



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Solun proteiinien lämpöstabiilisuus määritykset lääkemolekyylien toiminnallisuuden havainnoinnissa

Aada Kytöniemi

Kemia
LuK-tutkielma
Laajuus: 6 op

28.10.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Aada Kytöniemi

Otsikko: Solun proteiinien lämpöstabiilisuus määrytykset lääkemolekyylien toiminnallisuuden havainnoinnissa

Ohjaaja: Kari Kopra

Sivumäärä: 21 sivua

Päivämäärä: 28.10.2025

Lääkekehityksessä on tärkeää, että yhdiste sitoutuu spesifisesti haluttuun kohteeseen, mikä mahdollistaa sekä tehokkuuden että turvallisuuden. Tätä varten lääkkeen tulee olla oikeassa paikassa ja sitoutua haluttuun kohteeseen korkealla spesifisyydellä. TSA, eli lämpösiirtymäanalyysi on tutkimusmenetelmä, jonka avulla lääkeaineiden toiminnallisuutta voidaan tutkia proteiinien lämpöstabiilisuuden avulla. Menetelmässä puhdistetun proteiinin lämpöstabiilisuutta tutkitaan fluoresoivan väriaineen avulla, joka sitoutuu denaturoituneen proteiinin hydrofobisiin alueisiin.

CETSA, eli solullinen lämpösiirtymäanalyysi kehitettiin, jotta voitiin tutkia yhdisteiden ja niiden kohdeproteiinien vuorovaikutuksia fysiologisesti merkittävässä ympäristössä lämpöstabiilisuuden avulla. CETSA:ssa mittaukset suoritetaan solu ympäristössä kokonaisissa soluissa, kudoksessa tai solulyysaatissa. Mittauksissa tutkitaan miten eri molekyylit sitoutuvat kohdeproteiineihin ja miten tämä vaikuttaa proteiinin lämpöstabiilisuuteen, rakenteeseen ja toimintaan niiden luonnollisessa ympäristössä. Proteiinien lämpöstabiilisuutta arvioidaan denaturoitumisen ja aggregaation perusteella. Kuumentamisen jälkeen näytteen liukoisten proteiinien määrä voidaan mitata ja luoda näille lämpökäyrä. Tyypillisesti sitoutuva molekyyli stabiloi kohdeproteiinia, jolloin yhdisteen vuorovaikutus proteiinin kanssa voidaan havaita lämpökäyrässä proteiinin sulamispisteen muutoksena ΔT_m .

CETSA:sta on useita variaatioita, jotka toimivat saman toimintaperiaatteen mukaisesti, mutta eroavat siinä, mitä menetelmää käytetään proteiinin määrytyksessä kuumentamisen jälkeen. Eri menetelmiä käytetään yksittäisten proteiinien tutkimiseen, laajoihin seulontoihin sekä koko proteomin kattaviin analyyseihin. Tässä tutkielmassa keskitytään CETSA:an, sen käyttöön lääkekehityksessä sekä sen eri variaatioiden toimintaan.

Avainsanat: CETSA, TSA, lämpöstabiilisuus, tehoseulonta, sulamislämpö

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | JOHDANTO | 5 |
| 2 | LÄMPÖSTABIILISUUSMÄÄRITYKSET | 6 |
| 2.1 | Lämpösiirtymäanalyysi, TSA | 6 |
| 2.2 | Solullinen lämpösiirtymäanalyysi, CETSA | 8 |
| 2.3 | CETSA lääkekehityksessä | 10 |
| 3 | CETSAN MUUNNELMAT JA SOVELLUKSET | 11 |
| 3.1 | Korkean läpimenon CETSA | 12 |
| 3.2 | Massaspektrometriaan perustuva CETSA | 13 |
| 3.3 | Bioluminesenssiin perustuva lämpösiirtymäanalyysi | 15 |
| 4 | CETSAN TULEVAISUUS | 16 |
| 5 | YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET | 17 |
| | VIITTEET | 20 |

Lyhenteet

| | |
|----------|---|
| HTS | Tehoseulonta (engl. high-throughput screening) |
| TSA | Lämpösiirtymäanalyysi (engl. thermal shift assay) |
| CETSA | Solullinen lämpösiirtymäanalyysi (engl. cellular thermal shift assay) |
| DSF | Differentiaalinen skannausfluorimetria (engl. differential scanning fluorimetry) |
| DSC | Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria (engl. differential scanning calorimetry) |
| HT-CETSA | Korkean läpimenon lämpösiirtymäanalyysi (engl. high-throughput CETSA) |
| MS | Massaspektrometria (mass spectrometry) |
| BiTSA | Bioluminesenssiin perustuva lämpösiirtymäanalyysi (engl. bioluminescence thermal shift assay) |
| PBS | Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. phosphate-buffered saline) |

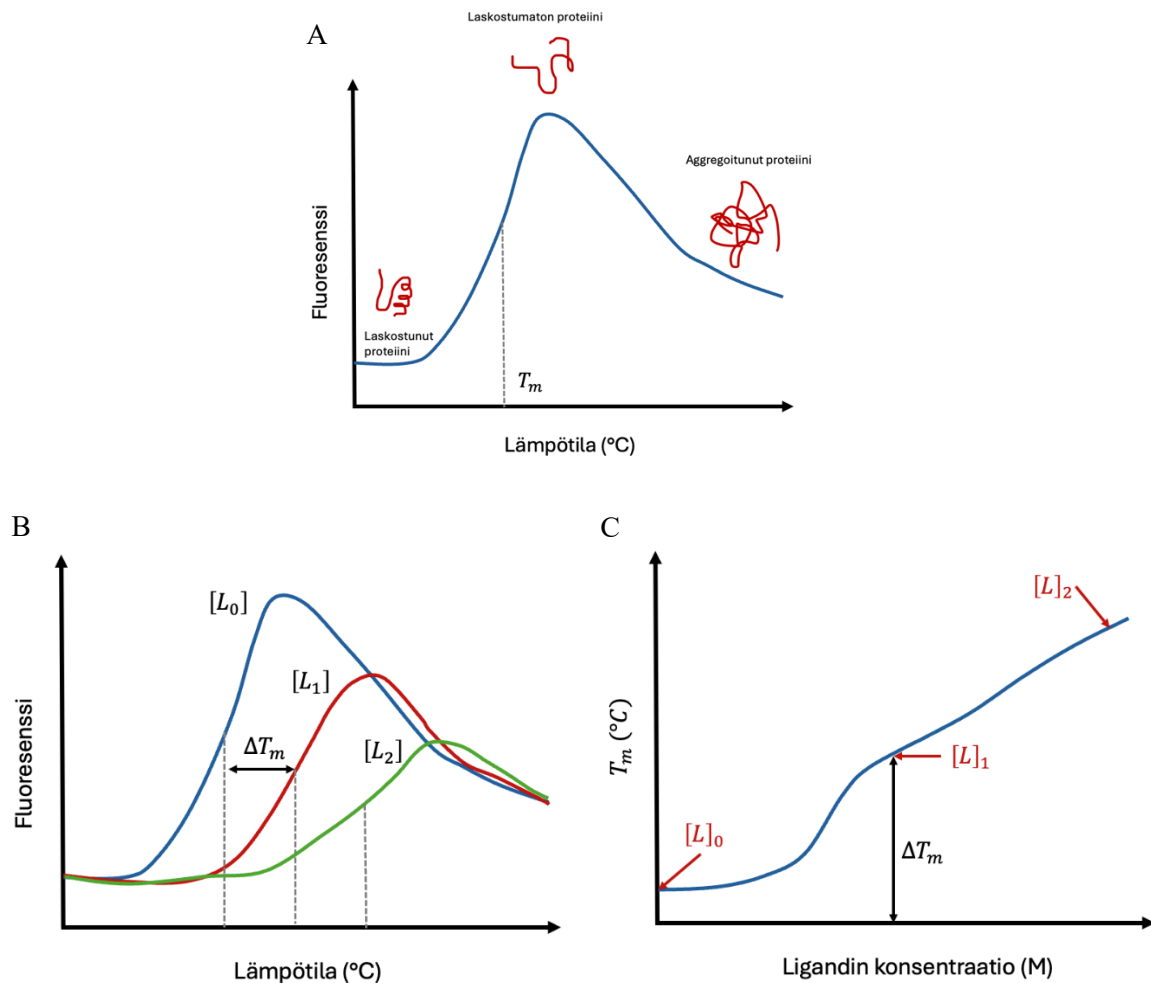
1 Johdanto

Lääkemolekyyliseulonnan avulla pyritään tunnistamaan uusia yhdisteitä, joilla on kyky vaikuttaa biologisiin kohteisiin, kuten entsyymeihin tai reseptoreihin.¹ Seulontaan voidaan käyttää in silico-seulontaa tai tehoseulontaa (engl. *high-throughput screening*, *HTS*), jolla voidaan seuloa suuria yhdistekirjoja, jotka sisältävät jopa miljoonia näytteitä. HTS vaatii kehittyneitä ja automatisoituja järjestelmiä, joiden avulla määritykset voidaan suorittaa 96-, 384-, tai 1536-kuoppalevyillä. In silico-seulonassa molekyylinmallinnustekniikat yhdistetään virtuaalisiin yhdistekirjoihin sekä biologisen kohteen rakenteelliseen dataan. Tällöin voidaan arvioida jokaisen yhdisteen kyky sitoutua kohdeproteiiniin. Virtuaalikirjaston yksittäiset yhdisteet voidaan sijoittaa tietokoneavusteisesti, eli dokata, hypoteettiseen sitoutumiskohtaan biologisessa kohteessa. Tällöin saadaan selville yhdisteiden suhteellinen paremmuusjärjestys. Dokkauksen jälkeen käytetään automaattisia tiedon analysointityökaluja järjestämään sen antamat ennusteet. Ennusteita käytetään valitsemaan pienempi alijoukko suuresta yhdistekirjosta, joita voidaan testata fyysisessä biologisessa seulonnassa mahdollisina lääkekehityksen lähtökohtina.¹

Yksi tapa arvioida yhdisteiden ja biologisten kohteiden välistä vuorovaikutusta on lämpösiirtymäanalyysi (engl. *thermal shift assay*, *TSA*).² Menetelmä perustuu yhdisteen sitoutumisen aiheuttamaan lämpöstabiiisuuden muutokseen kohdeproteiinissa. TSA:ssa käytetään fluoresoivaa hydrofobista väriainetta, kuten SYPRO Orangea, jonka fluoresenssi voimistuu proteiinin denaturoituessa. TSA on nopea ja yksinkertainen menetelmä, joka soveltuu hyvin lääkeaineseulontaan.²

TSA tarjoaa hyödyllistä tietoa proteiinitasolla, mutta se ei huomioi solunsisäisiä olosuhteita.³ Tämän takia on kehitetty solullinen lämpösiirtymäanalyysi (engl. *cellular thermal shift assay*, *CETSA*). Menetelmä mahdollistaa yhdisteen ja kohdeproteiinin vuorovaikutusten tutkimisen solu ympäristössä. CETSAa ja sen variaatioita on viime vuosien aikana mukautettu monipuolisesti lääkekehityksen eri vaiheisiin. Western blot-pohjaista CETSAa hyödynnetään yhdisteen ja sen kohdeproteiinin vuorovaikutusten havainnointiin, kun taas mikropartikkelipohjaisiin tutkimusmenetelmiin perustuvaa HT-CETSAa (engl. *high-throughput CETSA*) käytetään molekyylikirjastojen seulontaan uusien molekyylien löytämiseksi, jotka sitoutuvat ennalta määrättyyn kohteeseen. Massaspektrometriaan perustuva CETSA on noussut esiin tehokkaana työkaluna kohteen dekonvoluutioon sekä uusien sitoutuvien yhdisteiden löytämiseksi vanhoille sekä uusille molekyyille.³

vuorovaikutusten tutkimiseen.⁶ Sen avulla voidaan tutkia pH-olosuhteiden, ionivahvuuden, erilaisten proteiinispesifisten ja ei-spesifisten apuaineiden sekä ligandien vaikutusta proteiinin stabiilisuuteen.² TSA:n päämenetelmä on differentiaalinen skannausfluorimetria (engl. *differential scanning fluorimetry, DSF*), jolla tutkitaan yksittäisten puhdistettujen proteiinien rakenteellisia muutoksia kuumennuksen seurauksena.⁶ Kun proteiinia kuumennetaan, se denaturoituu, jolloin sen hydrofobiset alueet paljastuvat. Tällöin fluoresoiva väriaine, kuten SYPRO Orange, sitoutuu avautuneen proteiinin hydrofobisiin alueisiin, joka havaitaan fluoresenssin intensiteetin kasvuna.⁶ Fluoresenssin maksimisignaalin puolivälissä voidaan havaita proteiinin sulamispiste (T_m) (Kuva 2A). TSA tutkii ligandin aiheuttamaa stabilisaatiota proteiinin natiivirakenteessa lämpösiirtymää vastaan. Proteiiniliuosta lämmitetään asteittain ja fluoresenssisignaalia seurataan proteiinin denaturoitumisen arvioimiseksi ligandin läsnä ollessa sekä ilman sitä. Ligandin lisääminen proteiiniliuokseen voi muuttaa proteiinin stabiilisuutta, jolloin sen sulamislämpötila muuttuu, ΔT_m (Kuva 2B). Voimakkaammin proteiiniin sitoutuvat ligandit aiheuttavat suuremman muutoksen sulamislämpötilassa. Muutos on positiivinen stabiloiville ligandeille ja voi olla negatiivinen destabiloiville ligandeille, jotka avaavat rakennetta niin, että denaturaatio tapahtuu helpommin. Kun sulamislämpötiloja mitataan ligandin eri pitoisuuksilla, voidaan muodostaa annosvastekäyrä (engl. *dose response curve*), joka kuvaa proteiinin sulamislämpötilaa ligandin konsentraation funktiona (Kuva 2C). Annosvastekäyrää käytetään proteiinin ja ligandin affiniteetin laskemiseen, jotta saadaan arvio proteiinin ja ligandin välisen sitoutumisen voimakkuudesta.²



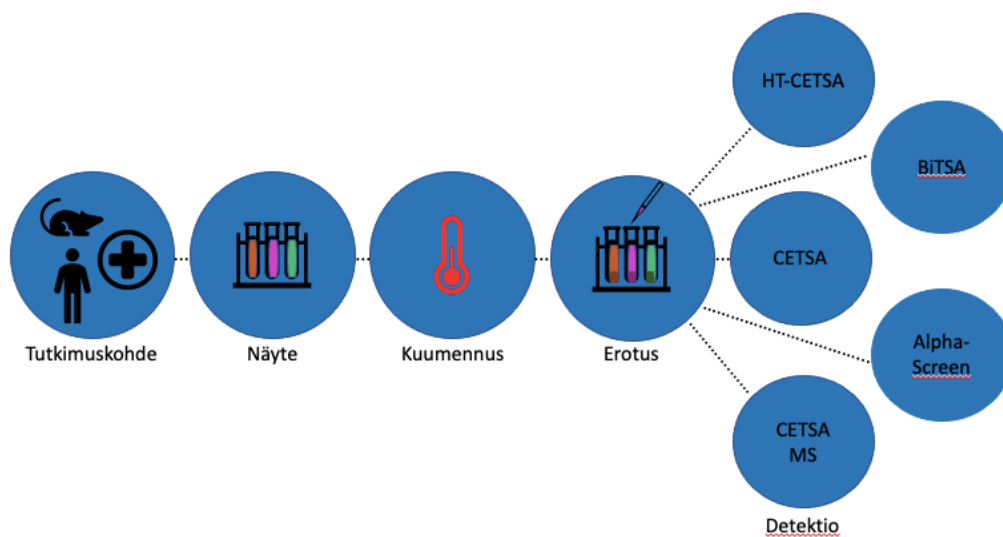
Kuva 2. TSA:n peruseriaate. (A) Lämpötilan nostaminen saa aikaan proteiinin denaturoitumisen. Sulamispiste (T_m) havaitaan maksimisignaalin puolivälissä. (B) Proteiinin lämpökäyrä eri lisätyn ligandin (L) pitoisuuksilla, josta jokaisen sulamislämpötilä (T_m) merkitty katkoviivoin. (C) Proteiini-ligandi-annosvastekäyrä, jossa T_m -arvot esitetty ligandin konsentraation funktiona.

2.2 Solullinen lämpösiirtymäanalyysi, CETSA

CETSA on vuonna 2013 julkaistu biofysikaalinen menetelmä, jonka avulla tutkitaan yhdisteiden sitoutumista kohdeproteiineihin kokonaisissa soluissa, kudoksissa tai solulyssaattissa. CETSA perustuu perinteiseen lämpötilasiirtymäanalyysiin eli TSA:han, jossa yhdisteen sitoutumista tutkitaan proteiinien lämpöstabiilisuuden ja sen muutoksien avulla. Tutkimuksissa kohdeproteiineissa havaittava lämpöstabiilisuuden muutos kertoo siitä, miten tutkittava yhdiste vaikuttaa proteiinin rakenteeseen ja toimintaan. CETSA eroaa TSA-menetelmistä siten, että CETSA voidaan toteuttaa elävissä soluissa, kudoksissa tai

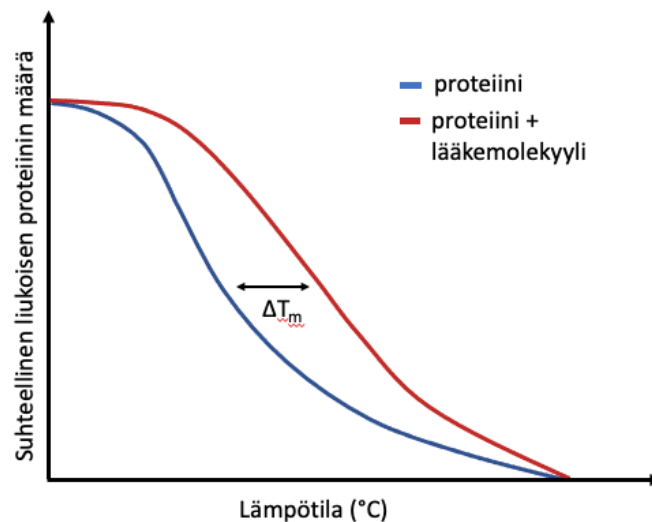
solulysaateissa, kun taas TSA suoritetaan erittäin puhtaissa ja eristetyissä olosuhteissa ja mittauksissa tutkitaan yksittäisiä puhdistettuja proteiineja.^{3,7}

Suurin osa CETSAa hyödyntävistä tutkimuksista käyttävät edelleen vuonna 2013 julkaistua alkuperäistä protokollaa (Kuva 3).⁸ Protokolla alkaa tutkimuskohteen valinnalla, josta valmistetaan näytteet. Tutkimuksissa voidaan käyttää kokonaisia soluja tai solulysaattia. Kun käytetään kokonaisia soluja, ne käsitellään ensin tutkittavalla yhdisteellä, jotta sitoutuminen proteiiniin tapahtuu.⁹ Tämän jälkeen solut kerätään ja pestään fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (engl. *phosphate-buffered saline, PBS*), jotta saadaan poistettua ylimääräiset yhdisteet, kuten solujen kasvatusliuos. Valmiita näytteitä kuumennetaan haluttuun lämpötilaan asti, jonka jälkeen kokonaiset solut hajotetaan. Hajottamisen jälkeen näytteistä erotellaan liukoiset proteiinit, joita tutkitaan halutun CETSAN detektiomenetelmän mukaisesti. Tutkimuksissa voidaan käyttää kokonaisten solujen lisäksi myös solulysaattia. Solulysaatti valmistetaan hajottamalla ensin solut, jonka jälkeen ne käsitellään tutkittavalla yhdisteellä. Tämän jälkeen solulysaatti pestään PBS:n avulla ja saadut valmiit näytteet kuumennetaan haluttuun lämpötilaan. Kuumennamisen jälkeen näytteistä erotellaan liukoiset proteiinit ja niitä tutkitaan halutun detektiomenetelmän mukaisesti.^{3,8,9}



Kuva 3. CETSAN työnkulku. Näytteet valmistetaan käsittelemällä solut tutkittavalla yhdisteellä ja sen jälkeen puhdistamalla ne PBS:n avulla. Näytteitä kuumennetaan eri lämpötiloihin proteiinin denaturaation aikaansaamiseksi, jonka jälkeen liuoksesta erotellaan denaturoituneet proteiinit. Liukoisen proteiinin määrää analysoidaan valitun detektiomenetelmän mukaisesti.

CETSA:ssa liukoisen proteiinin määrän avulla voidaan muodostaa lämpökäyrä proteiinin stabiilisuuden tutkimiseen detektiomenetelmästä riippumatta (Kuva 4).³ Siitä voidaan määrittää tutkitavan yhdisteen aiheuttama proteiinin sulamispisteen muutos ΔT_m .⁸ Tutkittava yhdiste voi vaikuttaa proteiiniin stabiloivasti tai epästabiloivasti. Epästabilsaatiota voi aiheuttaa esimerkiksi se, että yhdiste häiritsee proteiinien välisiä sidoksia, ja siten hajottaa proteiinikompleksin tai se, että yhdiste kilpailee luonnollisen substraatin kanssa.¹⁰ Jos tutkitun ligandin ja kohdeproteiinin vuorovaikutukset säilyvät vielä korkeissa lämpötiloissa, eli ligandi on sitoutunut proteiiniin muodostaen kompleksin, voidaan havaita kohdeproteiinin stabiloituminen, tällöin $\Delta T_m > 0$. Jos lämpötilasta riippuvainen proteiinin ja ligandin välinen vuorovaikutus loppuu korkeissa lämpötiloissa, eli ligandi irtoaa proteiinista tai kompleksi hajoaa, voi fysiologisessa lämpötilassa tapahtuva vuorovaikutus peittyä, jolloin $\Delta T_m = 0$.⁸



Kuva 4. Kohdeproteiinin liukoisesta määrästä muodostettava lämpökäyrä. Lineaarisen osan puolivälistä havaitaan lääkemolekyylin aiheuttama lämpöstabiilisuuden muutos ΔT_m .

CETSA laajentaa TSA:n käyttöä merkittävästi mahdollistamalla ligandin aiheuttamien muutoksien tutkimisen monimutkaisissa ympäristöissä. Tämä mahdollistaa menetelmän käytön lääkekehityksessä vastaamaan kysymyksiin esimerkiksi siitä, mitkä ovat mahdollisia lääkeainekandidaatteja, sitoutuuko lääkeainekandidaatit haluttuun kohteeseen biologisesti merkittävässä ympäristössä sekä millä ligandin konsentraatiolla vaikutus tapahtuu.

2.3 CETSA lääkekehityksessä

CETSA:lla kohteen sitoutumista voidaan tutkia mistä tahansa solumatriisista, kuten solulinjoista, eläinkudoksista sekä potilasnäytteistä. Tämä mahdollistaa menetelmän käytön

melkein kaikissa lääkkeiden kehityksen sekä lääkekehitysprosessin vaiheissa.¹⁰ CETSA on tärkeä työkalu lääkekehityksessä, sillä sen avulla voidaan selvittää, sitoutuuko lääkemolekyylillä todella kohdeproteiiniinsa fysiologisessa ympäristössä ja pääseekö se soluun ollenkaan. Tämän lisäksi menetelmää hyödynnetään varmistamaan lääkkeen oikea sitoutuminen ihmisessä. Erona muihin menetelmiin, CETSA ei vaadi proteiinin puhdistamista, vaan kohde voidaan tutkia sen luonnollisessa ympäristössä, jolloin saadut tulokset ovat biologisesti merkittäviä.¹¹

Lääkekehityksen varhaisessa vaiheessa tehoseulonnan avulla tunnistetaan yhdisteet, jotka ovat potentiaalisia lääkeaineita tutkittavalle kohdeproteiinille.¹² Tässä lääkekehityksen vaiheessa hyödynnetään HT-CETSAa, sillä tehoseulonta mahdollistaa useiden lääkeaineiden sitoutumisen tutkimisen kohdeproteiiniin samanaikaisesti. Tämä helpottaa merkittävästi potentiaalisten yhdisteiden tunnistamista. Lääkekehityksen varhaisessa vaiheessa massaspektrometriaa hyödyntävää CETSAa käytetään lääkeaineen sitoutumiskohteen tunnistamiseen. Mahdollinen sitoutumiskohte tunnistetaan tutkimalla koko proteomin laajuisesti proteiinin sulamispisteen muutosta kuumennuksen aikana. Tämän lisäksi menetelmän avulla havaitaan lääkeaineen mahdollisia sitoutumisia muihin kuin haluttuun kohteeseen, jotka voivat aiheuttaa muutoksia solun toimintaan tai haittavaikutuksia, jotka heikentävät lääkeaineen tehoa ja turvallisuutta.¹² CETSAa hyödynnetään myös resistenttien solujen tutkimiseen.¹³ Resistenssin syynä voi olla mutaatio kohdeproteiinissa. Tämä havaitaan CETSA:n avulla, sillä lääkeaine ei stabiloi kohdeproteiinia, jolloin ei havaita muutosta proteiinin sulamislämpötilassa. Resistenssi voi muodostua myös takaisinsäätelyn kautta, jolloin CETSAlla saadaan normaalin näköinen vaste, mutta solu ei reagoi lääkeaineeseen.¹³ CETSAa sovelletaan myös molekyylien toimintamekanismien tutkimiseen.¹⁴ Se antaa tietoa proteiinien ja muiden solumolekyylien, kuten metabolien, DNA:n/RNA:n ja muiden proteiinien välisten vuorovaikutusten muutoksista sekä posttranslatiivisten muutosten aiheuttamista stabiilisuusvaikutuksista. Tällaisia tutkimuksia ei suoriteta usein, sillä ne vaativat luotettavimmat CETSA:n menetelmät, jotka tuottavat monimutkaista ja vaikeasti tulkittavaa dataa.¹⁴

3 CETSA:n muunnelmät ja sovellukset

CETSAsta on useita eri variaatioita, eli detektiomenetelmiä, jotka perustuvat samaan toimintaperiaatteeseen, mutta eroavat siinä, mitä menetelmää käytetään proteiinin määrittämisessä lämpöshokin jälkeen.⁹ Eri detektiomenetelmiä hyödynnetään lääkekehityksessä ja esimerkiksi evoluutiobiologian sukupuiden tutkimuksissa tai lämpöstabiilien entsyymien

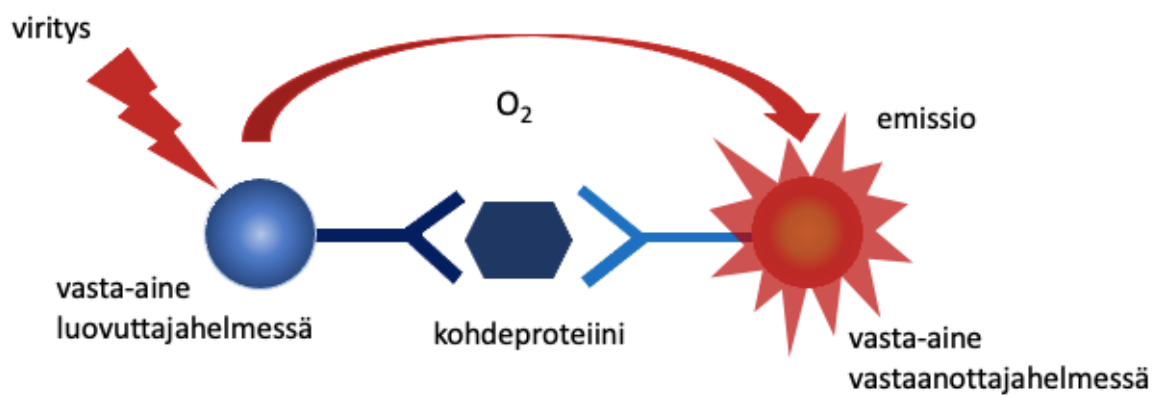
etsinnässä teollisia sovelluksia varten.³ Jokainen CETSA:n variaatio käyttää erilaisia menetelmiä ja niistä muodostuu erilaisia etuja ja rajoitteita. Tässä tutkielmassa keskitytään neljään CETSA:n detektiomenetelmään, HT-CETSAan, CETSA MS:ään, CETSA-AlphaScreeniin sekä BiTSAan (engl. *HIBIT Thermal Shift Assay*).

3.1 Korkean läpimenon CETSA

HT-CETSA:ssa varmistetaan lääkeaineen sitoutuminen tunnettuun proteiini-kohteeseen käyttämällä vasta-aineita proteiinin määrittämiseen.⁹ HT-CETSA kehitettiin, kun haluttiin laajentaa CETSA:n mahdollisuuksia testien läpimenomäärän kasvattamiseksi. Tavoitteena oli mahdollistaa CETSA-määrittäykset 384-kuoppalevyillä sekä tiheämmillä kuoppalevyillä, jotta kohdemolekyylien sitoutumismäärittäyksiä voitaisiin käyttää suurempien yhdistekirjojen profilointiin.⁷

HT-CETSA voidaan jakaa kahteen pääkategoriaan, josta toisessa mitataan solun luontaisesti tuottavia modifioimattomia proteiineja ja toisessa reportterileimattuja (engl. *reporter-tagged*) proteiineja. Analyysit, jotka mittaavat solun luontaisesti tuottavia proteiineja, vastaavat parhaiten elimistön todellisia olosuhteita, sillä proteiinin ilmentymistä säädellessä sen luonnollisesta paikasta, proteiinin sekvenssi on muokkaamaton ja vaihtoehtoisen silmukoinnin seurauksena syntyneet proteiinivariantit voidaan havaita. Endogeenisen proteiinin analyysit vaativat jokaiselle tutkittavalle kohteelle yksittäistä menetelmävalidointia, sillä proteiinien tunnistaminen vaihtelee niiden rakenteen ja ominaisuuksien mukaan. Ongelmana on, että jokaiselle kohteelle ei ole sopivia reagensseja, kuten spesifisiä vasta-aineita kaupallisesti saatavilla.⁷ Reportteripohjaiset teknologiat lisäävät järjestelmän joustavuutta, sillä analyysissä käytetään proteiinimarkkereita (engl. *protein tags*), jotka ovat liitetty kohdeproteiineihin.⁷ Tämä mahdollistaa vakiintuneiden detektioreagenssien ja -menetelmien käytön. Reportteripohjaisten menetelmien edut voivat muodostua myös haitoiksi. Esimerkiksi proteiinin yliekspressio voi vaikuttaa proteiinin toimintaan, sijaintiin tai proteiinien välisiin vuorovaikutuksiin. Reportteritagilla voi olla myös ei-haluttuja vaikutuksia, sillä se voi vaikuttaa proteiinin toimintaan tai aggregoitumislämpötilaan. Tämän lisäksi jokainen kohde vaatii kloonauksen, eli fuusioproteiini täytyy luoda aina erikseen. Endogeenisten ja reportteripohjaisten lähestymistapojen lisäksi on muodostunut hybridimenetelmiä, joissa reportteritagia voidaan liittää endogeeniseen lokukseen käyttäen genomien muokkaamistyökaluja.⁷

Yksi HT-CETSAan pohjautuvista detektiomenetelmistä on CETSA-AlphaScreen. Se on korkean läpimenoajan seulontaan pohjautuva homogeeninen määritysmenetelmä, jolla tutkitaan proteiinin ja ligandin sitoutumista hyödyntämällä etäisyysriippuvaa energiansiirtoa luovuttaja- ja vastaanottajahelman välillä (Kuva 5).⁷ Menetelmässä signaalin välittäjänä toimii vasta-aineet, jotka ovat sidottuna helmiin. Kohdeproteiinin läsnä ollessa helmissä olevat vasta-aineet sitoutuvat proteiiniin ja tuovat luovuttaja- ja vastaanottajahelmet lähelle toisiaan. Tällöin luovuttajahelmestä vapautuva virittynyt happi virittää vastaanottajahelman tiofeenijohdannaisia, joka havaitaan fluoresenssi tai kemiluminesenssi signaalina kohdeproteiinin määrän kvantifioimiseksi.⁷



Kuva 5. AlphaScreen-menetelmän toimintamekanismi. Vasta-aineet ovat kiinnittyneinä vastaanottaja- ja luovuttajahelmiin. Vasta-aineen sitoutuminen kohdeproteiiniin tuo vastaanottaja- ja luovuttajahelman lähelle toisiaan, jolloin luovuttajahelman virittynyt happi virittää vastaanottajahelman tiofeenijohdannaisia, joka havaitaan signaalina kohdeproteiinin määrän kvantifioimiseksi.

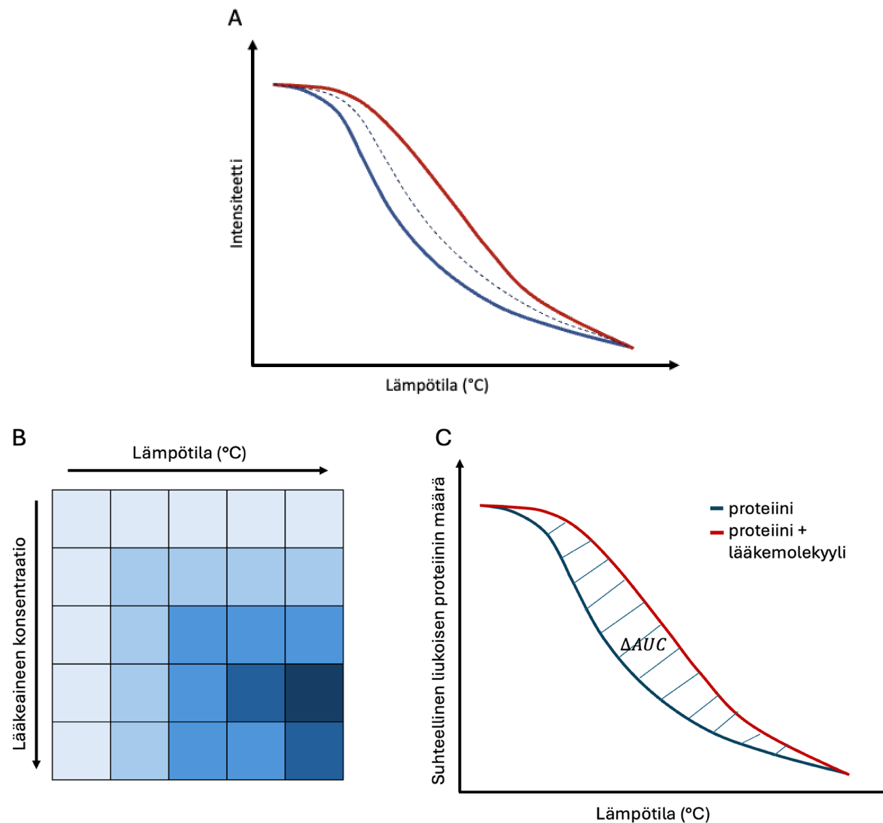
3.2 Massaspektrometriaan perustuva CETSA

CETSAan, jossa käytetään massaspektrometriaa, viitataan kirjallisuudessa yleensä nimellä CETSA MS, TPP (engl. *Thermal Proteome Profiling*) tai PISA (engl. *Proteome integral Solubility Alteration*).⁹ Nämä menetelmät eroavat toisistaan tutkimuksen periaatteiden ja menetelmien osalta. CETSA MS on massaspektrometriaa hyödyntävä proteomitasoinen mittausta proteiinin ja ligandin sitoutumiseen solutasolla. Yhdessä kokeessa voidaan luoda lämpöprofiili yli 7000 proteiinille.⁹ Koko proteomin sulamiskäyttäytymiseen viitataan meltomena (engl. *meltome*). CETSA MS:n avulla voidaan tutkia näytteen koko proteomia, eli jokaiselle proteiinille voidaan erikseen muodostaa oma sulamiskäyrä (Kuva 6A). Sulamispisteen muutoksen lisäksi menetelmällä voidaan määrittää annosvastekäyrä jokaiselle

lämpötilalle. Annosvasteet helpottavat tulosten lukemista, varsinkin, jos proteiinin sulamispisteen muutos on pieni.³ CETSA MS-menetelmässä proteiineja voidaan tutkia kuumentamisen jälkeen lämpötilan, lääkeaineen pitoisuuden, inkubaatioajan tai näiden muuttujien yhdistelmien funktiona.¹⁵ Lämpökäyrän muodostamiseksi näytteet inkuboidaan saturoivalla konsentraatiolla haluttua yhdistettä ennen kuin niitä kuumennetaan. Kuumentamisen jälkeen näytteet sentrifugoidaan ja supernatantti, eli liukoinen fragmentti, hajotetaan trypsiinillä ja merkitään Tandem Mass Tag (TMT) -tekniikalla. Tämä mahdollistaa lämpötilan, konsentraation sekä ajan rinnakkaisen analyysin, jolloin voidaan tunnistaa proteiinit, jotka ovat enemmän tai vähemmän lämpöstabiliileja yhdisteen läsnä ollessa.¹⁵

TPP, toiselta nimeltään 2D CETSA MS-menetelmässä näytteet käsitellään halutun yhdisteen laimennossarjalla ja jokainen laimennossarja kuumennetaan kaikkiin lämpögradientin lämpötiloihin.¹⁵ 2D CETSA MS on tehokas tapa hyödyntää CETSAa, sillä menetelmällä saadaan aikaan lämpökäyrä jokaisesta konsentraatiopitoisuudesta tai vastaavasti se voidaan havaita annosvasteena jokaisessa lämpötilassa. Menetelmän avulla proteiinin ja yhdisteen vuorovaikutuksen tutkiminen ei rajaudu pelkkään sulamispisteen muutokseen lämpökäyrässä, vaan myös proteiinin määrää eli laskostumisen muutoksia voidaan tutkia valitussa lämpötilassa konsentraatiopitoisuuden funktiona (Kuva 6B). Näitä tuloksia on yleensä helpompi tulkita, kuin mahdollisesti pieniä muutoksia proteiinin sulamispisteen (ΔT_m) arvossa.¹⁵

PISA-menetelmässä näytteet jokaisesta lämpögradientista yhdistetään yhdeksi näytteeksi.³ Tämä on tehokas tapa vähentää näytteiden määrää ja massaspektrometrin käyttöaika samalla säilyttäen suurimman osan 2D-menetelmän informaatiosta. PISAssa tulokset esitetään ΔAUC -arvona, eli pitoisuuden negatiivisen kontrollin ja testattavan yhdisteen välille jäävän alueen pinta-alana (Kuva 6C). ΔAUC -arvon suuruus voi viitata yhdisteen aiheuttamaan proteiinin stabilisaatioon. Lämpögradienttien yhdistäminen johtaa niin sanottujen ei-CETSA-pitoisuusvaikutusten (engl. *non-CETSA abundance effects*), kuten proteiinin hajoamiseen liittyvien tietojen menetykseen. Tämä voidaan kiertää valmistamalla kuumentamaton näyte, joka käsitellään samalla tavalla kuin muut näytteet sekä kuumentamaton näyte, joka käsitellään ainoastaan liuottimella. Näytteiden yhdistäminen vaikeuttaa myös pienten ΔAUC -muutosten sekä ei-sigmoidaalisten proteiinien sulamiskäyttäytymisen havaitsemista. Tämän ratkaisemiseksi lämpötilagradientin näytteen voidaan yhdistää pienempiin, kolmen lämpötilan ryhmiin kymmenen sijaan. Tämä parantaa resoluutiota sekä auttaa tunnistamaan ainutlaatuisia siirtymiä, mutta peittää osan tutkittavista proteiineista.³



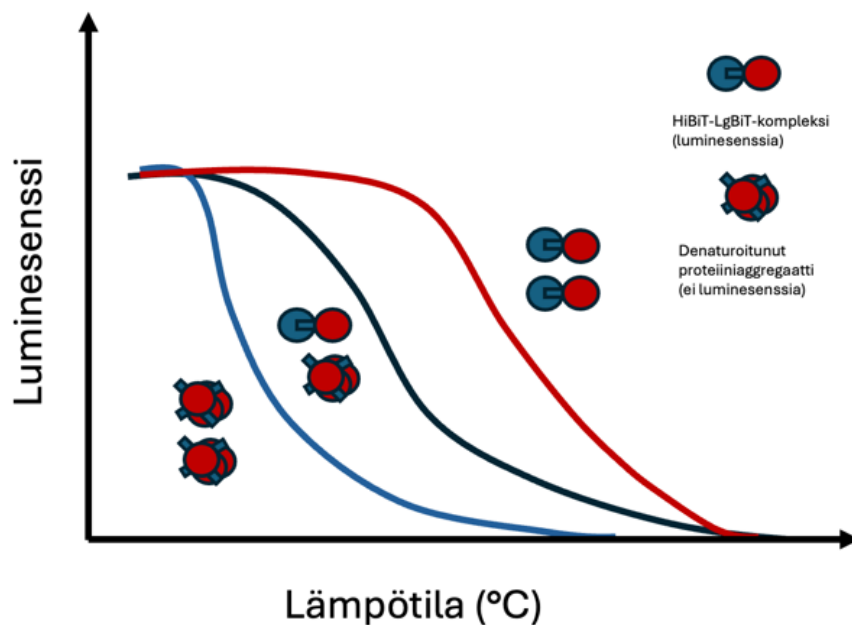
Kuva 6. Eri CETSA MS-menetelmien tulosten esitysmuodot. (A) Proteomien jokaisen proteiinin lämpökäyrä. Jos tutkittava yhdiste on vaikuttanut kohdeproteiiniin, havaitaan muutos lämpökäyrässä. (B) 2D CETSA MS-menetelmän tulokset esitetty lämpökarttana, jossa värin intensiteetti kuvaa ΔT_m -arvon suuruutta. Jokainen lämpötila ja lääkeaineen pitoisuus on esitetty erikseen. (C) PISAssa tulokset esitetään ΔAUC -arvona, joka saadaan kontrollin ja käsitellyn näytteen väliin jääneestä pinta-alasta.

3.3 Bioluminesenssiin perustuva lämpösiirtymäanalyysi

BiTSA on CETSA:n vasta-ainevapaa korkeanläpimenoajan detektiomenetelmä, jossa tutkittavan yhdisteen ja kohdeproteiinin vuorovaikutuksen tutkimiseen käytetään peptidileimoja (engl. *peptide tag*).¹⁶ BiTSA:ssa mittaukset suoritetaan solu ympäristössä ja mittauksissa hyödynnetään homogeenistä, luminesenssipohjaista mittausta HiBiT-leimattuun proteiiniin CRISPR-käsitellyissä soluissa. Pieni 11-aminohapon peptidileima, HiBiT, toimii luminesoivana välittäjänä liukoisen ja aggregoituneen proteiinin välillä. HiBiT-leiman pienen koon vuoksi se voidaan liittää endogeenisten solujen proteiineihin CRISPR-Cas9-tekniikan avulla. Kohdeproteiiniin liitetty HiBiT sitoutuu sen täydentävään komponenttiin LgBiT:hen kuumentamisen jälkeen. Kun HiBiT-LgBiT on yhdessä kompleksissa, ne tuottavat

bioluminesenssia, mutta kun kohdeproteiini denaturoituu, LgBiT ei voi sitoutua HiBiTiin, jolloin luminesenssia ei synny.

BiTSAssa proteiineja leimataan HiBiTillä niiden luonnollisessa paikassa genomissa, joka mahdollistaa kohdeproteiinin ja yhdisteen vuorovaikutusten tutkimisen olosuhteissa, jotka vastaavat solujen proteostaasia eli endogeenisten promoottoreiden ja säätelyelementtien valvonnassa. Tämän avulla vältetään mahdollisilta ongelmilta ja virheiltä, jotka voivat syntyä leimattujen proteiinien yliekspressiojärjestelmissä, kuten proteiinin väärältä lokalisaatiolta tai solun toksisuudelta. BiTSA:n avulla voidaan arvioida nopeasti pienmolekyylisten ligandien, kuten lääkeaine kandidaattien solullista sitoutumista niiden spesifiseen kohteeseen (Kuva 7).¹⁶



Kuva 7. BiTSA:n toimintaperiaate. Kuvaajassa on esitetty miten yhdisteen sitoutuminen HiBiT-leimattuun kohdeproteiiniin solussa voi vaikuttaa proteiinin lämpöstabiilisuuteen. Yhdisteen sitoutuminen voi aiheuttaa joko positiivisia, eli lämpöä stabiloivia tai negatiivisia eli lämpöä destabiloivia muutoksia proteiinin sulamislämpötilaan.

4 CETSA:n tulevaisuus

Suurin osa CETSA:n raportoiduista tutkimuksista on suoritettu in vivo, eli ehjissä soluissa ja suurimmaksi osaksi kuolemattomilla solulinjoilla.¹⁰ CETSA:n potentiaalista käyttöä kohdesitoutumisen tutkimiseen kliinisissä kokeissa ehdotettiin jo ensimmäisessä CETSAa käsitelleessä julkaisussa. Tämänhetkinen halu laajentaa lääkekehityksen menetelmiä on luonut

uudentyyppisellä mekanismilla toimivia näytteitä, kuten proteiinin hajottajia, biologisia aineita, RNA:ta kohdentavia pienmolekyylejä sekä oligonukleotidejä. Tämä on lääkekehityksen alue, jossa CETSA:n uskotaan lisäävän arvoa tulevina vuosina, varsinkin kohdennetun proteiinin hajotuksen alalla. CETSA tarjoaa mahdollisesti arvokasta tietoa solun läpäisevyydestä sekä hajottajan solun sisäisestä toiminnasta.¹⁰

Tulevaisuudessa tekoälyn ja koneoppimisen rooli uusien lääkeaineiden löytämisessä tulee kasvamaan.¹⁰ Virtuaalisen lääkeseulonnan ja CETSA:n yhdistämisen avulla on mahdollista tunnistaa nopeasti uusia lääkeainekandidaatteja ja vahvistaa niiden kykyä sitoutua suunniteltuun kohteeseen biologisesti merkittävässä ympäristössä. Tämän lisäksi koneoppimista sovelletaan data-analyysiin suurten tietoaaineistojen käsittelyssä.¹⁰

Yksi uusimmista CETSA:n sovellutuksista, yksisolainen CETSA (engl. single cell CETSA) on tutkimuksen alla oleva menetelmä, jossa yhdisteen sitoutumista kohdeproteiiniin tutkitaan yksittäisissä soluissa.³ Yksisolainen CETSA vähentää tutkimuksissa tarvittavien solujen määrää miljoonista vain muutamiiin satoihin. Tämä mahdollistaa CETSA:n hyödyntämisen myös arvokkaiden potilasmateriaalien tutkimuksissa. Rajoituksena on, että pieni solumäärä vaikeuttaa rinnakkaisnäytteiden valmistusta, eri lääkeaineiden testausta sekä annos- ja pitoisuusvasteiden tutkimista. Yksisoluisen CETSA:n lisäksi yksisolainen massaspektrometria on kehittymässä uudeksi teknologiaksi. Yksisoluisen CETSA:n ja massaspektrometrian yhdistäminen uudeksi teknologiaksi on tutkimuksen alla, ja jos menetelmä on toimiva, loisi se kokonaan uuden käyttöalueen CETSA:lle.³

5 Yhteenveto ja johtopäätökset

CETSA on keskeinen menetelmä eri yhdisteiden tutkimiseen proteiinien lämpöstabiilisuuden avulla. CETSA mahdollistaa yhdisteiden tutkimisen solu ympäristössä, eli biologisesti merkittävässä ympäristössä. Tämä on suuri etu lääkekehityksen kannalta, sillä tutkimuksissa saadaan tietoa yhdisteestä sellaisessa ympäristössä, jossa mahdollisen lääkeaineen tulisikin toimia. CETSAa hyödynnetään lääkekehityksen varhaisissa vaiheissa sekä keskivaiheissa, kun varmistetaan tutkittavan lääkeainekandidaatin sitoutuminen kohdeproteiiniin. Kohteen validoinnissa CETSA:n avulla osoitetaan tutkittavan ligandin stabiloivan kohdeproteiinia. Optimointi vaiheessa menetelmällä vahvistetaan sitoutuminen solussa ja eliminoidaan väärät positiiviset osumat. Prekliinisessä vaiheessa CETSAa käytetään osoittamaan, että yhdiste

saavuttaa kohteensa in vivo, kun taas varhaisessa kliinisessä vaiheessa sitä voidaan soveltaa potilasnäytteisiin, lääkkeen oikean sitoutumisen varmistamiseksi ihmisessä.

CETSAlla ja sen eri variaatioilla, HT-CETSAlla, CETSA AlphaScreenillä, CETSA MS:llä ja BiTSAlla on kaikilla etunsa ja rajoitteensa (Taulukko 1).

Taulukko 1. CETSA:n detektiomenetelmät

| Detektiomenetelmä | Nopeus | Herkkyys | Toistettavuus | Automatisoitavuus |
|-----------------------|--------|----------|---------------|-------------------|
| HT-CETSA | +++ | + | +++ | +++ |
| CETSA MS | + | +++ | ++ | + |
| CETSA- AlphaScreen | +++ | ++ | +++ | +++ |
| BiTSA | ++ | +++ | +++ | ++ |

HT-CETSA mahdollistaa nopeamman toteutuksen tutkimuksille, sillä menetelmässä hyödynnetään korkeanläpimenoajan proteiinin tunnistusmenetelmiä, sekä monikaivoisia kuoppalevyjä. HT-CETSA on myös kvantitatiivisempi ja toistettavampi kuin perinteinen CETSA. Sen huonoja puolia on kallis laitteisto sekä herkkyys kokeellisille olosuhteille. CETSA AlphaScreenissä käytetään HT-CETSA:n tavoin vasta-aineita proteiinin tunnistukseen. Menetelmässä signaali saadaan suoraan luminesenssina, joka on nopea ja homogeeninen tapa. Tämän lisäksi menetelmä on HT-CETSA:n tavoin kvantitatiivisempi ja toistettavampi kuin perinteinen CETSA. AlphaScreen-menetelmän huonoja puolia ovat sen vasta-aineriippuvuus sekä kalliit reagenssit ja laitteet. Tämän lisäksi esimerkiksi fluoresenssihäiriöt tai muut tekijät vaikuttavat helposti mittausten tuloksiin. CETSA MS on laajakirjoinen menetelmä, joka mahdollistaa samanaikaisesti jopa tuhansien proteiinien stabiilisuusmuutosten havainnoinnin. Menetelmä ei vaadi vasta-aineita ja se sopii hyvin hypoteesittomaan analyysiin. Menetelmän huonoja puolia on sen hinta ja monimutkaisuus. Menetelmässä syntyy paljon tietoa ja sen tulkinta on haastavaa. Menetelmä ei ole sopiva rutiiniseulontaan eikä pienten laboratorioiden käyttöön. BiTSA on erittäin herkkä ja kvantitatiivinen menetelmä. Sen etuja on korkea läpimeno, mahdollisuus reaaliaikaisiin mittauksiin sekä menetelmä on edullisempi perusreagenssien osalta verrattuna AlphaScreeniin. Menetelmä vaatii proteiinin geenifuusiota,

joka on aikaa vievää. Tämän lisäksi menetelmä ei ole yhtä validoitu kuin AlphaScreen tai CETSA MS.

Vaikka CETSA:n eri variaatiot lisäävät CETSA-menetelmän monipuolisuutta, löytyy jokaisesta variaatiosta haasteita. Vasta-aineita hyödyntäviin menetelmiin ei välttämättä aina löydy sopivia reagensseja kaupallisesti sekä esimerkiksi BiTSA tarvitsee muokatun solu ympäristön toimiakseen. Kehittääkseen CETSA:n toimintaa monipuolisesti, on CETSAa ja sen variaatioita kehitettävä haittojen minimoimiseksi. Myös eri variaatioiden yhdistäminen mahdollisesti laajentaisi CETSA:n käyttömahdollisuuksia ja lisäisi CETSA:n käytettävyyttä lääkekehityksen parissa.

Viitteet

1. Blass, B. E. Chapter 1 - Drug discovery and development: An overview of modern methods and principles. in *Basic Principles of Drug Discovery and Development (Second Edition)* 1–41, **2021**, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817214-8.00001-4>
2. Petrauskas, V. *et al.* Thermal shift assay for protein–ligand dissociation constant determination. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 170, **2024**, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117417>
3. Tolvanen, T. A. Current Advances in CETSA. *Front Mol Biosci*, vol. 9, **2022**, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.866764>
4. Leyva-Porras, C. *et al.* Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries. *Polymers*, vol. 12, **2019**, <https://doi.org/10.3390/polym12010005>
5. Zambrano, P. *et al.* Differential scanning calorimetry in drug-membrane interactions. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 709, **2024**, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.149806>
6. Bhayani, J. A. & Ballicora, M. A. Determination of dissociation constants of protein ligands by thermal shift assay. *Biochem Biophys Res Commun* vol. 590 1–6, **2022**, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.041>
7. Henderson, M. J., Holbert, M. A., Simeonov, A. & Kallal, L. A. High-Throughput Cellular Thermal Shift Assays in Research and Drug Discovery. *SLAS Discovery* vol. 25 137–147, **2020**, <https://doi.org/10.1177/2472555219877183>
8. Seashore-Ludlow, B., Axelsson, H. & Lundbäck, T. Perspective on CETSA Literature: Toward More Quantitative Data Interpretation. *SLAS Discovery*, vol. 25 118–126, **2020**, <https://doi.org/10.1177/2472555219884524>
9. Lundgren, S. Focusing on Relevance: CETSA-Guided Medicinal Chemistry and Lead Generation. *ACS Med. Chem. Lett.* vol. 10 690–693, **2019**, <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00112>
10. Caballero, I. M. & Lundgren, S. A Shift in Thinking: Cellular Thermal Shift Assay-Enabled Drug Discovery. *ACS Med. Chem. Lett.* vol. 14 369–375, **2023**, <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.2c00545>
11. Jafari, R. *et al.* The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nat Protoc*, vol. 9 2100–2122, **2014**, <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.138>
12. Tu, Y., Tan, L., Tao, H., Li, Y. & Liu, H. CETSA and thermal proteome profiling strategies for target identification and drug discovery of natural products. *Phytomedicine*, vol. 116, **2023**, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154862>

13. Liang, Y. Y. *et al.* MS CETSA deep functional proteomics uncovers DNA repair programs leading to gemcitabine resistance. *Nature Communications*, vol. 16, **2025**, <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59505-8>
14. Ramos, A. D. *et al.* Proteome-wide CETSA reveals diverse apoptosis-inducing mechanisms converging on an initial apoptosis effector stage at the nuclear periphery. *Cell Rep*, vol. 43, **2024**, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114784>
15. Friman, T. Mass spectrometry-based Cellular Thermal Shift Assay (CETSA®) for target deconvolution in phenotypic drug discovery. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 28, **2020**, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115174>
16. Mortison, J. D. *et al.* Rapid Evaluation of Small Molecule Cellular Target Engagement with a Luminescent Thermal Shift Assay. *ACS Med. Chem. Lett.* vol. 12 1288–1294, **2021**, <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00276>