

# 无化学修饰的小分子药物靶蛋白鉴定技术及其应用进展

马婕, 刘强

上海交通大学医学院 基础医学院 组织胚胎学与遗传发育学系 上海市生殖医学重点实验室, 上海 200025

马婕, 刘强. 无化学修饰的小分子药物靶蛋白鉴定技术及其应用进展. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1131-1138.

Ma J, Liu Q. Identification techniques of small molecule drug target proteins without chemical modification and its applications: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1131-1138.

**摘要:** 鉴定小分子药物的靶蛋白对于理解药物的作用机理以及药物副作用至关重要。传统方法需要对药物进行化学修饰共价交联, 可能会导致药物活性的改变。目前已经发展多种无需化学修饰便可以对药物靶蛋白鉴定的方法, 包括药物亲和力反应靶标稳定性技术 (Drug affinity responsive target stability, DARTS)、蛋白质氧化速率稳定性技术 (Stability of proteins from rates of oxidation, SPROX)、细胞热移位分析技术 (Cellular thermal shift assay, CETSA) 和热蛋白组分析技术 (Thermal proteome profiling, TPP) 等。文中将介绍这些技术的原理、应用以及各自的优点和局限性, 另外也介绍了这些技术最新的优化方案。

**关键词:** 小分子药物, 无共价修饰, 药物亲和力反应靶标稳定性, 蛋白质氧化速率稳定性, 细胞热移位分析, 热蛋白质组分析

## Identification techniques of small molecule drug target proteins without chemical modification and its applications: a review

Jie Ma, and Qiang Liu

*Department of Histoembryology, Genetics and Developmental Biology, Basic Medical College, Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China*

**Abstract:** Identification of the target proteins of small molecule drugs is crucial for understanding the mechanisms of drug actions and its side effects. Conventional methods require chemical modification, which might alter the activities of the drugs. Various label-free techniques have been developed to identify drug target proteins without chemical modifications. This includes drug affinity responsive target stability (DARTS), stability of proteins from rates of oxidation (SPROX), cellular thermal shift assay (CETSA), thermal proteome profiling (TPP) and many others. Here we review the principles and applications of these label-free techniques, their advantages and limitations, as well as the most recent advances.

**Keywords:** small molecule drugs, label-free, drug affinity responsive target stability, stability of proteins from rates of oxidation, cellular thermal shift assay, thermal proteome profiling

**Received:** July 16, 2020; **Accepted:** October 10, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 81571488, 81771637).

**Corresponding author:** Qiang Liu. Tel: +86-21-63846590-776761; E-mail: qliu0122@shsmu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81571488, 81771637) 资助。

小分子药物在疾病治疗中有非常重要的作用,其通过与细胞中特定的靶分子作用来发挥功能。这些靶分子包括酶、离子通道、核酸等,其中以蛋白质为主要的靶点。因此,鉴定小分子药物作用的靶蛋白对于理解小分子药物的作用机制和应用有着至关重要的作用,同时也可以进一步发现小分子药物的脱靶靶标、副作用以及靶蛋白参与的生物学功能。常规药物靶标的鉴定采用基于化学修饰的方法和基于表型分析的方法。化学修饰方法包括亲和层析、活性位点定向探针技术和蛋白质微阵列技术等<sup>[1-3]</sup>。但基于化学修饰的方法存在一定的局限性,其均需对小分子药物或蛋白质库进行标记或衍生,而小分子药物可能缺乏用于共价交联的位点,或者化学修饰会影响药物与靶蛋白的结合<sup>[4-5]</sup>。因此,无化学修饰的小分子药物靶蛋白筛选技术显得至关重要。目前已经有很多研究应用了无化学修饰方法,而且这些方法可以同时对小分子药物的多个靶标进行鉴定。本文将具体介绍3种无化学修饰鉴定靶蛋白的方法和应用(表1),这3种技术都具有共性:均改变了蛋白质在生物体内的动态平衡,利用配体诱导的蛋白质稳定性增强,包括抗蛋白酶解稳定性、抗氧化稳定性以及抗热处理稳定性,来鉴定小分子药物的靶蛋白。但这3种技术各自有其应用范

围和优缺点。

## 1 药物亲和力反应靶标稳定性 (Drug affinity responsive target stability, DARTS)

### 1.1 DARTS 技术的策略和应用

2009年, Lomenick 等依据转录因子结合的DNA位点对DNase的耐受性增强,以及蛋白质和其天然配体结合后可免受蛋白酶降解的原理,建立了DARTS技术。其主要的策略是将小分子药物与样品蛋白共孵育一定时间后,加入蛋白酶进行消化,由于小分子药物结合后可以保护靶蛋白使其对蛋白酶的敏感性降低,所以电泳凝胶染色后,对比不加药物的消化组,找出受保护的条带,再通过质谱技术就可鉴定出药物靶标蛋白<sup>[6]</sup>(图1)。该技术常用的蛋白酶包括嗜热菌蛋白酶<sup>[6,15]</sup>、枯草杆菌蛋白酶<sup>[16]</sup>、链霉菌蛋白酶<sup>[7-9]</sup>。嗜热菌蛋白酶仅能对非折叠状态蛋白质进行切割,且蛋白质组中相当一部分蛋白对该酶具有抗水解性<sup>[10]</sup>。枯草杆菌蛋白酶具有更强的水解活性,其能水解折叠或非折叠状态的蛋白质,但因此也可能导致药物对靶标蛋白的保护效应降低<sup>[6]</sup>。因此该技术的发明团队更建议使用链霉菌蛋白酶混合酶或多种蛋白酶混合物来进行水解,既保证对靶标蛋白的保护,

表1 无化学修饰鉴定小分子药物靶分子示例

Table 1 Examples of identifying target proteins of small molecule drugs with label-free techniques

Techniques	Drugs	Target proteins	References
DARTS	Rapamycin/FK506	FKBP12	[6]
	E4	mTOR	[6]
	Resveratrol	eIF4	[6]
	$\alpha$ -KG	ATP4B	[7]
	Andrographolide	DRP1	[8]
	Daurisoline	HSP90	[9]
	APZ	HSP70	[10]
SPROX	CsA	Cyclophilin A/UDP-glucose-4-epimerase	[11]
CETSA	MDL-811	SIRT6	[12]
	G6PDi	G6PD	[13]
TPP	Palbociclib	ECM29	[14]

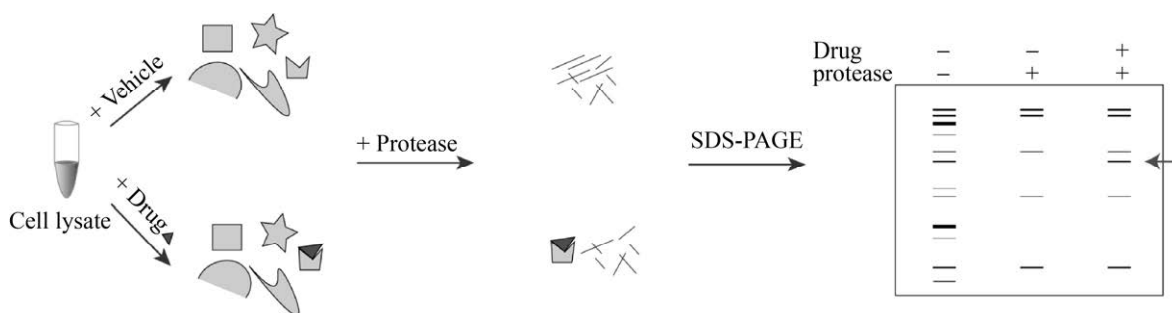


图1 DARTS 技术原理

Fig. 1 Scheme of DARTS.

同时充分水解非靶标蛋白。Lomenick 团队通过检测 Rapamycin、FK506 及其已知靶蛋白 FKBP12 (FK506 binding protein 12), 弱抑制剂 E4 及其已知靶蛋白 mTOR (Mammalian target of rapamycin) 验证了该技术的可行性, 并通过此技术发现了白藜芦醇作用的靶蛋白 eIF4A, 解决了此前一直无法用传统技术解决的问题<sup>[6]</sup>。Chin 等通过 DARTS 技术找到了  $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -ketoglutaric acid,  $\alpha$ -KG) 的靶蛋白 ATP 合成酶  $\beta$  亚基 (ATP synthase subunit beta, ATP4B), 证明了  $\alpha$ -KG 延长寿命需要 ATP4B 参与, 并且依赖于下游的 Rapamycin, 为寿命延长和老年相关疾病的治疗提供了新策略<sup>[7]</sup>。除此之外, 利用该技术也找到了帕金森潜在治疗药物 Andrographolide 的靶蛋白 DRP1<sup>[8]</sup>、肺癌细胞增殖抑制剂 Daurisoline 的靶蛋白 HSP90<sup>[9]</sup>、自噬调节剂 APZ 的靶蛋白 HSP70<sup>[17]</sup>。

## 1.2 DARTS 技术的优缺点

DARTS 技术使用的蛋白样品可为纯化的蛋白质或全细胞裂解液, 并且因为其实验步骤中不存在洗涤, 可以用于低亲和性的靶标筛选<sup>[6]</sup>。但因为该技术需要利用凝胶染色进行可视化比较, 所以其在低丰度靶蛋白的鉴定上存在一定的局限性<sup>[6,18]</sup>。另外也有一些内部因素的限制, 例如进化选择上有些蛋白很难被蛋白酶消化<sup>[10]</sup>。除此之外, 药物结合还可能改变非靶标蛋白对蛋白酶的敏感性, 例如与靶标蛋白相互作用的非靶标蛋白, 或靶标蛋白复合物的非靶标成分。但这也可能成

为一个优点, 因为这在一定范围内可以提供药物结合后蛋白复合体的解离信息<sup>[6]</sup>。总的来说, DARTS 技术是预测药物靶标的可靠方法。

## 2 蛋白质氧化速率稳定性 (Stability of proteins from rates of oxidation, SPROX)

### 2.1 SPROX 的策略和应用

SPROX 也是利用配体诱导的蛋白质稳定性增强的原理建立的。其通过测定靶蛋白的甲硫氨酸 (Met) 氧化的水平, 利用配体诱导的热力学变化鉴定靶蛋白<sup>[7]</sup>。其主要策略是, 首先将蛋白质样品与药物或对照溶剂共孵育, 在浓度越来越高的化学变性剂 (如盐酸胍) 的存在下, 加入氧化剂 (如过氧化氢) 氧化甲硫氨酸形成甲硫氨酸亚砷 (Met-O) 或甲硫氨酸砷 (Met-O<sub>2</sub>), 随后淬灭氧化反应, 胰酶消化成肽段后进行 LC-MS/MS 定量分析变性剂浓度依赖的甲硫氨酸的氧化速率, 当以未氧化和氧化的含 Met 肽段的量为纵坐标, 变性剂浓度为横坐标时, 药物结合蛋白未氧化和氧化的含 Met 肽段的转变中点右移<sup>[11]</sup> (图 2)。在验证技术策略时, SPROX 技术成功鉴定出已知的环孢菌素 A (CsA) 的靶蛋白——亲环蛋白 A (Cyclophilin A) 和 UDP-葡萄糖-4-表观异构酶 (UDP-glucose-4-epimerase), 并且找到了 8 个新的 CsA 靶蛋白<sup>[11]</sup>。此外, Dearmond 等在酵母中利用该技术验证了  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 结合的蛋白质, 并且发现了 7 个白藜芦醇作用的靶蛋白<sup>[19]</sup>。有趣

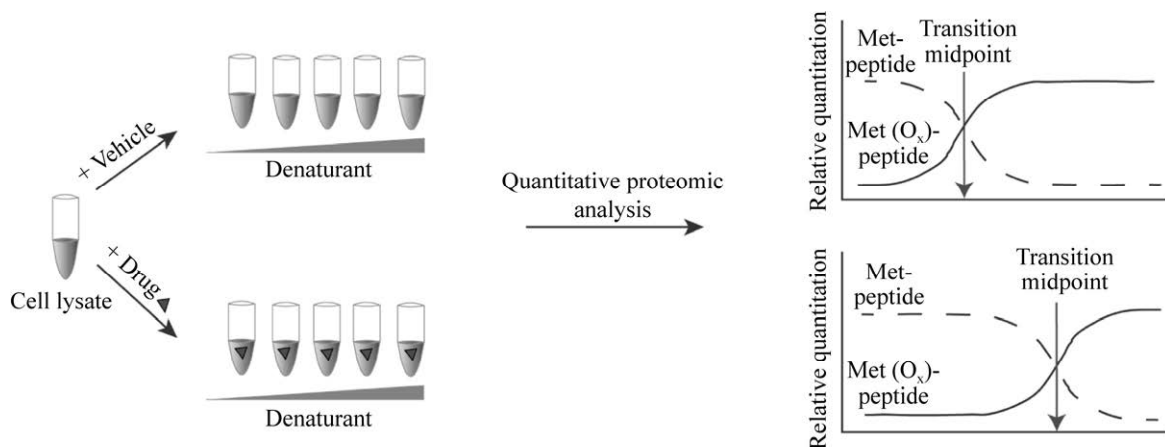


图 2 SPROX 技术原理

Fig. 2 Scheme of SPROX.

的是,该团队利用 SPROX 技术检测 DARTS 技术发现的白藜芦醇靶蛋白 eIF4A 时,没有观察到转变中点的显著变化,即使使用纯化的蛋白,也无法证明这两者直接结合。其团队推测可能是因为 eIF4A 和白藜芦醇的低亲和性,并且在纯化 eIF4A 时,C 端加入的纯化标签可能影响了药物和靶标的结合<sup>[19]</sup>。除此之外,SPROX 技术还可以用来检测蛋白生物学状态的变化。Roberts 等利用该技术分析了 6 个月和 18 个月小鼠的大脑组织裂解中蛋白质的热力学稳定性,发现了 83 个具有年龄相关稳定性差异的蛋白质,建立了这些蛋白质与衰老之间的联系<sup>[20]</sup>。

## 2.2 SPROX 技术的优缺点

该技术的主要局限性是其通过检测和定量甲硫氨酸肽段氧化率来反应蛋白质热力学稳定性,而蛋白质中的甲硫氨酸的出现频率相对较低(约 2.5%)<sup>[21]</sup>。但是考虑到绝大多数蛋白质都至少含有一个甲硫氨酸,一个残基也可以反映蛋白折叠/解折叠平衡的全局信息,因此该技术其实是不受低频率的甲硫氨酸的限制<sup>[22]</sup>。尽管 SPROX 技术需要较高浓度的药物处理( $\mu\text{mol/L}$ – $\text{mmol/L}$ ),但是这种技术利用的甲硫氨酸不可逆性氧化,使得下游定量蛋白质组学的使用上具有灵活性<sup>[23-24]</sup>。例如,将

SPROX 与串联质谱标签 TMT 结合,获得高分辨率变性曲线 HR-SPROX (High-resolution SPROX) 的技术,其可对符合两态折叠模型的蛋白质,计算得到基线氧化水平、 $[\text{变性剂}]_{1/2}$ 、折叠自由能  $\Delta G_{\text{folding}}$  及  $m$  值 ( $\Delta G_{\text{folding}}$  与  $[\text{变性剂}]$  的线性关系斜率)<sup>[25]</sup>。将 SPROX 与培养细胞稳定同位素标记氨基酸技术 (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC) 相结合,通过标记蛋白质氨基来确定肽的相对含量,以此扩大 SPROX 在全蛋白质组上的覆盖率<sup>[26]</sup>。Walker 等首先测量了  $\Delta G_{\text{folding}}$ ,验证了利用 HR-SPROX 技术的可行性,随后分析了人成纤维细胞蛋白质组的折叠热力学信息<sup>[25]</sup>。Liu 等利用 SILAC-SPROX 技术分析了不同乳腺癌细胞系蛋白质稳定性差异,证明了可以用热力学稳定性差异来区分不同的乳腺癌亚型<sup>[27]</sup>。

## 3 细胞热移位分析 (Cellular thermal shift assay, CETSA) 和热蛋白组分析 (Thermal proteome profiling, TPP)

### 3.1 CETSA 及 TPP 技术的策略和应用

CETSA 基于配体诱导的靶蛋白热力学稳定性改变的原理,于 2013 年首次被提出<sup>[28]</sup>。CETSA

的主要策略是将细胞裂解液或完整细胞和药物或溶剂共孵育后加热至不同温度，再将可溶性蛋白上清液通过离心分离开来，随后利用不同检测方法检测热力学稳定性差异的蛋白<sup>[29]</sup> (图 3)。最常用的检测方法是免疫印迹法<sup>[29]</sup>，其可以检测药物和靶蛋白的亲合力或结合效率，推算出药物的  $IC_{50}$ ，或者鉴定药物脱靶蛋白<sup>[30]</sup>；也可以通过酶联免疫吸附实验和免疫荧光技术来检测可溶性成分<sup>[29,31]</sup>；另外也可以分离可溶性蛋白并检测配体-靶蛋白的溶解曲线的变化。该技术的发明者在细胞裂解液、完整细胞或组织样品中验证了 3 种抗癌剂 Methotrexate、Raltitrexed 和 TNP-470 的已知生物靶标<sup>[28]</sup>。Shang 等利用 CETSA 联合免疫印迹法对筛选出的大肠癌相关 SIRT6 蛋白激动剂进行验证，证明了 MDL-811 药物在胞内能稳定结合 SIRT6<sup>[11]</sup>。Ghergurovich 等利用 CETSA 技术确认了葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) 与其新型非类固醇抑制剂 G6PDi-1 的直接物理结合性<sup>[13]</sup>。特别值得注意的是，通过测定一定温度范围内处理的细胞和裂解物可溶性蛋白组分的变化可反映全蛋白质组热稳定性的信息，因此结合定量质谱技术便可以在全蛋白质组上分析蛋白质与其配体的相互作用，上述方法称之为 CETSA-MS 或热蛋白组分析技术 (Thermal proteome profiling, TPP)<sup>[32-33]</sup>。Savitski 等首先将 TPP 技术结合了 10 标串联质谱标签

(TMT10) 鉴定了几种激酶抑制剂的脱靶靶标，并观察到了完整细胞内 ATP 结合蛋白的热稳定性增加，表明内源配体对靶蛋白质具有稳定作用<sup>[33]</sup>。此后，TPP 技术逐渐拓展至蛋白质-代谢物、蛋白质-核酸、蛋白质-蛋白质相互作用或翻译后修饰等导致的蛋白质组热稳定性变化的研究上<sup>[34-36]</sup>。有两个团队利用该技术分析了细胞周期中蛋白质的热力学稳定性变化，为研究蛋白质参与特定生理活动或在特定细胞状态中所起的作用提供了一种新颖的方法<sup>[34-35]</sup>。Potel 等将 TPP 技术与磷酸化蛋白质组学技术联合，提供了一种在蛋白质组范围上评估磷酸化位点和功能相关性的方法<sup>[36]</sup>。另外，蛋白质复合物有一种热邻近聚集现象，即最不耐热的亚基会驱动聚集过程，导致整个蛋白复合物趋向同一个温度发生沉淀<sup>[37]</sup>。基于此现象，Miettinen 等利用 TPP 技术，发现 Palbociclib 处理后 20S 蛋白酶体的  $\Delta T_m$  升高是药物间接调控 ECM29 从蛋白酶体的解离导致 20S 蛋白酶体的稳定性增强<sup>[14]</sup>。

### 3.2 CETSA 和 TPP 技术的优缺点

CETSA 由传统的热位移分析技术 (Thermal shift assay, TSA) 改进而来，相比于 TSA 只能使用纯化的蛋白质，CETSA 将样品范围拓宽至全细胞裂解液、完整的细胞上，甚至组织也能应用<sup>[26]</sup>。最初该技术仅考虑了可溶性蛋白，但先前的研究

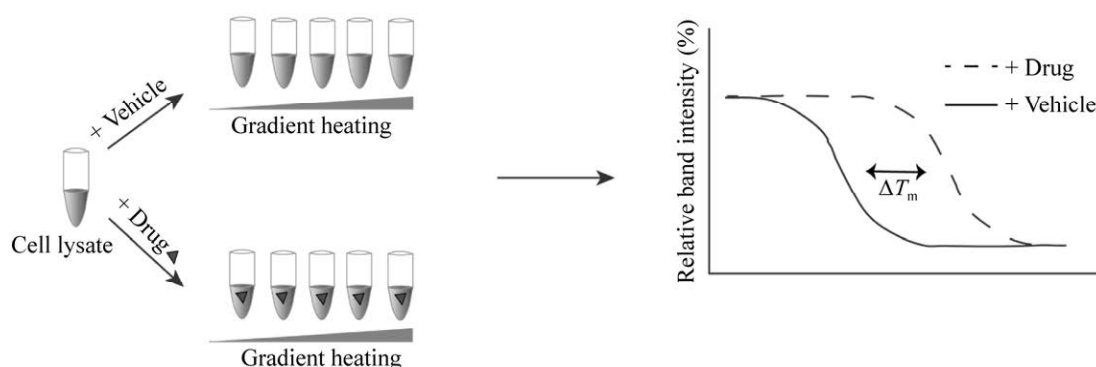


图 3 CETSA 技术原理

Fig. 3 Scheme of CETSA.

中已经证明了膜整合蛋白可以通过热稳定性来检测其配体结合<sup>[38-39]</sup>, 因此该技术的研发团队在2015年也扩展了TPP技术检测小分子药物膜蛋白靶标的实验策略。其主要改进是使用温和的去垢剂抽提蛋白。他们对一系列的去垢剂进行筛选后, 最终选择了0.4% NP-40, 这足以溶解许多膜蛋白, 并且不影响蛋白质和药物的亲和能力<sup>[40-41]</sup>。

但是, CETSA的加热处理可能会影响细胞膜的通透性, 从而使原本在生理温度下不能进入细胞的药物进入细胞内造成假阳性<sup>[28,42]</sup>。因此需要改进条件用最短的时间和最有效的加热方法来进行热处理, 同时可以加入对照实验, 检验各温度下细胞膜通透性的改变<sup>[30,42]</sup>。另外, 药物与细胞预孵育时间也可能会影响药物靶向相应的蛋白质。如果药物参与快速响应的信号通路, 它们可能会导致靶蛋白的翻译后的状态改变, 因此再利用免疫学方法检测该蛋白时, 可能会影响抗体检测蛋白的能力。该情况下, 可以选择能区分不同形式蛋白的抗体, 或者选择MS来鉴定靶蛋白。如果孵育时间过长, 药物可能影响转录和翻译活性, 导致蛋白水平变化, 影响后续的检测。所以要合理控制孵育时间, 通常建议30-60 min<sup>[42]</sup>。

在TPP的应用中, 也出现过许多挑战。有一些蛋白质的熔解曲线并不能重现<sup>[43]</sup>, 表现为低温下解链或高温下仅部分熔解等现象<sup>[37]</sup>。Lim等针对这一问题, 基于等温剂量反应 (Isothermal dose-response fingerprint, ITDRF), 建立了一种新的策略, 即设置37 °C、52 °C和58 °C三个温度梯度和10个药物浓度梯度, 检测不同温度、不同药物浓度下, 蛋白质组的稳定性变化。该团队在核苷酸和蛋白质的互作上验证了这种方法的可行性<sup>[43]</sup>。Becher等也提出了一种改进方法, 叫作2D-TPP (设置12个不同温度及5个药物浓度梯度)<sup>[44]</sup>。这两种技术允许使用较大的药物浓度来估计药物的相对亲和力, 并且规避了熔解曲线的测量。除此之外, 这两种技术还允许在同一次质谱中分析不

同条件处理的样品, 极大地提高了TPP实验的灵敏度和严格性。

## 4 总结与展望

鉴定小分子药物靶标对于推动生物医学研究具有重大意义, 通过找到药物作用的靶蛋白可以阐明药物作用机理, 寻找潜在治疗价值, 也可以了解脱靶相关的副作用。本文介绍了3种无化学修饰鉴定小分子药物靶蛋白的方法, 规避了常规化学修饰鉴定法对小分子药物活性和亲和力的影响, 同时上述后两种方法将实验对象拓宽至完整细胞甚至组织上, 展现出细胞原位的药物-蛋白结合, 使研究结果更加可信。另外, 随着蛋白质组学的发展, 上述技术与组学的多重联用也可以拓宽蛋白的检测范围, 我们也期待着这些鉴定技术得到持续地改进和发展, 成为鉴定小分子药物靶蛋白强有力的工具。

## REFERENCES

- [1] Min J, Kim YK, Cipriani PG, et al. Forward chemical genetic approach identifies new role for GAPDH in insulin signaling. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(1): 55-59.
- [2] Park J, Koh M, Park SB. From noncovalent to covalent bonds: a paradigm shift in target protein identification. *Mol Biosyst*, 2013, 9(4): 544-550.
- [3] Sleno L, Emili A. Proteomic methods for drug target discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(1): 46-54.
- [4] Annis DA, Nickbarg E, Yang XS, et al. Affinity selection-mass spectrometry screening techniques for small molecule drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11(5): 518-526.
- [5] Burdine L, Kodadek T. Target identification in chemical genetics: the (often) missing link. *Chem Biol*, 2004, 11(5): 593-597.
- [6] Lomenick B, Hao R, Jonai N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21984-21989.

- [7] Chin RM, Fu XD, Pai MY, et al. The metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*, 2014, 510(7505): 397-401.
- [8] Geng J, Liu W, Gao J, et al. Andrographolide alleviates parkinsonism in MPTP-PD mice via targeting mitochondrial fission mediated by dynamin-related protein 1. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(23): 4574-4591.
- [9] Huang XH, Yan X, Zhang QH, et al. Direct targeting of HSP90 with daurisolone destabilizes  $\beta$ -catenin to suppress lung cancer tumorigenesis. *Cancer Lett*, 2020, 489: 66-78.
- [10] Park C, Zhou S, Gilmore J, et al. Energetics-based protein profiling on a proteomic scale: identification of proteins resistant to proteolysis. *J Mol Biol*, 2007, 368(5): 1426-1437.
- [11] West GM, Tang LJ, Fitzgerald MC. Thermodynamic analysis of protein stability and ligand binding using a chemical modification- and mass spectrometry-based strategy. *Anal Chem*, 2008, 80(11): 4175-4185.
- [12] Shang JL, Zhu ZH, Chen YY, et al. Small-molecule activating SIRT6 elicits therapeutic effects and synergistically promotes anti-tumor activity of vitamin D<sub>3</sub> in colorectal cancer. *Theranostics*, 2020, 10(13): 5845-5864.
- [13] Ghergurovich JM, García-Cañaveras JC, Wang J, et al. A small molecule G6PD inhibitor reveals immune dependence on pentose phosphate pathway. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(7): 731-739.
- [14] Miettinen TP, Peltier J, Härtlova A, et al. Thermal proteome profiling of breast cancer cells reveals proteasomal activation by CDK4/6 inhibitor palbociclib. *EMBO J*, 2018, 37(10): e98359.
- [15] Tanie Y, Kuboyama T, Tohda C. GRP78-mediated signaling contributes to axonal growth resulting in motor function recovery in spinal cord-injured mice. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 789.
- [16] Ceccacci S, Deitersen J, Mozzicafreddo M, et al. Carbamoyl-phosphate synthase 1 as a novel target of phomoxanthone A, a bioactive fungal metabolite. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 846.
- [17] Hwang HY, Cho YS, Kim JY, et al. Autophagic inhibition via lysosomal integrity dysfunction leads to antitumor activity in glioma treatment. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(3): 543.
- [18] Chang J, Kim Y, Kwon HJ. Advances in identification and validation of protein targets of natural products without chemical modification. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(5): 719-730.
- [19] Dearmond PD, Xu Y, Strickland EC, et al. Thermodynamic analysis of protein-ligand interactions in complex biological mixtures using a shotgun proteomics approach. *J Proteome Res*, 2011, 10(11): 4948-4958.
- [20] Roberts JH, Liu F, Karnuta JM, et al. Discovery of age-related protein folding stability differences in the mouse brain proteome. *J Proteome Res*, 2016, 15(12): 4731-4741.
- [21] Baud F, Karlin S. Measures of residue density in protein structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12494-12499.
- [22] Geer MA, Fitzgerald MC. Energetics-based methods for protein folding and stability measurements. *Annu Rev Anal Chem*, 2014, 7: 209-228.
- [23] Kaur U, Meng H, Lui F, et al. Proteome-wide structural biology: an emerging field for the structural analysis of proteins on the proteomic scale. *J Proteome Res*, 2018, 17(11): 3614-3627.
- [24] McFedries A, Schwaid A, Saghatelian A. Methods for the elucidation of protein-small molecule interactions. *Chem Biol*, 2013, 20(5): 667-673.
- [25] Walker EJ, Bettinger JQ, Welle KA, et al. Global analysis of methionine oxidation provides a census of folding stabilities for the human proteome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(13): 6081-6090.
- [26] Tran DT, Adhikari J, Fitzgerald MC. Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)-based strategy for proteome-wide thermodynamic analysis of protein-ligand binding interactions. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(7): 1800-1813.
- [27] Liu F, Meng H, Fitzgerald MC. Large-scale analysis of breast cancer-related conformational changes in proteins using SILAC-SPROX. *J Proteome Res*, 2017, 16(9): 3277-3286.
- [28] Molina DM, Jafari R, Ignatushchenko M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*, 2013, 341(6141): 84-87.
- [29] Seashore-Ludlow B, Axelsson H, Lundbäck T.

- Perspective on CETSA literature: toward more quantitative data interpretation. *SLAS Discov*, 2020, 25(2): 118-126.
- [30] Miettinen TP, Björklund M. NQO2 is a reactive oxygen species generating off-target for acetaminophen. *Mol Pharmaceutics*, 2014, 11(12): 4395-4404.
- [31] Axelsson H, Almqvist H, Seashore-Ludlow B, et al. Screening for target engagement using the cellular thermal shift assay—CETSA//Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016: 649-674.
- [32] Mateus A, Kurzawa N, Becher I, et al. Thermal proteome profiling for interrogating protein interactions. *Mol Syst Biol*, 2020, 16(3): e9232.
- [33] Savitski MM, Reinhard FBM, Franken H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science*, 2014, 346(6205): 1255784.
- [34] Becher I, Andrés-Pons A, Romanov N, et al. Pervasive protein thermal stability variation during the cell cycle. *Cell*, 2018, 173(6): 1495-1507.e18.
- [35] Dai LY, Zhao TY, Bisteau X, et al. Modulation of protein-interaction states through the cell cycle. *Cell*, 2018, 173(6): 1481-1494.e13.
- [36] Potel CM, Kurzawa N, Becher I, et al. Impact of phosphorylation on thermal stability of proteins. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.01.14.903849.
- [37] Dai LY, Prabhu N, Yu LY, et al. Horizontal cell biology: monitoring global changes of protein interaction states with the proteome-wide cellular thermal shift assay (CETSA). *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 383-408.
- [38] Guettou F, Quistgaard EM, Raba M, et al. Selectivity mechanism of a bacterial homolog of the human drug-peptide transporters PepT1 and PepT2. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(8): 728-731.
- [39] Quistgaard EM, Löw C, Moberg P, et al. Structural and biophysical characterization of the cytoplasmic domains of human BAP29 and BAP31. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e71111.
- [40] Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, et al. Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(9): 1035-1044.
- [41] Reinhard FBM, Eberhard D, Werner T, et al. Thermal proteome profiling monitors ligand interactions with cellular membrane proteins. *Nat Methods*, 2015, 12(12): 1129-1131.
- [42] Jafari R, Almqvist H, Axelsson H, et al. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nat Protocols*, 2014, 9(9): 2100-2122.
- [43] Lim YT, Prabhu N, Dai LY, et al. An efficient proteome-wide strategy for discovery and characterization of cellular nucleotide-protein interactions. *PLoS ONE*, 2018, 13(12): e0208273.
- [44] Becher I, Werner T, Doce C, et al. Thermal profiling reveals phenylalanine hydroxylase as an off-target of panobinostat. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(11): 908-910.

(本文责编 郝丽芳)