

# Proteinen desnaturalizazio termalaren bidezko analisia konposatu bioeraginkor berriak aurkitzeko

(Protein analysis through thermal denaturation for the discovery of new bioactive compounds)

Yuri Rueda<sup>1</sup>, Hiart Navarro-Imaz<sup>1</sup>, Irati Rekondo<sup>1</sup>, Susana Cristobal<sup>1,2</sup>,  
Olatz Fresnedo\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fisiologia Saila, UPV/EHU, Leioa, Espainia

<sup>2</sup> Medikuntza Klinikoa eta Esperimentala Saila, Linköping Unibertsitatea,  
Linköping, Suedia

**LABURPENA:** Konposatu bioeraginkorrak bizidunetan jarduera zelularren edota fisiologikoen gain eragin dezaketen substantzia kimiko naturalak zein sintetikoak dira. Horien artean daude, adibidez, farmakoak, prozesu biologikoen modulazioaren bitartez osasunaren gain efektu onuragarriak bideratu ditzaketenak. Konposatu bioeraginkor berrien eta horien itu biologikoak bilatzeko estrategia berrien garapena inpaktu handiko erronka da. Itu proteinak edota ekintza mekanismoak aurkitzeko metodologia ezberdinak garatu dira. Itu proteinak aurkitzeko metodoen artean, lan honetan jorratzen dena daukagu: konposatu bioeraginkorrek proteinen desnaturalizazio termalean eragindako aldaketen azterketan oinarritutako metodoa. Lan honetan, konposatu bioeraginkorrak bilatzeko metodologia horren oinarriak eta haren inplementaziorako irizpideak azaltzen dira.

**HITZ GAKOAK:** konposatu bioeraginkorra, itu farmakologikoa, desnaturalizazio termala, proteomaaren profiltze termala.

**ABSTRACT:** Bioactive compounds are either natural or synthetic chemicals that can affect both the cellular and/or physiological activity in living organisms. Included among these are, for example, drugs that can have beneficial effects on health, through the modulation of biological processes. The development of new strategies to search new bioactive compounds and their new biological targets is a high impact challenge. In order to find target proteins and mechanisms of action, several different methodologies have been developed, including the method discussed in this paper. It is based on the analysis of the modifications caused by bioactive compounds on the protein thermal denaturation process. This work describes the basics of this methodology suitable in the search of bioactive compounds as well as the criteria for its implementation.

**KEYWORDS:** bioactive compound, pharmacological target, thermal denaturation, thermal proteome profiling.

\* **Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Olatz Fresnedo. Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, UPV/EHU, Sarriena auzoa (48940 Leioa). – [olatz.fresnedo@ehu.eus](mailto:olatz.fresnedo@ehu.eus) – <https://orcid.org/0000-0002-1172-1423>.

**Nola aipatu / How to cite:** Rueda, Yuri; Navarro-Imaz, Hiart; Rekondo, Irati; Cristobal, Susana; Fresnedo, Olatz (2020). «Proteinen desnaturalizazio termalaren bidezko analisia konposatu bioeraginkor berriak aurkitzeko»; *Ekaia*, 38, 2020, 231-240. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.21405>).

Jasoa: 23 urtarrila, 2020; Onartua: 02 maiatza, 2020.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2020 UPV/EHU



Obra hau Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

## 1. SARRERA

Sistema biologikoetan eraginkorrak izan daitezkeen konposatu (konposatu bioeraginkor, KBE) berriak bilatzeko ekimenean, KBE horien itu biologikoen identifikazioa da gaur egungo erronka handienetako bat. Farmakoak bezalako KBEen eragin biologikoak itu proteinek in lotzearen ondorio dira maiz. Lotura hori proteinen eremu funtzional batean gertatzen da, eta eragina aktibatzailea edo inhibitzailea izan daiteke. Ondorioz gertatzen den proteinen jardueraren modulazioak, zelulen eta ehunen testuinguruan, desiragarriak diren erantzun molekularrak eta ondorio fisiologikoak eragingo ditu. KBE berriek zein proteina edo bidezidor metabolikoetan duten eragina eta hori aktibatzailea edo inhibitzailea den ezagututa, bizidunetan izan ditzaketen eragin desiragarriak edo kaltegarriak aurreikus daitezke.

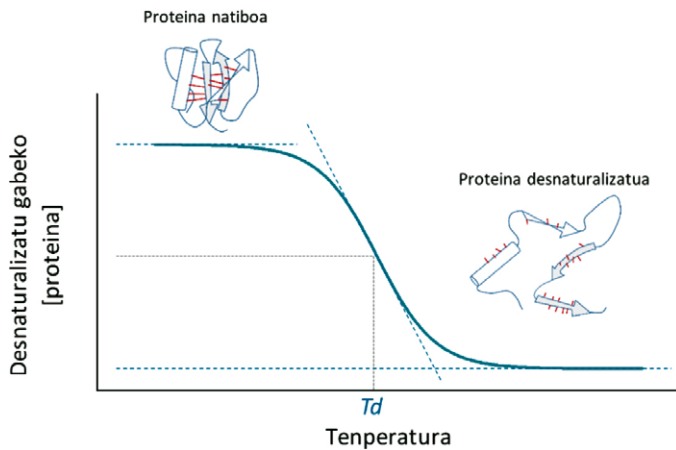
KBEen itu proteinak aurkitzeko metodologia ezberdinak erabili izan dira ([1] erreferentzian berrikusia). Ongi finkatutako metodoak euskarri solido batean immobilizatutako KBEak eragindako proteinen aberastearen analisisan oinarritzen dira. Itu proteinen identifikaziorako beste aukera bat KBEa eratorpen kimikoaren bidez detektagarri bilakatzea da. Prozedura horietan guztietan KBEaren aldaketa kimikoak egin behar dira, bere jarduera biologikoaren gain eragina izan dezakeena, eta hori aurreikustea ezinezkoa da konposatuaren itua(k) ezezaguna(k) d(ir)enean. Lan honetan azalduko dugun metodoak KBE berrien itua(k) aurkitzea ahalbidetzen du, konposatuaren aurretiko eraldaketarik gabe, proteomikako eta bioinformatikako tresnek eskaintzen dituzten *screening* zabalak egiteko aukerak baliatuz.

## 2. PROTEINEN DESNATURALIZAZIO TERMALA

Proteina baten jatorrizko egitura (edo egitura natiboa) bi elkarrekintza motaren arteko oreka baten ondorioa da: batetik, proteinen barruan agertzen diren hainbat elkarrekintza intramolekular ahul (hidrofobikoak, elektrostatikoak eta Van der Waals elkarrekintzak), eta, bestetik, proteinen eta haren ingurunearen arteko elkarrekintzak. Indar horien guztien ondorioz, primarioki aminoazido kate bat den proteina hiru dimentsioko egitura hartzen du; proteina hidrodisolbagarrietan, urarekin kontaktuan dagoen proteinen azalean albo-kate polarrak dituzten aminoazidoak kokatzen dira, eta uretatik babestuta dagoen gunean talde apolarrak edo hidrofoboak dituzten aminoazidoak. Proteinen funtzioa jatorrizko egitura horren menpekoa da, eta egitura ingurune baldintza kimikoen eta fisikoen aldaketek oso sentikorra da, besteak beste indar ionikoaren, polaritatearen eta tenperaturaren aldaketekiko.

Beroak eragindako molekulen mugikortasunaren handitzeak proteinen hiru dimentsioko egitura desegonkortzen du. Egitura galera hori desnatu-

ralizazio termala (DT) da. Desnaturalizazioarekin batera, proteinen zenbait propietate aldatzen dira. Proteina hidrodisolbagarrien kasuan, uretako disolbagarritasuna galdu egiten da. Desnaturalizazioaren ondorioz, gune hidrofobikoko atal apolarrak azaleratu (**1. irudiko** proteinen eskemetan marra gorriaz adierazitakoak) eta urarekin kontaktuan jartzean, elkarren artean nolana elkatzen dira elkarrekintza hidrofobikoen bidez, uretatik aldenitzeko. Ondorioa proteinen agregazioa eta hauspeatzea da. Desnaturalizazio eta, ondorioz, hauspeatze hori mailakatuak dira tenperatura igotzen den neurrian; uretan disolbatuta gelditzen den proteinaren zatikia gero eta txikiagoa da.

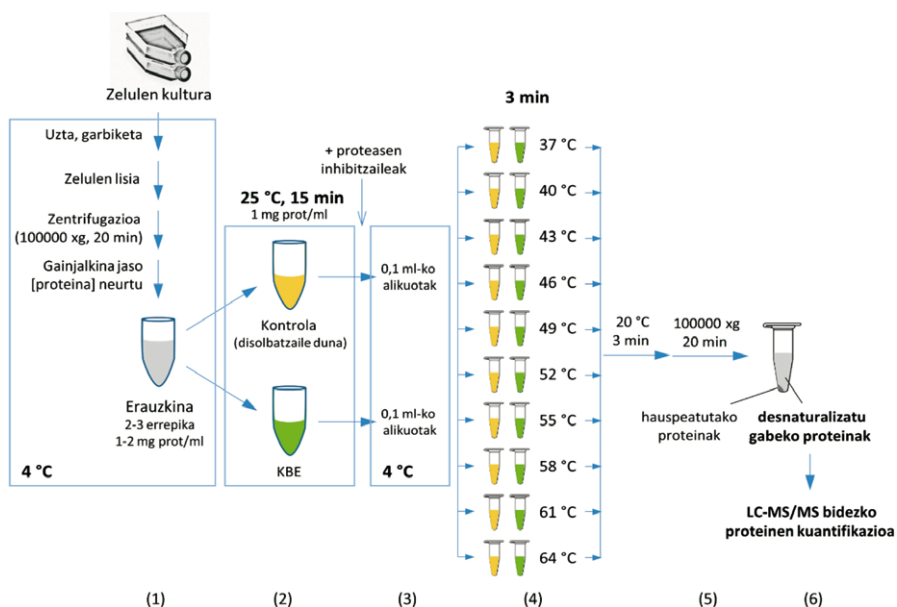


**1. irudia.** Proteina baten desnaturalizazio termalaren kurba, bero bidezko desnaturalizazioaren ondoren desnaturalizatu gabe gelditu den proteina kantitatea tenperaturaren aurrean adierazten duena. Beheranzko sigmoide horren goiko lautadak (asintotari dagokion baloreak) oinarritzko egoera adierazten du; kurbaren beheko asintotak desnaturalizazio maximoa gertatu ondoren detektatutako proteina disolbagarriaren kantitatearen arabera da. Bi asintota horizontale horien arteko batezbestekora iristeko behar den tenperatura erdi-desnaturalizazio tenperatura ( $T_d$ ) da, eta kurbaren inflexio puntuari dagokio. Kurbaren azken aldagaia inflexio-puntuko tangentearen malda da, batez ere proteina egonkortzen duten elkarrekintzen izaeraren eta kopuruaren arabera da.

Temperaturaren eta desnaturalizatu gabeko proteina kantitatearen arteko erlazioa **1. irudian** erakusten den kurbaren arabera da, funtzio sigmoide bati dagokiona (ikus aurrerago **1. ekuazioa**).

### 3. KONPOSATU BIOERAGINKORREN ELKARKETAK ERAGINDAKO PROTEINEN DESNATURALIZAZIO TERMALAREN ALDAKETA

Konposatu bat proteina batekin elkartzan denean, proteinaren egonkortasun termodinamikoa aldatu egiten da; elkarketa proteinaren azalean gertatzen baldin bada, egonkortasuna handitu egingo da [2, 3]. DTaren analisiaren bidez, KBEaren eta proteinaren artean loturarik dagoen ala ez ikus daiteke. Izan ere, proteina askearen eta KBE lotua duen proteinaren arteko egonkortasunaren ezberdintasuna  $T_d$ -aren (ikus **1. irudia**) aldaketa batean islatzen da. Hori aztertzeko, saio mota ezberdinak egin daitezke, proteinen prestakin mota ezberdinekin.



**2. irudia.** Frankenek eta haren kideek [6] deskribatutako proteomaren profiltze termalaren diseinu esperimentalak zelulen erauzkinak (*in vitro*) erabiliz. (1) Zelulen kulturetatik erauzkinak lortzea; (2) erauzkina konposatu bioeraginkorarekin edo disolbatzailearekin inkubatzea; (3) proteasen inhibitzaileak gehitu ondoren, lagin bakoitza 10 zatitan banatzea; (4) 3 minutuz tenperatura ezberdinetan inkubatzea; (5) desnaturalizazioaren ondorioz hauspeatutako proteinak zentrifugazio bidez jalkitea; (6) zentrifugazioz lortutako gain-jalkineko proteinak (jatorrizko egituradunak) masa espektrometriaren bidez kuantifikatzea. Prot: proteina; KBE: konposatu bioeraginkorra; LC-MS: *liquid chromatography-mass spectrometry*.

Martinez-Molinak eta haren kideek [4] deskribatu zuten lehen aldiz DTaren bidezko farmako-proteina elkarrekintzen analisia zelula erauzki-

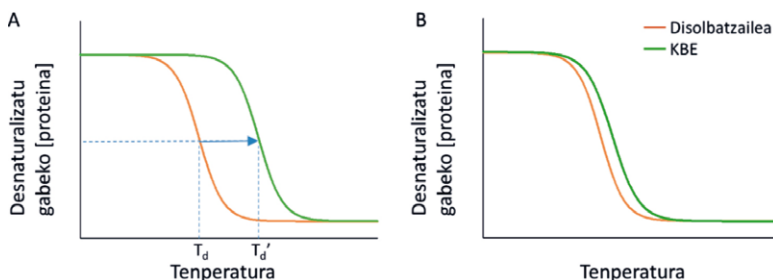
nak erabiliz. Ikerketa horretan, lisatutako zeluletan proteina ezagunen desnaturalizazioa aztertu zuten KBERik gabeko eta KBE-dun prestakinetan; proteina kuantifikatzeko *western blotting* teknika erabili zuten. *Western blotting* teknikan prestakin biologiko bateko proteinak propietate fisiko-kimikoen arabera banatzen dira (tamainaren arabera, maiz), eta, ondoren, interesezko proteina baten antigorputzen bidezko detekzioa egiten da; KBE berrien detekzioaren testuinguruan oso mugatzailea da hori, aurretik ezarritako proteina(k) bakarrik azter daite(z)keelako.

Metodoaren hurrengo garapen batean, masen espektrometria bidezko proteinen analisia aplikatu zen [5, 6] itu proteina ezezagunak identifikatzeko. Horrelako saioak proteomaren profiltze termal (PPT; ingelesez TPP, *thermal proteome profiling*) izenez ezagutzen dira, eta bi modutan aplikatu daitezke: KBEaren eragina zeluletan (*in vivo*) edo erazutitako lagin biologikoetan (*in vitro*) aztertuz. Bigarren mota horretako azterketaren diseinu esperimentala **2. irudian** erakusten da.

*In vitro* PPT saioen lehenengo urratsa erazutitako zelular baten prestakuntza da. Erazutitako hori proteina-kontzentrazio eta bolumen egokiko bi laginetan banatu, eta bati KBE kontzentrazio eraginkor batean gehitzen zaio; besteari, berriz, KBEaren disolbatzailearen bolumen bera. Nahasteak 25 °C-tan 15 minutuz mantenduta KBE eta ituen arteko elkarrekintzak sortzea ahalbidetzen da. Ondoren, Franken eta haren kideen protokoloak [6] lagin bakoitza 10 bat alikuotatan banatzea proposatzen du, bakoitza 0,1 ml-koa. Laginen bi sortak mailakatutako tenperatura tarte batean 3 minutuz mantentzen dira desnaturalizazioa eragiteko. Desnaturaizatu gabeko proteinak aztertu ahal izateko, hauspeatutakoak zentrifugazioz jalkiarazten dira. Tenperatura eta kondizio bakoitzean disolbatuta mantentzen diren proteina natiboak, tripsina bezalako proteasa batekin tratatu ondoren, kromatografia likidoari (LC, *liquid chromatography*) lotutako masen espektrometria (MS, *mass spectrometry*) bidez aztertzen dira, proteomaren analisi zabal bat egiteko, KBEaren itu ezezagunak aurkitzea ahalbidetzen duena. Azterketa hori *western blotting* prozeduren bidez ere egin daiteke, proteina jakin baten eta konposatuaren arteko elkarrekintzarik dagoen aztertzeko.

Saio estandar batean, azterketa gutxienez bi erazutitako zelular independentekin (2 errepika biologiko) egin behar da. Desnaturaizazioa eragiteko tarteak 35 eta 70 °C tenperaturen artean egotea gomendatzen da, proteina gehien  $T_d$  tarte horretan baitago, baina lagin motaren edo proteinen arabera doikuntzak egitea beharrezkoa izan daiteke [6].

Tenperatura ezberdinetan proteina jakin bakoitzaren jatorrizko aldaeraren (desnaturaizatu gabearen) kontzentrazioa zehaztu ondoren, bi desnaturaizazio-kurba eraikitzen dira: bat disolbatzailearekin tratatutako erazutitako laginaren, eta bestea KBEarekin tratatutakoarentzat (**3. irudia**).



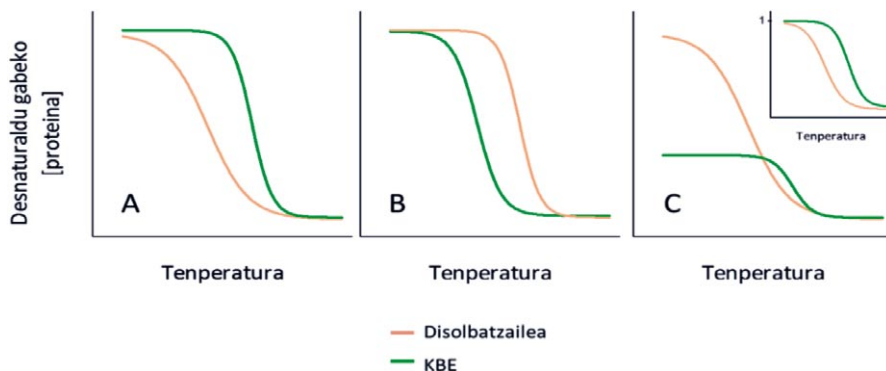
**3. irudia.** Proteomaren profiltze termalaren saioetako proteinen desnaturalizazio kurbak. Proteina bakoitzeko 2 kurba lortzen dira: bat disolbatzailearekin tratatutako laginari dagokiona eta bestea konposatu bioeraginkorarekin (KBEarekin) tratatutakoarena. A ataleko grafikoaren kasuan, desnaturalizazio-temperaturaren ( $T_d$ ) aldaketa (igoera) gertatu da, KBEak proteinaren egonkortzea eragin duela adierazten duena. B grafikoko kurben arteko ezberdintasunik ez egoteak adierazten du proteina hori KBEaren itua ez dela.

KBEak eragindako proteina baten  $T_d$  balorearen aldaketak egonkortasun termalaren aldaketa adierazten du. Aldaketa hori igoera bat bada, KBEak proteinaren egonkortzea eragin duela adierazten du. Kurben artean ezberdintasunik agertzen ez bada, proteina hori KBEaren itua ez dela ondoztratzen da.

#### 4. DESNATURALIZAZIO-KURBA KONPLEXUAK

DTren bidezko proteinen eta KBEen arteko elkarrekintzen azterketak errepikagarriak eta fidagarriak izaten dira. Baina lagin motaren, proteinaren edota KBEaren arabera,  $T_d$  baloreaz gain kurbaren beste parametro batzuk ere alda daitezke, emaitzen interpretazioa zaildu egiten duena. Are gehiago,  $T_d$  balorearen igoera gertatu ordez, jaitsiera ere gerta daiteke. **4. irudian** era horretako ustekabeko zenbait emaitza posible erakusten dira.

- A) PPT saioan proteinaren  $T_d$  balorearen igoeraz gain, inflexio-puntuko tangentearen malda ere aldatu egin da (**4A irudia**). Aldaketa hori konposatuaren eta proteinaren arteko elkarrekintzen izaerarekin (sendotasunarekin) egon daiteke lotuta. KBEari dagokion kurbaren goiko asintotaren balorea temperatura altuagotan mantentzeak (goiko lautada luzeagoa izateak) konposatuak proteinaren azalean lotura sendoak sortzen dituela esan nahi izan dezake, desnaturalizazio-prozesua hasteko beharrezko energia handiagoa izatea eragingo lukeena.



**4. irudia.** Proteomaren profiltze termalaren saioretan konposatu bioeraginkorrek (KBEek) eragindako desnaturalizazio-kurben aldaketa konplexuak. (A) KBEaren eraginez, proteinaren desnaturalizazio-tenperaturaren igoeraz gain, inflexio-puntu-tuko tangentearen malda ere aldatu egin da. (B) KBEaren eraginez proteina tenperatura baxuagoan hauspeatu da. (C) KBEak, desnaturalizazio tenperatura aldarazteaz gain, goiko lautadako asintotaren balorea ere aldarazi du. Horrelako kurbak lortzen direnean, eta emaitzak argiago ikusteko, kurba bakoitzaren datuak tenperatura baxuenean lortutako proteina-kontzentrazioaren zatikitza aurkez daitezke (azalpen gehiago testuan).

- B) KBEaren polaritatearen ezaugarri jakin batzuek **4. irudiko B** grafikoan erakutsitako desnaturalizazio-kurbaren aldaketa sorraz dezakete. Horrelako emaitzak KBEak proteinaren barruko elkarrekintza egonkortzaileak murrizteagatik ager daitezke. Konposatuaren azaleko eremu polarren eta apolarren banaketak konposatua proteinaren gunean txertatzea eragin dezake, eta molekularren barruko elkarrekintza egonkortzaileak oztopatu. Ondorioz, proteinaren desegonkortze termala gertatuko da, hau da, proteina tenperatura baxuago batean hauspeatuko da.
- C) Azkenik, KBEren eraginez desnaturalizazio-kurbaren goiko asintotaren balorea ere alda daiteke. Inolako tratamendu termal desegonkortzailerik gabe proteina hauspeatu egiten baldin bada, konposatuaren elkarketak proteina horren eta lagineko beste osagaien (proteina bera barne) arteko elkarrekintzak sorrazten dituela ondoriozta daiteke. Konposatuaren polaritatea baxua baldin bada, laginean (erauzkinean) egon daitezkeen besikulekin (lipidoekin) elkartu daiteke; horren ondorioz, KBE elkartzeko gai den itu proteina ere besikulekin batu eta tratamendu termalaren ondorengo zentrifugazioan jalki egingo litzateke. Fenomenologia hori ongi deskribatua izan da aurretik Carrasco Del Amoren eta haren kideen ikerkuntzan [7]. Lan horretan, *in vitro* saioretarako laginen prestakuntza eta analisisian hainbat hobekuntza proposatu ziren saio egokiagoak

burutzeko asmoarekin. **4C irudiko** emaitzak konposatu hidrodisol-bagarriekin ere lor daitezke, baldin eta konposatuaren elkarketak polimerizazio prozesuren bat sorrarazten badu. Horrelako kasuetan, bi kurben arteko konparaketak egiteko, komenigarria da Frankenek eta haren kideek proposatzen duten datuen normalizazioa egitea, datu sorta bakoitza tenperatura baxuenean neurtutako proteinaren kontzentrazioarekiko adieraziz [6].

## 5. DATUEN ANALISIA

D'Tren bidezko analisisetan lortutako emaitzetatik konposatuaren eta proteina baten arteko elkarrekintza dagoela ondorioztatzeko, desnaturalizazio-kurbaren desplazamendua esanguratsua dela frogatu behar da. Horretarako, lehenengo, datu esperimentalak normalizatu eta funtzio sigmoideo bati (**1. ekuazioa**) egokitu behar zaizkio.

$$f(T) = \frac{1 - plateau}{1 + e^{-\left(\frac{a}{T} - b\right)}} + plateau$$

### 1. ekuazioa

non  $T$  baita tenperatura, eta  $a$ ,  $b$  eta  $plateau$ , berriz, konstanteak. Tenperatura baxueneko  $f(T)$  balorea 1en finkatuta, gainerakoen balore erlatiboak kalkulatzeko dira (datuen normalizazioa). Saioa fidagarria dela baieztatzeko, honako parametro hauek hartu behar dira kontuan [6]: i) kurbak sigmoideoaren ekuazioari bi datu sorten egokitzapenaren  $R^2 > 0,8$  izan behar du; ii) kontrol-egoeran egindako saioari dagokion  $plateau$  balorea (beheko asintotarena)  $< 0,3$  izan behar da; iii) saioaren errepikatan lortutako  $T_d$  baloreen aldakortasunak, eta baita  $T_d'$  baloreenak ere, KBEak eragindako  $T_d$  balorearen gehikuntza ( $T_d' - T_d$ ) baino baxuagoak izan behar dute. Análisi guztia egiteko, R eta Python plataformak erabil daitezke.

## 6. ERABILERA

Hemen azaldutako PPT saioa oso baliagarria izan daiteke itxaropagarriak dituzten konposatuaren azterketatan, ez bakarrik KBE berriak aurkitzen laguntzeko, baizik eta ezagunak diren konposatuaren itxaropagarriak zehazteko ere. Teknika honen bitartez, adibidez, itsas zianobakterioetatik erazutitako feofitina baten giza zeluletako itxaropagarriak zehaztu dira [7], arrainetan konposatu honek duen eragin hipolipemiantzarekin [8] zerikusia izan dezaketena. Oso interesgarriak dira, halaber, farmakoen alboko eraginaren azterketatan izan dituen aplikazioak. Adibidez, Becherek eta haren kideek [9] histona



desazetilasaren inhibitzaile den panobinostat farmakoaren itu berri bat (fenilalanina hidroxilasa) deskribatu dute. Aurkikuntza horrek mieloma anizkoitzaren tratamendurako erabilia den farmako honen ondorio kliniko kaltegarriak ulertzea ahalbidetu du. Horrelako ikerketek, gainera, zenbait froga kliniko pasatu dituzten konposatuen erabilera berrien aukerak zabaldu ditzakete. PPT saioak zelula bizietan ere aplikatu daitezke farmako berriak bilatzeko; teknika hori CETSA (*Cellular Thermal Shift Assay*) izenez ezagutzen da, eta zeluletako inguruneetan proteinen eta konposatuen arteko elkarrekintzak aztertzeko markaketarik gabeko prozedura indartsutzat deskribatu da [10]. PPT saioen erabilera mota honekin, adibidez, timidilato sintasaren inhibitzaile berriak aurkitu dira [11], zelulen ugalketaren kontrolan baliagarriak izan daitezkeenak.

Adibide hauek agerian jartzen duten modura, beste prozedura batzuekin parekatuta PPTaren abantailarik argiena konposatuen itu ezezagunen aurkikuntza ahalbidetzea da. Teknikak badauzka desabantailak ere. Gaitasun tekniko handia eta kostu handiko baliabideak behar dituen teknika da, konplexua eta nekeza. Gainera, mintzeko proteinekin lan egiteko mugak dauzka, beren disolbagarritasuna eta egonkortasuna direla eta. Etorkizunean, asko zabaldu daitezke teknika honek izan ditzakeen aplikazioak proteomikaren teknologien eta proteina hidrofobikoen PPT azterketak egiteko tresna berrien garapenean.

## 7. ESKER ONAK

Eskerrak Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Hizkuntza Politika eta Kultura Sailari ikerketa taldeari emandako sostenguagatik (erref. IT-971-16).

## 8. BIBLIOGRAFIA

- [1] LEE, H. eta LEE, J.W. 2016. «Target identification for biologically active small molecules using chemical biology approaches». *Archives of Pharmaceutical Research*, **39**, 1193-1201.
- [2] FEDOROV, O., MARSDEN, B., POGACIC, V., RELLOS, P., MÜLLER, S., BULLOCK, A.N., SCHWALLER, J., SUNDSTRÖM, M., KNAPP, S. 2007. «A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 20523-20528.
- [3] WAHLBERG, E., KARLBERG, T., KOUZNETSOVA, E., MARKOVA, N., MACCHIARULO, A., THORSELL, AG., POL, E., FROSTELL, Å., EKBLAD, T., ÖNCÜ, D., KULL, B., ROBERTSON, GM., PELLICCIARI, R., SCHÜLER, H., WEIGELT, J. 2012. «Family-wide chemical profiling

- and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors». *Nature Biotechnology*, **30**, 283-288.
- [4] MARTINEZ MOLINA, D., JAFARI, R., IGNATUSHCHENKO, M., SEKI, T., LARSSON, E.A., DAN, C., SREEKUMAR, L., CAO, Y., NORDLUND, P. 2013. «Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay». *Science*, **341**, 84-87.
- [5] SAVITSKI, M.M., REINHARD, F.B.M., FRANKEN, H., WERNER, T., SAVITSKI, M.F., EBERHARD, D., MARTINEZ MOLINA, D., JAFARI, R., DOVEGA, R.B., KLAEGER, S., KUSTER, B., NORDLUND, P., BANTSCHIEFF, M., DREWES, G. 2014. «Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome». *Science*, **346**, 1255784.
- [6] FRANKEN, H., MATHIESON, T., CHILDS, D., SWEETMAN, G.M.A., WERNER, T., TÖGEL, I., DOCE, C., GADE, S., BANTSCHIEFF, M., DREWES, G., REINHARD, F.B.M., HUBER, W., SAVITSKI, M.M. 2015. «Thermal proteome profiling for unbiased identification of direct and indirect drug targets using multiplexed quantitative mass spectrometry». *Nature Protocols*, **10**, 1567-1593.
- [7] CARRASCO DEL AMOR, A., FREITAS, S., URBATZKA, R., FRESNEDO, O., CRISTOBAL, S. 2019. «Application of bioactive thermal proteome profiling to decipher the mechanism of action of the lipid lowering 13<sup>2</sup>-hydroxy-pheophytin isolated from a marine Cyanobacteria». *Marine Drugs*, **17**, E371.
- [8] FREITAS, S., SILVA, N.G., SOUSA, M.L., RIBEIRO, T., ROSA, F., LEAO, P.N., VASCONCELOS, V., REIS, M.A., URBATZKA, R. 2019. «Chlorophyll derivatives from marine Cyanobacteria with lipid-reducing activities». *Marine Drugs*, **17**, 229.
- [9] BECHER, I., WERNER, T., DOCE, C., ZAAL, E.A., TÖGEL, I., KHAN, C.A., RUEGER, A., MUELBAIER, M., SALZER, E., BERKERS, C.R., FITZPATRICK, P.F., BANTSCHIEFF, M., SAVITSKI, M.M. 2016. «Thermal profiling reveals phenylalanine hydroxylase as an off-target of panobinostat». *Nature Chemical Biology*, **12**, 908-910.
- [10] LUNDGREN, S. 2019. «Focusing on relevance: CETSA-guided medicinal chemistry and lead generation». *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 690-693.
- [11] ALMQVIST, H., AXELSSON, H., JAFARI, R., DAN, C., MATEUS, A., HARALDSSON, M., LARSSON, A., MARTINEZ MOLINA, D., ARTURSSON, P., LUNDBÄCK, T., NORDLUND, P. 2016. «CETSA screening identifies known and novel thymidylate synthase inhibitors and slow intracellular activation of 5-fluorouracil». *Nature Communications*, **7**, 11040.