

Metody pro studium protein-proteinových a protein-ligandových interakcí

Methods for Analysis of Protein-protein and Protein-ligand Interactions

Ďurech M., Trčka F., Vojtěšek B., Müller P.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

K udržování buněčné homeostázy je nutné, aby buněčné proteiny vytvářely složité a dynamické molekulární komplexy. Proto je i vysvětlení základních fyziologických procesů na molekulární úrovni založeno na studiu protein-proteinových interakcí. Nejdříve probíhá kvalitativní analýza proteinových komplexů. Následně jsou identifikované proteinové interakce kvantifikovány po biochemické stránce. Detailní informace o strukturní podstatě daných protein-proteinových interakcí pak mohou být získány pomocí krystalografických metod. Náhled do uspořádání proteinových komplexů na molekulární úrovni umožňuje racionálně navrhovat nové syntetické látky, které cíleně ovlivňují proteinové interakce a tím i nejrůznější fyziologické nebo patologické procesy. Tato souhrnná práce je zaměřena na popis nejčastěji používaných metod pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení proteinových interakcí. Metody koimunoprecipitace (Co-IP) a afinitní koprecipitace je možné využít jako prvotní nástroj pro identifikaci interakčních partnerů studovaného proteinu. Detailní biochemická analýza mezimolekulární interakce pak vyžaduje definování kinetických a termodynamických parametrů. Pro studium afinity dvou interakčních partnerů a kinetiky reakce je možné použít metodu rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance – SPR), pro studium afinity a inhibičního potenciálu inhibitorů metodu fluorescenční polarizace (FP) a pro detailní popis afinity a termodynamických parametrů interakce (ΔG , ΔH a ΔS) metodu izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry – ITC). Výzkum proteinových interakcí na molekulární úrovni je nejen významný pro základní výzkum, ale přináší i nové metodické přístupy, které otvírají další možnosti při racionálním navrhování nových terapeutických látek.

Klíčová slova

mapy interakcí proteinů – koimunoprecipitace – afinitní koprecipitace – rezonance povrchového plazmonu – fluorescenční polarizace – izotermální titrační kalorimetrie

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Petr Müller, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: muller@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 31. 1. 2014

Přijato/Accepted: 10. 3. 2014

Summary

In order to maintain cellular homeostasis, cellular proteins coexist in complex and variable molecular assemblies. Therefore, understanding of major physiological processes at molecular level is based on analysis of protein-protein interaction networks. Firstly, composition of the molecular assembly has to be qualitatively analyzed. In the next step, quantitative biochemical properties of the identified protein-protein interactions are determined. Detailed information about the protein-protein interaction interface can be obtained by crystallographic methods. Accordingly, the insight into the molecular architecture of these protein-protein complexes allows us to rationally design new synthetic compounds that specifically influence various physiological or pathological processes by targeted modulation of protein interactions. This review is focused on description of the most used methods applied in both qualitative and quantitative analysis of protein-protein interactions. Co-immunoprecipitation and affinity co-precipitation are basic methods designed for qualitative analysis of protein binding partners. Further biochemical analysis of the interaction requires definition of kinetic and thermodynamic parameters. Surface plasmon resonance (SPR) is used for description of affinity and kinetic profile of the interaction, fluorescence polarization (FP) method for fast determination of inhibition potential of inhibitors and isothermal titration calorimetry (ITC) for definition of thermodynamic parameters of the interaction (ΔG , ΔH and ΔS). Besides the importance of uncovering the molecular basis of protein interactions for basic research, the same methodological approaches open new possibilities in rational design of novel therapeutic agents.

Key words

protein interaction networks – co-immunoprecipitation – pull-down analysis – surface plasmon resonance – fluorescence polarization – isothermal titration calorimetry

Úvod

Základním zprostředkovatelem buněčných mezimolekulárních interakcí jsou proteiny. Schopnost proteinů vázat pevně a s vysokou specifitou ostatní molekuly jim umožňuje plnit široké spektrum funkcí. Enzymy katalyzují chemické reakce účastníci se metabolismu, replikace, opravy a transkripce DNA. Obdivuhodná je schopnost protonových pump (H^+ -ATPáz) vytvářet elektrochemický gradient na plazmatické membráně translokací protonů přes membránu [1]. Některé enzymy kovalentně modifikují jiné proteiny přidáním nebo odebráním funkční skupiny. Rychlost reakce katalyzované enzymem je obrovská – v některých případech dochází až k 10^{17} násobnému urychlení oproti nekatalyzované reakci (pro představivost 18 milisekund trvající reakce katalyzovaná orotát dekarboxylázou by trvala 78 milionů let bez přítomnosti enzymu) [2]. Velké množství proteinů je zapojeno také v procesech buněčné signalizace a transdukce signálu z vnějšího prostředí do nitra buňky. Transmembránové proteiny sloužící jako receptory na povrchu buněk mají schopnost selektivní interakce s extracelulárními signálními molekulami, důsledkem čehož dochází ke specifické odpovědi uvnitř buňky. Příkladem uvedené signalizace je přenos nervového signálu vyvolaný vazbou neurotransmiterů na membránové receptory neuronů. Pro buněčné rozpoznávání je důležitá vysoká specifita lek-

tinů při interakci se sacharidovými strukturami na povrchu buněk [3]. Také uvnitř buňky dochází k nespočtu interakcí receptorů s menšími biomolekulami (ligandy). Vazbu kyslíku v erytrocytech umožňuje hemoglobin, pro adaptivní imunitní odpověď je důležitá interakce protilátek s antigenem. Další velkou skupinu tvoří strukturální proteiny poskytující buňkám strukturální oporu (cytoskeletální proteiny) nebo sloužící jako molekulární motory (myozin, kinezin, dynein) zodpovědné za buněčnou motilitu jednobuněčných organismů, spermií a taky za kontrakci svalů.

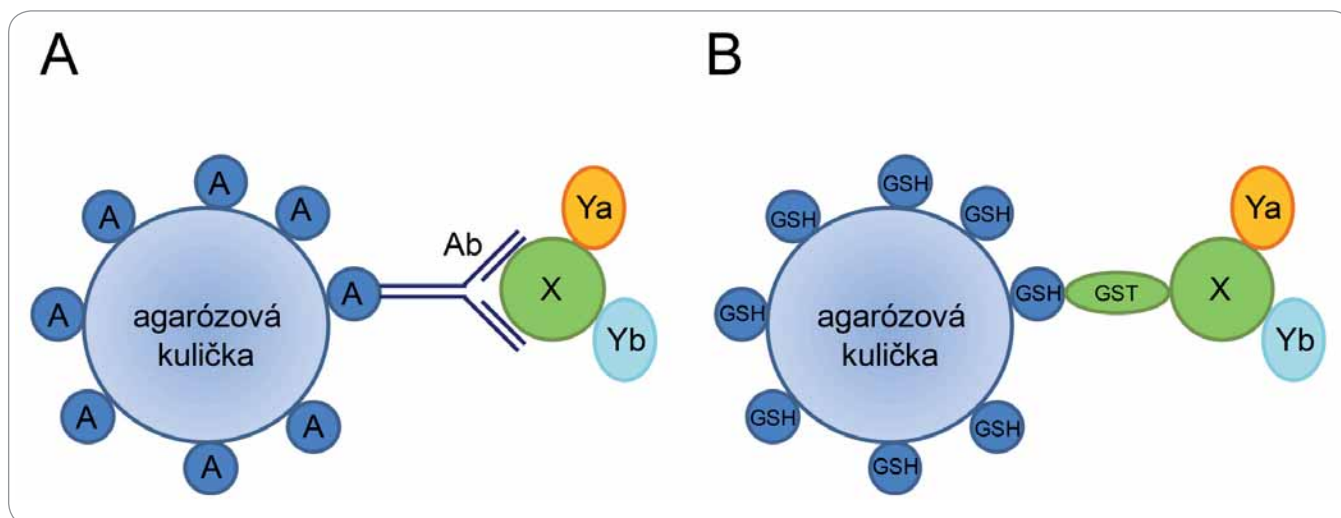
Výše uvedené příklady interakcí se označují jako protein-proteinové (PP) a protein-ligandové (PL) interakce. Počet experimentálních metod pro detekci a analýzu PP a PL interakcí je v současnosti natolik vysoký, že jejich popis by přesahoval rozsah vyhrazený pro tuto problematiku. Cílem této práce se proto stává seznámit čtenáře s několika vybranými biochemickými metodami často používanými pro studium biomolekulárních interakcí.

Koimunoprecipitace (Co-IP) a afinitní koprecipitace (pull-down analýzy)

Koimunoprecipitace a afinitní koprecipitace patří mezi kvalitativní metody pro studium PP interakcí. Principem precipitačních metod je separace specifického proteinu a jeho interakčních partnerů na pevné fázi (nosiči). Vybraný protein je

imobilizován na nosiči prostřednictvím kovalentní vazby, nebo pomocí specifických intermolekulárních interakcí (protein G – protilátka, glutathion – glutathion-S-transferáza, streptavidin – biotin, atd.). Základní podmínkou pro studium protein-proteinových interakcí v komplexních směsích (buněčných lysátech) je zachování nativní konformace a solubility studovaného proteinu. Z tohoto důvodu je u precipitačních metod kladen důraz na správnou volbu lyzačního pufru, jehož složení musí splňovat požadavky na zachování specifických interakcí a eliminaci nespecificky interagujících molekul. Pro správný výběr iontů je možné použít tzv. Hofmeisterovu řadu, ze které je možné vyčíst efekt různých iontů na stabilitu, agregaci a denaturaci proteinů [4].

K imunoprecipitaci studovaného proteinu a jeho interakčních partnerů jsou využívány protilátky imobilizované na pevný nosič (např. agarózovou maticí) prostřednictvím proteinů A nebo G, které váží Fc fragment protilátky (obr. 1A). K odstranění nespecificky vázaných a nenavázaných proteinů je provedeno několik promývacích kroků. Separované imunokomplexy jsou z nosiče následně uvolněny specifickou elucí, snížením pH nebo denaturačním činidlem (chaotropní látky), aby mohly být následně analyzovány. Elektroforéza a westernový přenos spojený s imunodetekcí je nejčastěji používanou metodou k detekci a kvantifikaci známých in-



Obr. 1. Princip koimunoprecipitace (A) a afinitní koprecipitace (B).

A. Protein X spolu s jeho interakčními partnery (proteiny Ya a Yb) je navázán na specifickou protilátku (Ab). Vzniklý imunokomplex je ze směsi vycytán pomocí agarózových kuliček s imobilizovaným proteinem A, který rozeznává Fc fragment protilátek. B. Komplex tří proteinů (X, Ya, Yb) je vycytán ze směsi pomocí silné interakce proteinu GST (fúzaného s proteinem X) a glutationu (GSH) imobilizovaného na agarózových kuličkách.

Tab. 1. Různé systémy afinitních značek a jejich interakčních partnerů využívané pro purifikaci proteinů nebo studium protein-proteinových interakcí (afinitní koprecipitaci).

	afinitní značka	sekvence afinitní značky	imobilizovaný interakční partner
Peptidové značky	FLAG	DYKDDDDK	protilátka anti-FLAG
	HA	YPYDVPDYA	protilátka anti-HA
	oligoHis (6-10mer)	HHHHHH(HHHH)	chelát niklu nebo kobaltu
	Myc	EQKLISEEDL	protilátka anti-Myc
	SBP	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLR ARLEHHPQGQREP	streptavidin
	Avi	GLNDIFEAQKIEWHE	streptavidin
	Strep	WSHPQFEK	streptavidin
	V5	GKPIPPLLGLDST	protilátka anti-V5
Proteinové značky	GST (glutathione S-transferase)		glutathion
	MBP (manose-binding protein)		amylóza

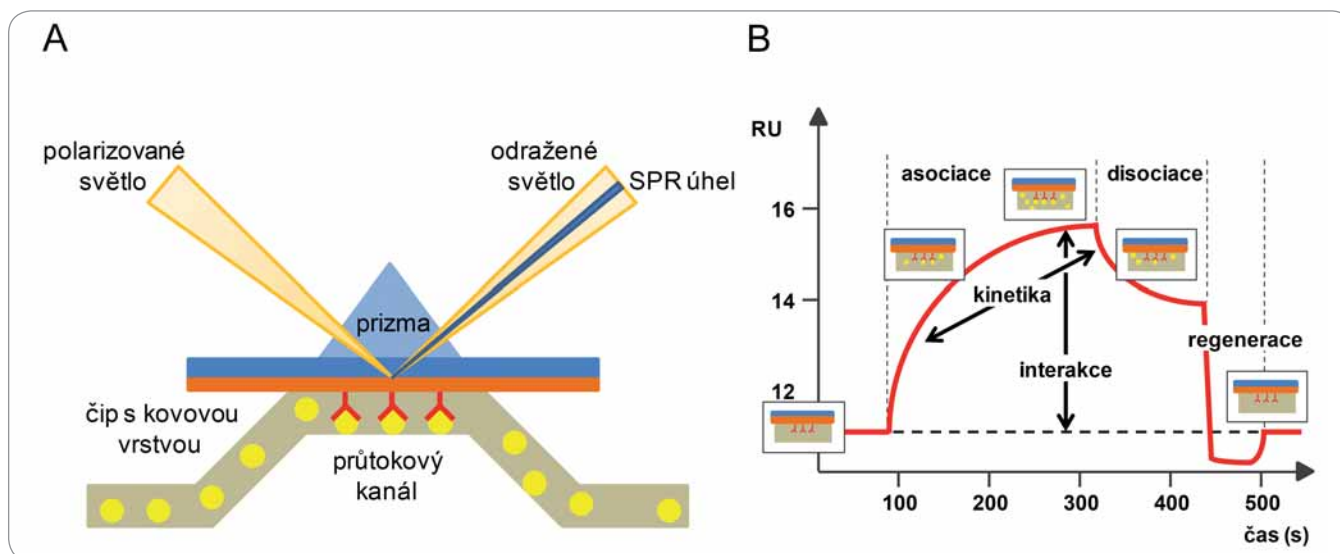
teragujících proteinů. Pro hledání dosud neznámých interakčních partnerů lze využít metody hmotnostní spektrometrie.

Afinitní koprecipitace se od koimunoprecipitace liší pouze ve způsobu zachytu proteinových komplexů na pevném povrchu (např. agarózové matrici). Namísto systému protein A/G – protilátka je analyzovaný protein vázán na povrch matrice prostřednictvím interakce krátké fúzané sekvence, tzv. afinitní značky, se specifickým ligandem imobilizovaným na povrchu matrice

(obr. 1B). Různé typy afinitních značek a jejich interakčních partnerů jsou shrnuty v tab. 1. Na rozdíl od koimunoprecipitace, kde jsme schopni analyzovat studovaný protein *in vivo* v jeho přirozené endogenní koncentraci a stavu, metoda afinitní koprecipitace vyžaduje pro studium PP interakcí klonování a přenos cizorodé rekombinantní molekuly DNA do buněk za účelem exprese proteinu fúzaného s afinitní značkou. Výhodou metody afinitní koprecipitace je ale možnost identifikovat i interakční partnery

různých nízkomolekulárních ligandů (např. kofaktorů) po jejich kovalentní modifikaci afinitní značkou.

Cílem při charakterizaci PP a PL interakcí je nejenom kvalitativní hledání interakčních partnerů, ale i porozumění strukturální podstatě interakce a kvantitativní definování jejich kinetických a termodynamických parametrů. Pro studium afinity dvou interakčních partnerů a kinetiky reakce je možné použít metodu rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance – SPR), pro



Obr. 2. Princip metody rezonance povrchového plazmonu (A) a grafický výstup SPR experimentu, sensorgram (B).

A. Jeden z interakčních partnerů je imobilizován na povrchu čipu a v roztoku proudícím kolem imobilizované molekuly je přítomen druhý interakční partner. Změna indexu lomu na povrchu čipu způsobená jejich vzájemnou interakcí je zaznamenána jako posun SPR úhlu. B. Výstup SPR experimentu zobrazuje vazbu interakčních partnerů na povrchu čipu. V prvním kroku (asociace) dochází k vazbě interakčního partnera přítomného v roztoku na partnera imobilizovaného na povrchu čipu až do stavu saturace. Následná disociace je způsobena použitím reakčního pufru. Dochází k ustálení dynamické rovnováhy interakce závislé na afinitě interakčních partnerů. Užitím regeneračního pufru ve třetím kroku je čip regenerován a připraven k dalšímu použití. Převzato ze semináře BIAcore® [10].

studium afinity a inhibičního potenciálu inhibitorů metodu fluorescenční polarizace (FP) a pro detailní popis afinity a termodynamických parametrů interakce (ΔG , ΔH a ΔS) metodu izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry – ITC).

Rezonance povrchového plazmonu (SPR)

Metoda rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance – SPR) je založena na optickém jevu rezonance povrchového plazmonu (obr. 2A), což je oscilace hustoty náboje na rozhraní kovu a dielektrika [5]. Fotony polarizovaného světla mohou interagovat s volnými elektrony kovové vrstvy, které se následně mění na vlny povrchového plazmonu. Toto pohlcení záření vede k redukci intenzity odraženého světla. Úhel, při kterém dochází k maximální redukci intenzity odraženého světla, se označuje jako rezonanční nebo SPR úhel. Rezonanční úhel závisí na indexu lomu prostředí na povrchu čipu.

Při vlastním experimentu je jeden z interakčních partnerů imobilizován na povrchu čipu [6]. V roztoku proudícím konstantní rychlostí kolem imobilizované

molekuly je přítomen druhý interakční partner. Změna indexu lomu na povrchu čipu způsobená interakcí těchto dvou interakčních partnerů je zaznamenána jako posun rezonančního úhlu vyjádřený v tzv. rezonančních jednotkách (resonance units – RU). Kontinuální záznam změny RU jako funkce času se nazývá sensorgram a na jeho průběhu lze sledovat asociační a disociační fázi interakce (obr. 2B). Z průběhu asociační fáze lze vypočítat rychlostní konstantu asociace k_a , naopak z průběhu fáze disociační rychlostní konstantu disociace k_d . Poměr k_a/k_d pak definuje rovnovážnou disociační konstantu K_D . Metodou SPR je proto možné měřit afinitu [7] i kinetiku interakce [8] v reálném čase. Ve speciálních případech byla tato metoda dokonce využita i pro měření termodynamických parametrů interakce [9].

Fluorescenční polarizace (FP)

Předpokladem pro měření parametrů interakce pomocí FP je označení jednoho z interakčních partnerů fluorescenční značkou (fluoroforem). Molekula fluoroforu je ozářena lineárně polarizovaným světlem (obr. 3A), čímž dojde k její exci-

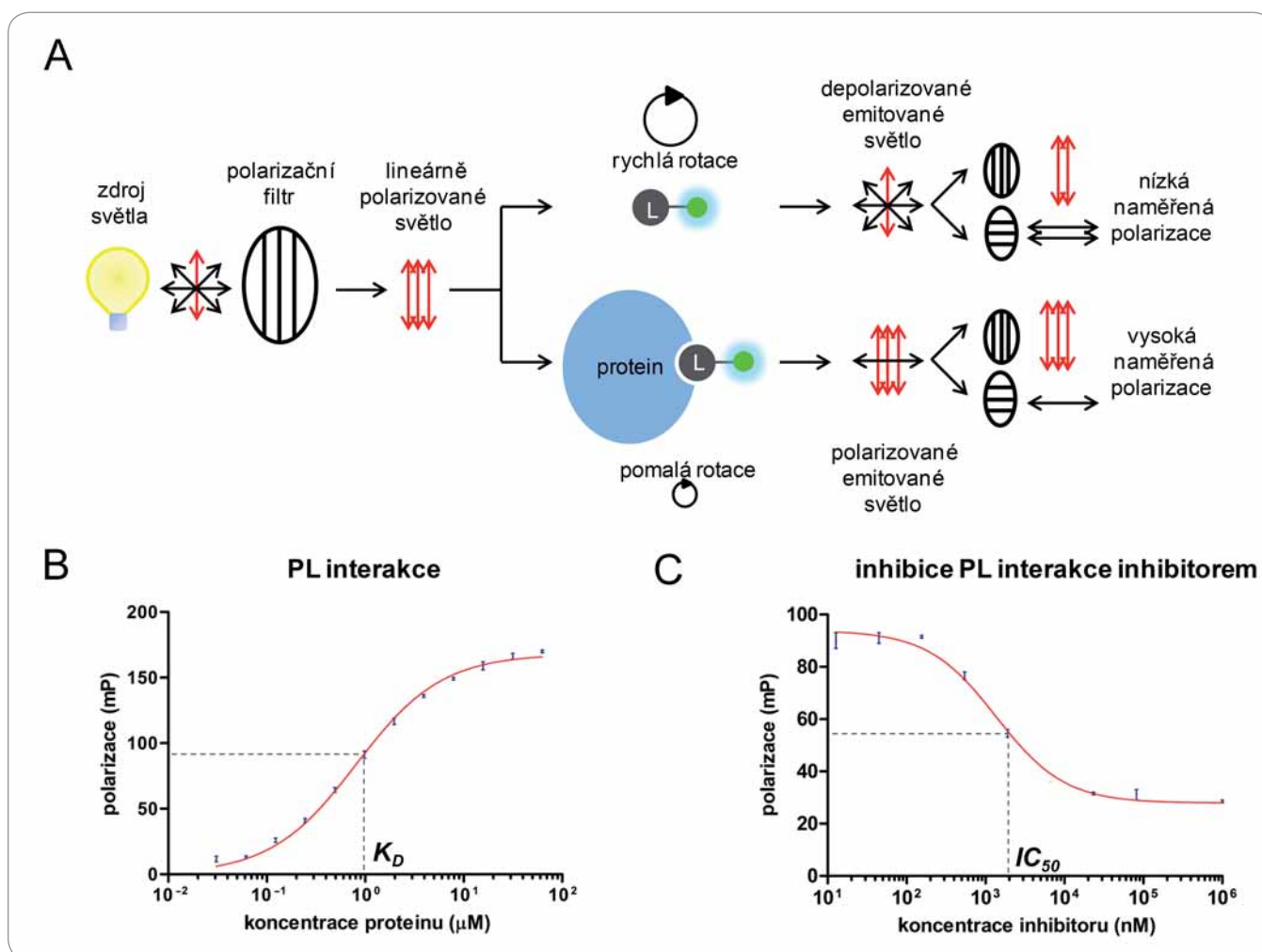
taci a následné emisi zčásti depolarizovaného světla [11]. Depolarizace světla je způsobena enormní rotací fluoroforu v čase mezi excitací a emisí. Obecně platí, že stupeň polarizace fluorescence je nepřímo úměrný rotaci fluoroforu v roztoku [12]. Při interakci dvou interakčních partnerů, ze kterých je jeden označen fluoroforem, dochází v důsledku větší velikosti komplexu (V) ke zpomalení rotace fluoroforu a následně ke zvýšení hodnoty polarizace emitovaného světla podle vztahu:

$$\text{hodnota polarizace} \propto \frac{\eta V}{RT},$$

kde η je viskozita, V je velikost komplexu s navázaným fluoroforem, R je univerzální plynová konstanta a T je absolutní teplota. Kvantitativně je hodnota polarizace emitovaného světla získána měřením intenzity emitovaného světla ve dvou na sebe kolmých rovinách a vypočítána podle následující rovnice:

$$\text{hodnota polarizace (P)} = \frac{I - I_{\perp}}{I + I_{\perp}},$$

kde I je intenzita emitovaného světla v rovině rovnoběžné s rovinou excitačního světla a I_{\perp} je intenzita emitovaného



Obr. 3. Princip metody fluorescenční polarizace (A), měření interakce proteinu s ligandem (B) a inhibice interakce proteinu s ligandem (C) metodou FP.

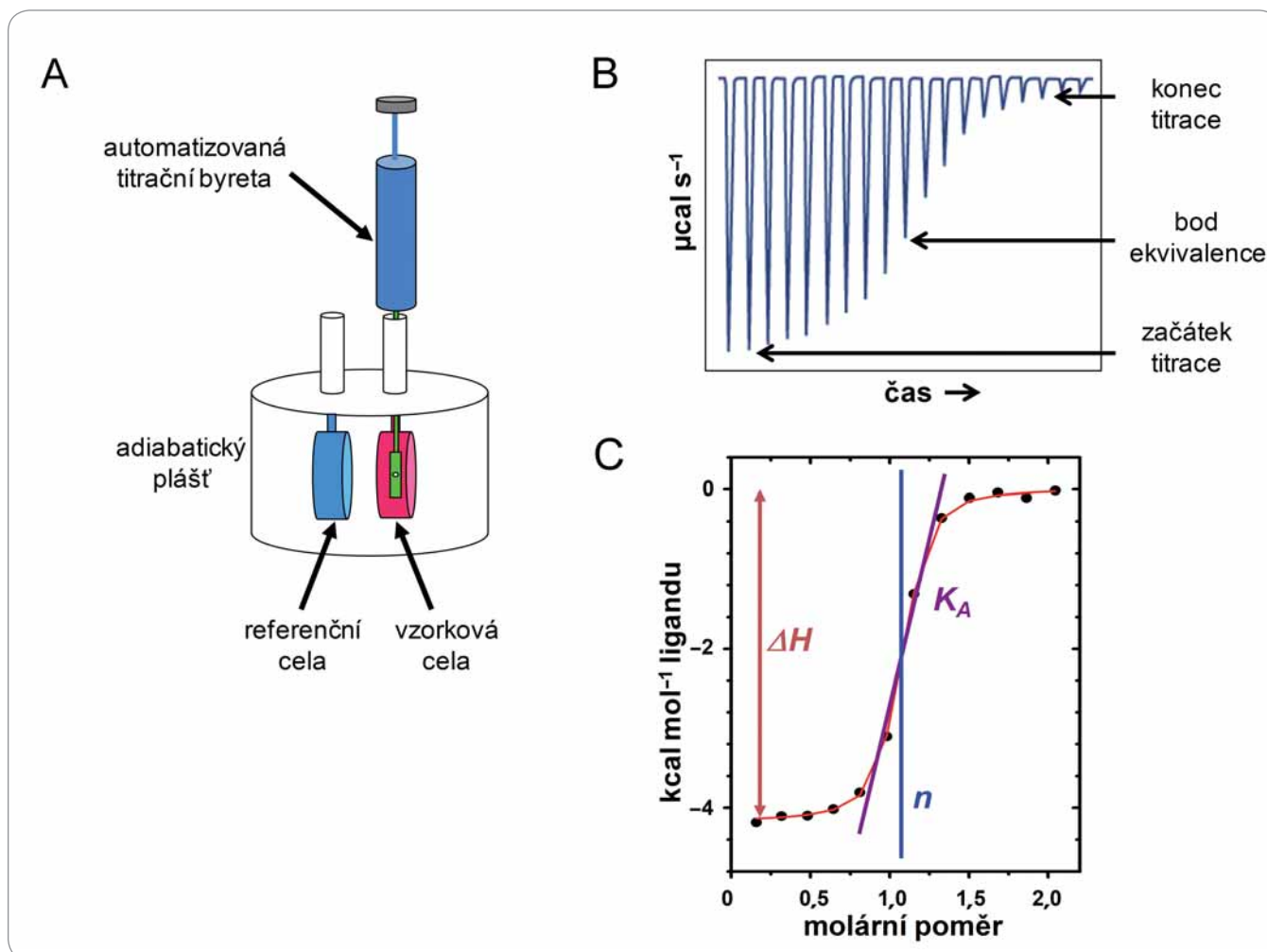
A. Fluoroforem značený ligand (L) je ozářen lineárně polarizovaným světlem. V důsledku jeho vysoké rotace dochází k emisi depolarizovaného světla a k naměření nízké hodnoty fluorescenční polarizace. Interakce ligandu s větší molekulou (proteinem) způsobí zpomalení jeho rotace a emisi polarizovaného světla. Převzato z [13]. B. Titrace fluoroforem značeného ligandu o konstantní koncentraci vzrůstající koncentrací proteinu. C. Měření IC_{50} inhibitoru protein-ligandové interakce. Směs proteinu a fluoroforem značeného ligandu byla titrována vzrůstající koncentrací inhibitoru.

světla v rovině kolmé na rovinu excitačního světla.

V praxi je možné metodu FP využít pro měření afinity dvou interakčních partnerů [14], nebo také inhibičního potenciálu různých inhibitorů [15,16]. Na rozdíl od metody SPR umožňuje FP měřit interakci bez nutnosti imobilizace, proto získaná hodnota K_D je vypočítaná ze skutečných koncentrací interakčních partnerů v roztoku. Na druhé straně měření FP vyžaduje značení interakčního partnera molekulou fluoroforu, která může ovlivnit hodnotu K_D interakce. Měření FP většinou probíhá na 96- nebo 384-jamkových deskách. Při měření disociační konstanty

K_D je interakční partner značený fluoroforem titrován vzrůstající koncentrací druhého interakčního partnera. Z výsledné křivky se odečítá hodnota K_D , která odpovídá hodnotě koncentrace neznámého interakčního partnera v inflexním bodu titrační křivky (obr. 3B). Po definování disociační konstanty interakce dvou interakčních partnerů je možné studovat také zapojení třetího interakčního partnera (např. inhibitoru), který kompetuje (soupeří) o vazbu a vytěsňuje jednoho z interakčních partnerů. V praxi se pak fluoroforem značený ligand smíchá s proteinem o konstantní koncentraci a titruje se vzrůstající koncentrací

inhibitoru. Z hodnoty koncentrace inhibitoru v inflexním bodu titrační křivky lze odečíst hodnotu IC_{50} , která odpovídá koncentraci inhibitoru schopné inhibovat 50 % vazby daného ligandu na protein (obr. 3C). Hodnota IC_{50} závisí na koncentraci proteinu a fluoroforem značeného ligandu použitého pro měření FP a taky na K_D jejich interakce [17]. Proto není možné porovnat hodnoty IC_{50} pro stejný inhibitor získané při jiných experimentálních podmínkách. Hodnota IC_{50} se tedy převádí na hodnotu inhibiční konstanty K_i , kterou lze jednoznačně definovat inhibiční potenciál inhibitoru nezávisle na podmínkách měření FP.



Obr. 4. Schematické znázornění přístroje MicroCal® (A).

Teplo uvolněné při interakci dvou interakčních partnerů je zaznamenáno jako funkce času (B) a po integraci jako závislost entalpie na molárním poměru interakčních partnerů (C). Z výsledního grafu je možné přímo definovat hodnoty změny entalpie, asociační konstantu i stechiometrii interakce. Převzato z manuálu GE Healthcare [23].

Propočet IC_{50} na K_i řeší různé formy Cheng-Prusoffovy rovnice [18,19]. V současné době je možné pro propočet použít některou z aplikací volně dostupných na internetu [20].

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC)

Izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry – ITC) patří mezi metody pro měření termodynamických parametrů interakce dvou interakčních partnerů. Tato metoda vychází z pozorování, že při interakci dvou látek dochází k absorpci nebo k uvolnění tepla [21]. Měřením tohoto tepla je pak možné přesně určit vazebnou konstantu (K_D), stechiometrii interakce (n), entalpii (ΔH) a entropický příspěvek ($-T\Delta S$) a de-

finovat tak kompletní termodynamický profil interakce bez nutnosti značení.

Kalorimetry používané pro analýzu biomolekul obsahují dvě identické cely, v jedné probíhá interakce (vzorková cela) a druhá slouží jako referenční cela [22]. Obě cely jsou umístěny v adiabatickém plášti a temperovány na stejnou teplotu (obr. 4A). Zkoumaná molekula je pomocí injektoru postupně dávkována do cely se vzorkem za současného měření tepelného rozdílu oproti referenční cele.

V případě, že pozorovaná reakce je exotermická (teplo se uvolňuje), bude potřebné dodat vzorkové cele méně tepla k udržení tepelné rovnováhy s referenční celou. Tato změna tepla je měřena a zaznamenána v grafu jako funkce času (obr. 4B) a po integraci jako závis-

lost entalpie na molárním poměru mezi interakčními partnery (obr. 4C). Z grafu na obr. 4C je možné přímo určit hodnotu asociační konstanty (K_A), entalpie (ΔH) a stechiometrii interakce (n). Pokud během interakce nedochází k jiným entalpickým změnám, lze celkovou změnu volné energie interakce (ΔG) a entropický příspěvek interakce ($-T\Delta S$) vyjádřit pomocí následujícího vztahu:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_A,$$

kde T je absolutní teplota a R je univerzální plynová konstanta.

Závěr

Problematika protein-proteinových a protein-ligandových interakcí se v po-

slední době těší stále většímu zájmu vědeckých skupin z nejrůznějších vědeckých oborů od informatiky až po farmakologii. K důkladnému porozumění fungování organismu jako celku i buněk samotných je totiž popis mezimolekulárních interakcí naprosto klíčový. V současnosti představují nízkomolekulární inhibitory PP a PL interakcí nejčastější strategii v boji proti nejrůznějším chorobám. Tato práce byla proto věnována metodám, kterými je možno problematiku PP a PL interakcí studovat. K hledání interakčních partnerů je možné použít metody koimmunoprecipitace nebo afinitní koprecipitace, ke studiu kinetiky interakce metodu SPR, ke studiu inhibičního potenciálu inhibitorů metodu FP a k popisu termodynamických parametrů metodu ITC. Dalším krokem studia PP a PL interakcí je přímý náhled do atomární struktury (např. metodami rentgenové difrakce nebo NMR spektroskopie). Poznání atomární podstaty interakce nám dává možnost porozumět této interakci na úrovni fyzikálních sil, které jsou za interakci odpovědné a přenést tak studium interakcí z úrovně experimentální do úrovně teoretické. Toho se pak využívá při sestavování algoritmů pro simulační programy v oboru počítačového modelování, které začíná v posledních letech nevídaný rozvoj. Virtuální screening knihovny několika milionů nízkomolekulárních látek je

často prvním krokem při hledání možných inhibitorů potenciálního terapeutického cíle (často proteinu). Experimentální a teoretické přístupy ke studiu mezimolekulárních interakcí jdou v současnosti ruku v ruce a společně napomáhají k porozumění fungování organismu i buňky jako takové.

Literatura

1. Auer M, Scarborough GA, Kuhlbrandt W. Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature* 1998; 392(6678): 840–843.
2. Radzicka A, Wolfenden R. A proficient enzyme. *Science* 1995; 267(5194): 90–93.
3. Rudiger H, Siebert HC, Solis D et al. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Curr Med Chem* 2000; 7(4): 389–416.
4. Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr Opin Chem Biol* 2006; 10(6): 658–663.
5. Buijs J, Franklin GC. SPR-MS in functional proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005; 4(1): 39–47.
6. Torreri P, Ceccarini M, Macioce P et al. Biomolecular interactions by surface plasmon resonance technology. *Ann Ist Super Sanita* 2005; 41(4): 437–441.
7. Myszka DG, Jonsen MD, Graves BJ. Equilibrium analysis of high affinity interactions using BIACORE. *Anal Biochem* 1998; 265(2): 326–330.
8. Morton TA, Myszka DG. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Enzymol* 1998; 295: 268–294.
9. Roos H, Karlsson R, Nilshans H et al. Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology. *J Mol Recognit* 1998; 11(1–6): 204–210.
10. Protein.iastate.edu [homepage on the Internet]. The Protein Facility of the Iowa State University Office of Biotechnology. BIACore seminar. Available from: <http://www.proteomics.iastate.edu/seminars/BIACore/index.html>.
11. Jameson DM, Crony JC. Fluorescence polarization: past, present and future. *Comb Chem High Throughput Screen* 2003; 6(3): 167–173.
12. Perrin F. Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J Phys* 1926; 7(12): 390–401.
13. Hi-techsci.com [homepage on the Internet]. Homepage of TgK Scientific Ltd. Available from: <http://www.hi-techsci.com/techniques/anisotropy/>.
14. Williamson DS, Borgognoni J, Clay A et al. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *J Med Chem* 2009; 52(6): 1510–1513. doi: 10.1021/jm801627a.
15. Bolger R, Wiese TE, Ervin K et al. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 1998; 106(9): 551–557.
16. Kim J, Felts S, Llauger L et al. Development of a fluorescence polarization assay for the molecular chaperone Hsp90. *J Biomol Screen* 2004; 9(5): 375–381.
17. Cer RZ, Mudunuri U, Stephens R et al. IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(web server issue): W441–W445. doi: 10.1093/nar/gkp253.
18. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22(23): 3099–3108.
19. Munson PJ, Rodbard D. An exact correction to the „cheng-prusoff” correction. *J Recept Res* 1988; 8(1–4): 533–546.
20. Sw16.im.med.umich.edu [homepage on the Internet]. Homepage of professor Shaomeng Wang. University of Michigan. Available from: http://sw16.im.med.umich.edu/software/calc_ki/.
21. Wiseman T, Williston S, Brandts JF et al. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 1989; 179(1): 131–137.
22. Freyer MW, Lewis EA. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol* 2008; 84: 79–113.
23. Milev S. Isothermal titration calorimetry: Principles and experimental design. GE Healthcare manual. Available from: http://bcmp.med.harvard.edu/sites/bcmp.med.harvard.edu/files/facilities/ITC200%20training_.pdf.pdf.