

小分子与蛋白质相互作用研究的新方法-PELSA

唐致恒, 刘小云

(北京大学基础医学院病原生物学系, 北京 100191)



刘小云, 北京大学基础医学院病原生物学系研究员, 北医三院感染疾病中心双聘教授。获“海外高层次人才计划”和“国家优秀青年基金”资助。目前担任中国分析测试协会医学质谱分会副秘书长、中国蛋白质组学专委会常务委员、中国化学会质谱分析专委会和色谱专委会委员, 国际蛋白质组学核心期刊 J Proteome Res、微生物学专业期刊 Microorganisms、《质谱学报》编委等职务。课题组致力于发展和运用高通量蛋白质组学技术研究人类重要病原菌与宿主互作的分子机理, 发现了一系列细菌毒力因子催化的全新蛋白质翻译后修饰, 包括磷酸胆碱修饰、单酶催化的泛素化、新型 ADP 核糖基化和磷酸基腺苷酸化修饰。以通信作者(含共同)在 Nature(2 篇), Nat Microbiol, Mol Cell, Nat Commun(5 篇), Cell Rep(2 篇), Mol Cell Proteomics(4 篇)等期刊上发表论文近 100 余篇。

子催化的全新蛋白质翻译后修饰, 包括磷酸胆碱修饰、单酶催化的泛素化、新型 ADP 核糖基化和磷酸基腺苷酸化修饰。以通信作者(含共同)在 Nature(2 篇), Nat Microbiol, Mol Cell, Nat Commun(5 篇), Cell Rep(2 篇), Mol Cell Proteomics(4 篇)等期刊上发表论文近 100 余篇。

小分子-蛋白质相互作用在生命活动中发挥着重要作用, 广泛参与几乎所有的生物学过程。蛋白质与小分子配体(如药物、代谢物、金属离子和核酸等)的结合能够调控蛋白质的结构、功能及其生物学活性。因此, 研究蛋白质-小分子相互作用对于药物开发、生物分子功能解析及疾病机制研究都具有重要意义。然而, 与蛋白质-蛋白质互作相比, 研究小分子-蛋白质互作的有效工具则明显不足。例如, 如何规模化筛选小分子的蛋白靶标并实现其精准鉴定至今仍是一项非常有挑战性的任务。

目前已有的方法大致可分为两类, 其中一类需要对小分子配体进行化学修饰或改造, 以便其能与亲和树脂稳定结合后用于相互作用蛋白质的钓取。由于化学修饰后的小分子未必能保持其配体活性, 该类方法在一定程度上缺乏普适性。近年来发展起来的细胞热迁移分析(cellular thermal shift assay, CETSA)、蛋白质组热稳定性分析(thermal proteome profiling, TPP)和限制性酶解-质谱分析(limited proteolysis-mass spectrometry, LiP-MS)等策略无需依赖小分子配体的化学改造, 受到了研究人员的广泛关注^[1-3]。该类方法利用定量质谱技术直接检测天然活性小分子结合或作用于其蛋白质靶标后对蛋白质整体热稳定性或酶切敏感性的改变, 从而发现其互作蛋白或进一步分析靶标蛋白的潜在结合区域。

因为摒弃了对小分子化学修饰的要求, 这类技术的普适性确实得到了极大提升。然而, 最终待分析的样品是整个蛋白组, 而非亲和纯化后组成相对简单的互作蛋白混合物, 因此对下游质谱检测的灵敏度和覆盖率提出了更大挑战。比如, 采用 TPP 分析时, 如果小分子的互作靶标的表达水平较低(低

丰度蛋白),则在蛋白质组分析中检测到它(的差异)的可能性会大大降低。同样,对于 LiP-MS 技术而言,第二步完全酶解后的样品分析也是整个蛋白质组,需要研究人员在“大海探针”的过程中找到差异肽(或蛋白)。上述技术瓶颈导致现有方法难以高效、全面地解析复杂样品中小分子配体的结合靶标及结合区域。因此,开发一种灵敏、高效且适应性广的新方法已成为研究小分子-蛋白质相互作用的迫切需求。

近期,中国科学院大连化学物理研究所叶明亮研究团队开发了一种以肽段为中心的蛋白质局部稳定性探测方法(peptide-centric local stability assay, PELSA)用于小分子结合蛋白的高通量筛选与鉴定^[4]。该方法利用蛋白质与小分子结合后其酶切敏感性发生改变的原理,这与前期 LiP-MS 方法是类似的。然而不同的是,PELSA 方法采用高浓度胰蛋白酶(酶/底物比为 1:2)在非变性条件酶解蛋白质(部分消化),直接生成适合质谱检测的肽段。相比传统 LiP-MS 方法的两步酶解及蛋白质完全消化,PELSA 不仅显著简化了实验流程,更为重要的是部分消化策略极大降低了蛋白质组样品的复杂程度,大幅提高了小分子靶标蛋白鉴定的深度和灵敏度。通过比较小分子处理组与对照组中肽段丰度的差异,PELSA 能够捕捉小分子结合引起的蛋白质局部稳定性变化,从而推断结合蛋白及结合区域。该方法在检测低丰度靶标蛋白或弱配体结合的相互作用中优势显著。例如,在泛激酶抑制剂星孢菌素靶标的研究中,PELSA 在 K562 和 HeLa 细胞裂解液中分别鉴定了 120 和 108 个激酶靶标,远超 LiP-MS 和 TPP 的鉴定数量。此外,PELSA 可用于多种类型配体的研究,包括小分子药物、抗体、金属离子和代谢物。

总体来说,叶明亮团队开发的 PELSA 方法无需对小分子进行化学修饰,也不依赖于强亲和力的相互作用,能够直接在复杂样品(如细胞裂解液)中高效鉴定配体结合蛋白质和结合区域,在药物开发、生物分子功能解析以及基础研究中均有着广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] MOLINA D M, JAFARI R, IGNATUSHCHENKO M, SEKI T, LARSSON E A, DAN C, SREEKUMAR L, CAO Y, NORDLUND P. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay[J]. *Science*, 2013, 341(6 141): 84-87.
- [2] SAVITSKI M M, REINHARD F B M, FRANKEN H, WERNER T, SAVITSKI M F, EBERHARD D, MOLINA D M, JAFARI R, DOVEGA R B, KLAEGER S, KUSTER B, NORDLUND P, BANTSCHKEFF M, DREWES G. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome[J]. *Science*, 2014, 346(6 205): 1 255 784.
- [3] FENG Y, de FRANCESCHI G, KAHRAMAN A, SOSTE M, MELNIK A, BOERSEMA P J, de LAURETO P P, NIKOLAEV Y, OLIVEIRA A P, PICOTTI P. Global analysis of protein structural changes in complex proteomes[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(10): 1 036-1 044.
- [4] LI K, CHEN S, WANG K, WANG Y, XUE L, YE Y, FANG Z, LYU J, ZHU H, LI Y, YU T, YANG F, ZHANG X, GUO S, RUAN C, ZHOU J, WANG Q, DONG M, LUO C, YE M. A peptide-centric local stability assay enables proteome-scale identification of the protein targets and binding regions of diverse ligands[J]. *Nature Methods*, 2024, doi: [10.1038/s41592-024-02553-7](https://doi.org/10.1038/s41592-024-02553-7).