работой над обзором, написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00229).

Благодарности. Авторы выражают благодарность профессору РАН С.А. Мошковскому за плодотворное обсуждение темы обзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schutte, M., Ogilvie, L. A., Rieke, D. T., Lange, B. M. H., Yaspo, M. L., et al. (2017) Cancer precision medicine: why more is more and DNA is not enough, *Public Health Genomics*, **20**, 70-80, doi:10.1159/000477157.
2. Frieri, M., Kumar, K., and Boutin, A. (2017) Antibiotic resistance, *J. Infect. Public Health*, **10**, 369-378, doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.
3. Vasan, N., Baselga, J., and Hyman, D. M. (2019) A view on drug resistance in cancer, *Nature*, **575**, 299-309, doi: 10.1038/s41586-019-1730-1.
4. Ramos, A., Sadeghi, S., and Tabatabaiean, H. (2021)

- Battling chemoresistance in cancer: root causes and strategies to uproot them, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9451, doi: 10.3390/ijms22179451.
5. Ashley, E. A. (2016) Towards precision medicine. *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 507-522, doi: 10.1038/nrg.2016.86.
 6. Mroz, E. A., and Rocco, J. W. (2017) The challenges of tumor genetic diversity, *Cancer*, **123**, 917-927, doi: 10.1002/cncr.30430.
 7. Rix, U., and Superti-Furga, G. (2009) Target profiling of small molecules by chemical proteomics, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 616-624, doi: 10.1038/nchembio.216.
 8. Wright, M. H., and Sieber, S. A. (2016) Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products, *Nat. Prod. Rep.*, **33**, 681-708, doi: 10.1039/c6np00001k.
 9. Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftexhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., et al. (2020) Affinity chromatography: a review of trends and developments over the past 50 years, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1157**, 122332, doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122332.
 10. Huang, F., Zhang, B., Zhou, S., Zhao, X., Bian, C., et al. (2012), Chemical proteomics: terra incognita for novel drug target profiling, *Chinese J. Cancer*, **31**, 507-518, doi: 10.5732/cjc.011.10377.
 11. Pfab, C., Schnobrich, L., Eldnasoury, S., Gessner, A., and El-Najjar, N. (2021) Repurposing of antimicrobial agents for cancer therapy: what do we know? *Cancers (Basel)*, **13**, 3193, doi: 10.3390/cancers13133193.
 12. Kamel, H. F. M., and Al-Amodi, H. S. A. B. (2017) Exploitation of gene expression and cancer biomarkers in paving the path to era of personalized medicine, *Genom. Proteom. Bioinform.*, **15**, 220-235, doi: 10.1016/j.gpb.2016.11.005.
 13. Sneha, P., and Doss, C. G. (2016) Molecular dynamics: new frontier in personalized medicine, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **102**, 181-224, doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.09.004.
 14. Siwy, J., Mischak, H., and Zürbig, P. (2019) Proteomics and personalized medicine: a focus on kidney disease, *Exp. Rev. Proteomics*, **16**, 773-782, doi: 10.1080/14789450.2019.1659138.
 15. Meissner, F., Geddes-McAlister, J., Mann, M., and Bantscheff, M. (2022) The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, doi: 10.1038/s41573-022-00409-3, in press.
 16. Corson, T. W., and Crews, C. M. (2007) Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials, *Cell*, **130**, 769-774, doi: 10.1016/j.cell.2007.08.021.
 17. Aebersold, R., and Mann, M. (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function, *Nature*, **537**, 347-355, doi: 10.1038/nature19949.
 18. Chernobrovkin, A., Marin-Vicente, C., Visa, N., and Zubarev, R. A. (2015) Functional identification of target by expression proteomics (FITeXP) reveals protein targets and highlights mechanisms of action of small molecule drugs, *Sci. Rep.*, **5**, 11176, doi: 10.1038/srep11176.
 19. Saei, A. A., Beusch, C. M., Chernobrovkin, A., Sabatier, P., Zhang, B., et al. (2019) ProTargetMiner as a proteome signature library of anticancer molecules for functional discovery, *Nat. Commun.*, **10**, 5715, doi: 10.1038/s41467-019-13582-8.
 20. Ruprecht, B., Di Bernardo, J., Wang, Z., Mo, X., Ursu, O., et al. (2020) A mass spectrometry-based proteome map of drug action in lung cancer cell lines, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 1111-1119, doi: 10.1038/s41589-020-0572-3.
 21. Schubert, O., Röst, H., Collins, B., Rosenberger, G., and Aebersold, R. (2017) Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research, *Nat. Protoc.*, **12**, 1289-1294, doi: 10.1038/nprot.2017.040.
 22. Cuatrecasas, P. (1970) Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059-3065, doi: 10.1016/S0021-9258(18)63022-4.
 23. Lolli, G., Thaler, F., Valsasina, B., Roletto, F., Knapp, S., et al. (2003) Inhibitor affinity chromatography: profiling the specific reactivity of the proteome with immobilized molecules, *Proteomics*, **3**, 1287-1298, doi: 10.1002/pmic.200300431.
 24. McMasters, D. R. (2018) Knowledge-based approaches to off-target screening, *Methods Enzymol.*, **610**, 311-323, doi: 10.1016/bs.mie.2018.09.023.
 25. Kurien, B. T., and Scofield, R. H. (2015) Western blotting: an introduction, *Methods Mol. Biol.*, **1312**, 17-30, doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7_5.
 26. Dudley, E. (2019) MALDI profiling and applications in medicine, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1140**, 27-43, doi: 10.1007/978-3-030-15950-4_2.
 27. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., and Yates, J. R. 3rd (2013) Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics, *Chem. Rev.*, **113**, 2343-2394, doi: 10.1021/cr3003533.
 28. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*, **258**, 598-599, doi: 10.1038/258598a0.
 29. Sun, X., Chiu, J.-F., and He, Q.-Y. (2005) Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics, *Expert Rev. Proteomics*, **2**, 649-657, doi: 10.1586/14789450.2.5.649.
 30. Ong, S. E., Schenone, M., Margolin, A. A., Li, X., Do, K., et al. (2009) Identifying the proteins to which small-molecule probes and drugs bind in cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4617-4622, doi: 10.1073/pnas.0900191106.
 31. Sanman, L. E., and Bogyo, M. (2014) Activity-based profiling of proteases, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 249-273, doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035352.
 32. Saghatelian, A., Jessani, N., Joseph, A., Humphrey, M., and Cravatt, B. F. (2004) Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10000-10005, doi: 10.1073/pnas.0402784101.
 33. Lone, A. M., Bachovchin, D. A., Westwood, D., Speers, A. E., Timothy, P., et al. (2012) A substrate-free activity-based protein profiling screen for the discovery of selective PREPL inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11665-11674, doi: 10.1021/ja2036095.

34. Greenbaum, D. C., Baruch, A., Grainger, M., Bozdech, Z., Medzihradsky, K. F., et al. (2002) A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite, *Science*, **298**, 2002-2006, doi: 10.1126/science.1077426.
35. Singaravelu, R., Blais, D. R., McKay, C. S., and Pezacki, J. P. (2010) Activity-based protein profiling of the hepatitis C virus replication in Huh-7 hepatoma cells using a non-directed active site probe, *Proteome Sci.*, **8**, 5, doi: 10.1186/1477-5956-8-5.
36. Torkamani, A., and Schork, N. J. (2007) Distribution analysis of nonsynonymous polymorphisms within the human kinase gene family, *Genomics*, **90**, 49-58, doi: 10.1016/j.ygeno.2007.03.006.
37. Hubbard, M. J., and Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation, *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 172-177, doi: 10.1016/0968-0004(93)90109-z.
38. Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling, *Nature*, **411**, 355-365, doi: 10.1038/35077225.
39. Valsasina, B., Kalisz, H. M., and Isacchi, A. (2004) Kinase selectivity profiling by inhibitor affinity chromatography, *Expert Rev. Proteomics*, **1**, 303-315, doi: 10.1586/14789450.1.3.303.
40. Savitski, M. M., Reinhard, F. B. M., Franken, H., Werner, T., Savitski, M. F., et al. (2014) Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome, *Science*, **346**, 1255784, doi: 10.1126/science.1255784.
41. Köster, H., Little, D. P., Luan, P., Muller, R., Siddiqi, S. M., et al. (2007) Capture compound mass spectrometry: a technology for the investigation of small molecule protein interactions, *Assay Drug Dev. Technol.*, **5**, 381-390, doi: 10.1089/adt.2006.039.
42. Fischer, J. J., Michaelis, S., Schrey, A. K., Graebner, O. G., Glinski, M., et al. (2010) Capture compound mass spectrometry sheds light on the molecular mechanisms of liver toxicity of two Parkinson drugs, *Toxicol. Sci.*, **113**, 243-253, doi: 10.1093/toxsci/kfp236.
43. Assal, F., Spahr, L., Hadengue, A., Rubbia-Brandt, L., and Burkhard, P. R. (1998) Tolcapone and fulminant hepatitis, *Lancet*, **352**, 958, doi: 10.1016/S0140-6736(05)61511-5.
44. Silva, T. B., Borges, F., Serrão, M. P., and Soares-da-Silva, P. (2020) Liver says no: the ongoing search for safe catechol O-methyltransferase inhibitors to replace tolcapone, *Drug Discov. Today*, **25**, 1846-1854, doi: 10.1016/j.drudis.2020.07.015.
45. Artusi, C. A., Sarro, L., Imbalzano, G., Fabbri, M., and Lopiano, L. (2021) Safety and efficacy of tolcapone in Parkinson's disease: systematic review, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **77**, 817-829, doi: 10.1007/s00228-020-03081-x.
46. Mateus, A., Kurzawa, N., Becher, I., Sridharan, S., Helm, D., et al. (2020) Thermal proteome profiling for interrogating protein interactions, *Mol. Syst. Biol.*, **16**, e9232, doi: 10.15252/msb.20199232.
47. Tansey, W.P. (2006) Freeze-thaw lysis for extraction of proteins from mammalian cells, *CSH Protoc.*, **2006**, pdb.prot4614, doi: 10.1101/pdb.prot4614.
48. De Souza, N., and Picotti, P. (2020) Mass spectrometry analysis of the structural proteome, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **60**, 57-65, doi: 10.1016/j.sbi.2019.10.006.
49. James, E. I., Murphree, T. A., Vorauer, C., Engen, R., and Guttman, M. (2022) Advances in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and the pursuit of challenging biological systems, *Chem. Rev.*, **122**, 7562-7623, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00279.
50. Kaltashov, I. A., Bobst, C. E., and Abzalimov, R. R. (2013) Mass spectrometry-based methods to study protein architecture and dynamics, *Protein Sci.*, **22**, 530-544, doi: 10.1002/pro.2238.
51. Kaltashov, I. A., Bobst, C. E., and Abzalimov, R. R. (2009) H/D exchange and mass spectrometry in the studies of protein conformation and dynamics: is there a need for a top-down approach? *Anal. Chem.*, **81**, 7892-7899, doi: 10.1021/ac901366n.
52. Campobasso, N., and Huddler, D. (2015) Hydrogen deuterium mass spectrometry in drug discovery, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 3771-3776, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.07.007.
53. Miyagi, M., Tanaka, K., Watanabe, S., Kondo, J., and Kishimoto, T. (2021) Identifying protein-drug interactions in cell lysates using histidine hydrogen deuterium exchange, *Anal. Chem.*, **93**, 14985-14995, doi: 10.1021/acs.analchem.1c02283.
54. Schopper, S., Kahraman, A., Leuenberger, P., Feng, Y., Piazza, I., et al. (2017) Measuring protein structural changes on a proteome-wide scale using limited proteolysis-coupled mass spectrometry, *Nat. Protocols*, **12**, 2391-2410, doi: 10.1038/nprot.2017.100.
55. Cheng, K. W., Wong, C. C., Wang, M., He, Q. Y., and Chen, F. (2010) Identification and characterization of molecular targets of natural products by mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, **29**, 126-155, doi: 10.1002/mas.20235.
56. Pepelnjak, M., de Souza, N., and Picotti, P. (2020) Detecting protein-small molecule interactions Using limited proteolysis-mass spectrometry (LiP-MS), *Trends Biochem. Sci.*, **45**, 919-920, doi: 10.1016/j.tibs.2020.05.006.
57. Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., et al. (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS, *Anal. Chem.*, **75**, 1895-1904, doi: 10.1021/ac0262560.
58. Werner, T., Sweetman, G., Savitski, M. F., Mathieson, T., Bantscheff, M., et al. (2014) Ion coalescence of neutron encoded TMT 10-plex reporter ions, *Anal. Chem.*, **86**, 3594-3601, doi: 10.1021/ac500140S.
59. Gaetani, M., Sabatier, P., Saei, A. A., Beusch, C. M., Yang, Z., et al. (2019) Proteome integral solubility alteration: a high-throughput proteomics assay for target deconvolution, *J. Proteome Res.*, **18**, 4027-4037, doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00500.
60. Li, J., Van Vranken, J. G., Pontano Vaites, L., Schweppe, D. K., Huttlin, E. L., et al. (2020) TMTpreagents: a set of isobaric labeling mass tags enables simultaneous proteome-wide measurements across 16 samples, *Nat. Methods*, **17**, 399-404, doi: 10.1038/s41592-020-0781-4.

61. Dai, L., Prabhu, N., Yu, L. Y., Bacanu, S., Ramos, A. D., et al. (2019) Horizontal cell biology: monitoring global changes of protein interaction states with the proteome-wide Cellular Thermal Shift Assay (CETSA), *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 383-408, doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012837.
62. Li, J., Van Vranken, J. G., Paulo, J. A., Huttlin, E. L., and Gygi, S. P. (2020) Selection of heating temperatures improves the sensitivity of the proteome integral solubility alteration assay, *J. Proteome Res.*, **19**, 2159-2166, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00063.
63. Bekker-Jensen, D. B., Kelstrup, C. D., Batth, T. S., Larsen, S. C., Haldrup, C., et al. (2017) An optimized shotgun strategy for the rapid generation of comprehensive human proteomes, *Cell Syst.*, **4**, 587-599.e4, doi: 10.1016/j.cels.2017.05.009.
64. Meier, F., Geyer, P. E., Virreira Winter, S., Cox, J., and Mann, M. (2018) BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes, *Nat. Methods*, **15**, 440-448, doi: 10.1038/s41592-018-0003-5.
65. Bache, N., Geyer, P. E., Bekker-Jensen, D. B., Hoerning, O., Falkenby, L., et al. (2018) A novel LC system embeds analytes in pre-formed gradients for rapid, ultra-robust proteomics, *Mol. Cell Proteomics*, **17**, 2284-2296, doi: 10.1074/mcp.TIR118.000853.
66. Meier, F., Brunner, A. D., Koch, S., Koch, H., Lubeck, M., et al. (2018) Online parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer, *Mol. Cell Proteomics*, **17**, 2534-2545, doi: 10.1074/mcp.TIR118.000900.
67. Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., et al. (2017) MS/MS-free protein identification in complex mixtures using multiple enzymes with complementary specificity, *J. Proteome Res.*, **16**, 3989-3999, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00365.
68. Teلمان, J., Chawade, A., Sandin, M., Levander, F., and Malmstrom, J. (2016) Dinosaur: a refined open-source peptide MS feature detector, *J. Proteome Res.*, **15**, 2143-2151, doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00016.
69. Zhang, B., Pirmoradian, M., Zubarev, R., and Käll, L. (2017) Covariation of peptide abundances accurately reflects protein concentration differences, *Mol. Cell Proteomics*, **16**, 936-948, doi: 10.1074/mcp.O117.067728.
70. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Abdrakhimov, D. A., Kjeldsen, F., et al. (2021) Boosting MS1-only proteomics with machine learning allows 2000 protein identifications in single-shot human proteome analysis using 5 min HPLC gradient, *J. Prot. Res.*, **20**, 1864-1873, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00863.
71. Messner, C. B., Demichev, V., Bloomfield, N., Yu, J. S. L., White, M., et al. (2021) Ultra-fast proteomics with scanning SWATH, *Nat. Biotechnol.*, **39**, 846-854, doi: 10.1038/s41587-021-00860-4.
72. Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S., and Ralser, M. (2020) DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput, *Nat. Methods*, **17**, 41-44, doi: 10.1038/s41592-019-0638-x.

MASS SPECTROMETRY-BASED CHEMICAL PROTEOMICS FOR DRUG TARGET DISCOVERIES

Mini-Review

I. I. Fedorov^{1,2}, V. I. Lineva², I. A. Tarasova¹, and M. V. Gorshkov^{1*}

¹ Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics,
Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; E-mail: mike.gorshkov@gmail.com

² Moscow Institute of Physics and Technology (National University), 141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Chemical proteomics, emerging rapidly in recent years, has become a main approach to identifying interactions between the small molecules and proteins in the cells on a proteome scale and mapping the signaling and/or metabolic pathways activated and regulated by these interactions. The methods of chemical proteomics allow not only identifying proteins targeted by drugs, characterizing their toxicity and discovering possible off-target proteins, but also elucidation of the fundamental mechanisms of cell functioning under conditions of drug exposure or due to the changes in physiological state of the organism itself. Solving these problems is essential for both basic research in biology and clinical practice, including approaches to early diagnosis of various forms of serious diseases or prediction of the effectiveness of therapeutic treatment. At the same time, recent developments in high-resolution mass spectrometry have provided the technology for searching the drug targets across the whole cell proteomes. This review provides a concise description of the main objectives and problems of mass spectrometry-based chemical proteomics, the methods and approaches to their solution, and examples of implementation of these methods in biomedical research.

Keywords: chemical proteomics, mass-spectrometry, drug targets