

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2017

Mari Laine

PEPTIDE BREAK -
TEKNOLOGIAN
KARAKTERISOINTI
QRET-TEKNIIKAN AVULLA

Mari Laine

PEPTIDE BREAK -TEKNOLOGIAN KARAKTERISOINTI QRET-TEKNIIKAN AVULLA

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston kemian laitoksen tutkimusryhmässä ja tarkoituksena oli karakterisoida peptide break -teknologiaa ja löytää uusia työkaluja vasta-aineettoman entsyymiaktiivisuusmenetelmän kehittämiseen. Oletuksena on, että mitä pidempi peptidi sitä suurempi affiniteetti. Peptide break -teknologia perustuu luminesenssisignaalin muutokseen, jotka johtuvat proteiinin jälkitranslaation modifikaatioista. Entsyymiaktiivisuusmenetelmän kehityksessä on hyödynnetty soluissa syntyviä leusiinivetoketjuja, jotka muodostavat kolmiulotteisen rakenteen. Tämän kolmiulotteisen rakenteen arvellaan olevan haitaksi proteiinin translaation jälkeisten modifikaatioiden tutkimisessa.

Työssä tutkittiin kahta entsyymattista reaktiota. Nämä olivat fosforylaatio sekä deasetylaatio. Karakterisoinnissa käytettiin sammutusresonanssienergiansiirtotekniikkaa (QRET). Menetelmä perustuu homogeenisessä liuoksessa olevien substraattipeptidin ja leimattun peptidin sitoutumisen havainnointiin liukoisen sammuttajan avulla. Fosforyloitunut tai asetiloitunut substraattipeptidi ei sitoudu leimattuun peptidiin, ja näin ollen leimattu peptidi on vapaana liuoksessa. Tällöin liukoinen sammuttaja pääsee vuorovaikutukseen leiman kanssa, hiljentäen signaalin. Proteiinin jälkitranslaatiomodifikaatioryhmän poiston jälkeen substraatti ja leimattu ligandi sitoutuvat toisiinsa ja tämä sitoutuminen suojaa ligandin europium-leimaa. Tällöin liukoinen sammuttaja ei pääse vuorovaikutukseen leimattun ligandin kanssa, eikä voi hiljentää signaalia, vaan mitataan korkea aikaerotteinen luminesenssi.

Tulokseksi saatiin, että leusiinivetoketjun muodostama kolmiulotteinen rakenne ei haittaa proteiinin jälkitranslaation modifikaatioiden detektointia. Pitkillä peptideillä todettiin olevan suuri sitoutumisaffiniteetti, jolloin saatiin liian matala signaalin ja taustan suhde. Affiniteetin alentamiseksi peptidejä tulisi muokata lyhyemmiksi ja vähemmän varautuneiksi. SIRT1-entsyymin konsentraatio deasetylaatioissa oli liian matala ja konsentraatiota tulisi nostaa.

ASIASANAT:

fosforylaatio, entsyymiaktiivisuus, luminesenssi, proteiini, lääkekehitys

Mari Laine

CHARACTERIZATION OF PEPTIDE BREAK TECHNOLOGY BY QRET

The thesis was carried out in a research group in the Department of Chemistry at the University of Turku. The purpose was to characterize peptide break technology and to find new tools for the development of an antibody-free enzyme activity assay. The assumption is that the longer the peptide, the greater the affinity. Peptide break technology is based on changes in the luminescence signal which are caused by post-translational modifications of the protein. Leucine zippers have been utilized in the development of the enzyme activity method. Leucine zippers are created in the cells and form a three-dimensional structure. It is thought that this three-dimensional structure is detrimental when determining post-translational modifications.

In this study, two enzymatic reactions, phosphorylation and deacetylation, were developed. In the characterization, the quenching resonance energy transfer technique (QRET) was used. The method is based on the observation of binding of the substrate peptide and the labelled peptide in homogeneous solution by the soluble quencher. The phosphorylated or acetylated peptide substrate does not bind to the labelled peptide and thus the labelled peptide remains unbound in the solution. Thus, the soluble quencher interacts with the labelled peptide and quenches the signal. After the removal of the post-translational modification of the protein, the substrate and labelled ligand bind to each other. This binding protects the europium label of the ligand. As a consequence, the soluble quencher will not interact with the labelled ligand and cannot quench the signal and a high time resolved fluorescence can be measured.

The result obtained was that the leucine zipper's three-dimensional structure does not hamper the detection of protein post-translational modifications. With long peptides, high binding affinity was observed whereby the signal/background ratio obtained was too low. To decrease the affinity, the peptides should be modified to be shorter and less charged. The concentration of the SIRT1 enzyme in the deacetylation reaction was too low and should be raised.

KEYWORDS:

phosphorylation, enzyme activity, luminescence, protein, drug development

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 PROTEIININ JÄLKITRANSLAATIO	9
2.1 Fosforylaatio	10
2.2 Deasetylaatio	11
3 LEUSIINIVETOKETJU	13
4 ANALYSOINTIMENETELMÄT	16
4.1 Vasta-aineisiin perustuvat menetelmät	16
4.1.1 Radioaktiivinen leimaus	16
4.1.2 Fluoresenssipolarisaatio	16
4.1.3 Muut määritysmenetelmät	17
4.2 QRET-tekniikka	18
4.2.1 Aikaerotteinen luminesenssi	20
5 REAKTIOIDEN AINESOSAT	21
5.1 Peptidisubstraatti	21
5.2 Entsyymi	21
5.2.1 Proteiinikinaasi A	22
5.2.2 Sirtuin 1	22
5.3 Leimattu peptidi	24
5.4 Inhibiittori	24
5.5 Sammuttaja	25
6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	26
6.1 Työn alkuvalmistelut	27
6.2 Sitoutumistestit	27
6.3 Fosforylaatioreaktio	28
6.4 Deasetylaatioreaktio	28
7 TULOKSET	30
7.1 Sitoutumistestit	30

7.2 Fosforylaatio	36
7.3 Deasetylaatio	40
8 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA	42
LÄHTEET	45

KUVAT

Kuva 1. Seriinin fosforylaatio.	10
Kuva 2. Lysiinin asetylaatio ja deasetylaatio. Muokattu lähteestä (Drazic et al. 2016)	11
Kuva 3. Leusiinivetoketjun rakenne ja kiinnittyminen DNA:han. Muokattu lähteestä (Vinson et al. 2002)	13
Kuva 4. Leusiinivetoketjun yhden heptadin dimerisaatio.	14
Kuva 5. Fluoresenssipolarisaation periaate. (Li et al. 2008)	17
Kuva 6. QRET-tekniikan periaate.	19
Kuva 7. Aikaerotteisen luminesenssin periaate.	20
Kuva 8. SIRT 1:n aktivoituminen. (Davenport et al. 2014)	23
Kuva 9. Eu-pep31:n sitoutumistesti.	31
Kuva 10. Eu-pep32:n sitoutumistesti.	32
Kuva 11. Eu-pep21:n sitoutumistesti.	33
Kuva 12. Eu-pep22:n sitoutumistesti.	34
Kuva 13. Eu-pep23:n sitoutumistesti.	35
Kuva 14. Eu-pep31:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.	36
Kuva 15. Eu-pep32:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.	37
Kuva 16. Eu-pep21:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.	38
Kuva 17. Eu-pep22:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.	39
Kuva 18. Eu-pep23:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.	40
Kuva 19. Pep9:n deasetylaatioreaktio kahdella eri entsyymillä.	41

KÄYTETYT LYHENTEET

Lyhenne	Lyhenteen selitys
bZIP	<i>Basic region ZIP</i> , leusiinivetoketju, jossa C- ja N-terminaaliset osat
cAMP	Syklinen adenosiinimonofosfaatti, osallistuu fosforylaatioon
KAT	Lyysiiniasetyylitransferaasi
MO5	Ilman fosfaattiryhmää oleva peptidisubstraatti
NAD(+)	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi, koentsyymi
P8g	Fosfaattiryhmän sisältävä peptidisubstraatti
PKA	<i>Protein kinase A</i> , proteiinikinaasi A entsyymi
pMO5	Fosfaattiryhmän sisältävä peptidisubstraatti
PTM	Protein post-translational modification, proteiinin jälktranslaatio
QRET	<i>Quenching resonance energy transfer</i> , sammutusresonanssienergiansiirtotekniikka
TRL	<i>Time-resolved luminescence</i> , aikaerotteinen luminesenssi
ZIP	<i>Leucine zipper</i> , leusiinivetoketju, jossa joka seitsemäs aminohappo leusiini

1 JOHDANTO

Opinnäytetyössä karakterisoidaan määritysmenetelmää lääkeaineiden tehoseulontaan. Työn tarkoituksena on Turun yliopistolla kehitetyn QRET-tekniikan avulla karakterisoida peptide break -teknologiaa. Peptide break -teknologia perustuu luminesenssisignaalin muutoksiin, jotka johtuvat proteiinin jälkitranslaation modifikaatioista. Nämä modifikaatiot saavat aikaan peptidien keskinäisten vuorovaikutusten vähenemisen. Menetelmän kehityksessä on hyödynnetty leusiinivetoketjuja, jotka muodostavat kolmiulotteisen rakenteen. Tämän rakenteen arvellaan olevan haitaksi analyysissä ja tästä syystä tehdään peptide break -teknologian karakterisointi. Samalla on tarkoitus etsiä uusi peptidejä, joita voidaan hyödyntää menetelmän kehityksessä. Käytettävistä peptideistä oletuksena on, että mitä pidempi peptidi, sitä suurempi sitoutumisaffiniteetti. Työ suoritettiin Turun yliopiston tutkimusprojektissa, jonka tarkoituksena on kehittää lääkeainekehitykseen vasta-aineettomia menetelmiä proteiinitranslaation jälkeisiä muokkauksia varten.

Proteiinin translaation jälkeisiä muokkauksia ohjaavat solun sisäiset entsyymit. Entsyymit muokkaavat proteiineja kovalenttisesti muuttaen proteiinin ominaisuuksia. Muokkaukset vaikuttavat proteiinien väliseen vuorovaikutukseen ja solun aktiivisuuteen. Mikäli yhdessä proteiinissa tapahtuu useita muokkauksia tai muokkausten tekeminen ei onnistu, voi seurauksena olla jokin sairaus, kuten esimerkiksi diabetes tai syöpä. Lääkekehityksessä on tutkittu paljon entsyymien toimintaa ja niiden yhteyttä erilaisiin sairauksiin. Entsyymien toimintaa säätelevät inhibiittorit ja lääkealalla tutkitaan koko ajan, kuinka inhibiittoreita voitaisiin hyödyntää erilaisten sairauksien hoidossa. Tähän tutkimukseen he tarvitsevat helppokäyttöisiä, tehoseulontaan soveltuvia ja korkean herkkyuden omaavia työkaluja, joilla inhibiittorien sekä entsyymien toimintaa voidaan tutkia. (Acker & Auld 2014; Thangavelu *et al.* 2017)

Nykyiset olemassa olevat määritysmenetelmät perustuvat vasta-aineiden käyttöön ja useimmiten vaativat useamman leimatun molekyylin analyysissä. Kaikkien proteiinin jälkitranslaatioiden muokkausten seulontaa varten tulee tuottaa useita eri vasta-aineita, koska vasta-aineet ovat spesifisiä modifioitavalle aminohapolle. Vasta-aineiden tuottaminen on kallista ja hidasta. Ideaalisen entsyymiaktiivisuusmenetelmän tulisi olla homogeeninen, soveltua lääkeaineiden tehoseulontaan, omata korkea herkkyys ja olla

vasta-aineeton eli edullisempi kuin nykyiset menetelmät. Opinnäytetyössä karakterisoi-tava entsyymiaktiivisuusmenetelmä on homogeeninen, ei vaadi vasta-aineita, leimata tarvitsee vain yksi molekyyli sekä on yksinkertainen ja omaa korkean herkkyuden.

Työ aloitettiin peptidien leimauksella, jonka jälkeen ne puhdistettiin käyttäen HPLC-lai-tetta. Tämän jälkeen jokaiselle leimatulle peptidille suoritettiin sitoutumistestit, jotta saa-tiin selville suurimman affiniteetin omaavat peptidisubstraatit. Lopuksi peptidisubstraat-tien ja leimattujen peptidien sitoutumista testattiin fosforylaatio- sekä deasetylaatioreak-tioissa.

2 PROTEIININ JÄLKITRANSLAATIO

Polypeptidiketjun muodostumisessa on kaksi päävaihetta. Ensimmäinen vaihe on tuomassa tapahtuva transkriptio, jossa DNA-templaattia käyttäen valmistetaan yksittäiselle DNA-juosteelle komplementaarinen lähetti-RNA-molekyyli. Toinen vaihe on soluliman ribosomissa tapahtuva translaatio, jossa lähetti-RNA:n emäsjärjestys käännetään vastamaan kunkin kodonin vastin aminohappoa. Translaation edetessä loppuun polypeptidiketju alkaa laskostua proteiineille tyypillisesti ja useimmiten proteiineja muokataan vielä laskostumisen jälkeen, jolloin puhutaan proteiinin jälkitranslaatiosta. (Heino & Vuento 2014)

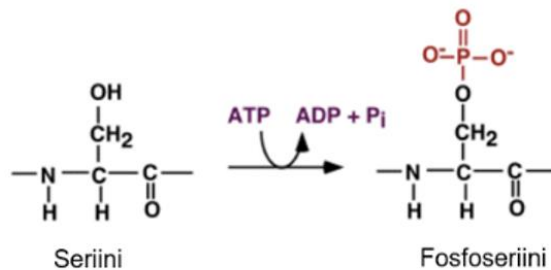
Proteiinin elinkaaren aikana proteiinitranslaation jälkeisiä muokkauksia (PTM, *protein post-translational modification*) voi tapahtua missä tahansa vaiheessa ja niitä voi olla useampi. Proteiineja voidaan muokata heti translaation jälkeen endoplasmakalvostossa tai hieman myöhemmin Golgin laitteessa sekä kalvorakkuloissa. Solunsisäiset entsyymit ohjaavat proteiinitranslaation jälkeisiä muokkauksia, jotka ovat yksi tärkeimpiä säätelymekanismeja solujen välisissä signaaleissa. Muokkaukset ovat sarja kovalenttisia muutoksia, jotka vaikuttavat proteiinin ominaisuuksiin ja kohdistuvat proteiiniketjun peptididoksiin tai aminohappojen sivuketjuihin, joko lisäten tai poistaen jonkin funktionaalisen ryhmän. Proteiinitranslaation jälkeisiä muokkauksia ovat esimerkiksi asetyyli ryhmän lisääminen lysiinin aminoryhmään, fosfaattiryhmän lisääminen arginiiniin, tyrosiiniin tai seriiniin hydroksyyli ryhmään, glykaanien kiinnittäminen seriiniin tai treoniiniin hydroksyyli ryhmään, metyyli ryhmän lisääminen asparagiinihapon karboksyyli ryhmään tai lysiiniin aminoryhmään. PTM:t säätelävät solujen aktiivisuutta ja ovat avainasemassa monissa soluprosesseissa kuten solujen erilaistumisessa, proteiinien hajoamisessa, DNA:n korjauksessa, geenien ilmentymisessä ja solun aineenvaihdunnassa. Proteiinit joissa on tapahtunut jälkitranslaatiollisia muokkauksia, on havaittu olevan osallisena monen taudin syntyn, kuten diabetes, MS-tauti, erilaiset syövät ja aineenvaihdunnan häiriöt. Tästä syystä lääkekehityksessä on tärkeää pystyä kontrolloimaan entsyymien inhibointia sekä aktiivointia. (Grotenbreg & Ploegh 2007; Karve & Cheema 2011; Thermo Fisher Scientific 2017)

Yleisimmät proteiinitranslaation jälkeiset muokkaukset suuntautuvat aminohappojen hydroksyyli- sekä aminoryhmiin. Opinnäytetyössä tutkittiin fosfaattiryhmän siirtämistä se-

riinin hydroksyyliiryhmään eli fosforylaatiota. Toinen tutkimuskohde oli lysiinin aminoryhmään liitetyn asetyyliiryhmän poisto eli deasetylaatio. Molemmista jälkitranslaatiollisista muokkauksista on kerrottu tarkemmin tässä kappaleessa.

2.1 Fosforylaatio

Fosfaattiryhmän lisäämistä OH-ryhmään kutsutaan fosforylaatioksi, joka on yksi tärkeimmistä proteiinintranslaation jälkeisistä muokkauksista. Fosfaatin lisääminen hydroksyyliiryhmään voi joko inaktivoida tai aktivoida proteiinin, johtuen proteiinin muuttuneesta konformaatiosta. (Cieśła *et al.* 2011)



Kuva 1. Seriinin fosforylaatio.

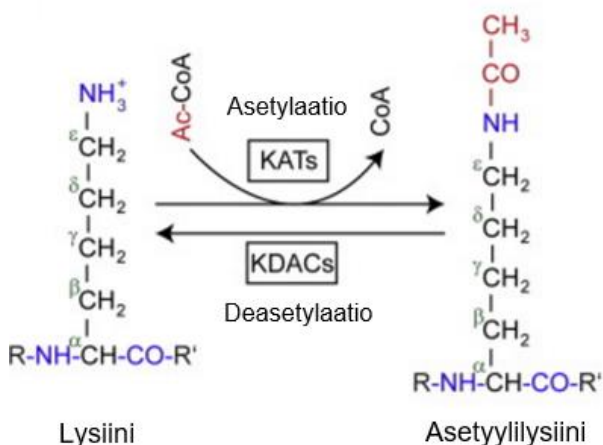
Aminohapossa on nukleofiilinen OH-ryhmä (Kuva1) johon kiinnittyy adenosiinitrifosfaattista (ATP) kinaasien toimesta irrotettu negatiivisen varauksen omaava fosfaattiryhmä ($\gamma\text{-PO}_3^{2-}$). Siirtoa avustaa magnesium (Mg^{2+}), joka tehostaa sitoutumisaffiniteettia (Yu, *et al.*, 2011). Fosforylaatio muuttaa peptidin varausta, koska siihen lisätään negatiivinen fosfaattiryhmä. Yksi fosfaattiryhmä tuo peptidiin kaksi negatiivista varausta, jolloin varaus muuttuu esim. $+10 \rightarrow +8$. Fosfaatti-fosfaatti sidoksen katketessa vapautuu suuri määrä energiaa, josta johtuen reaktio on yksisuuntainen. Fosforylaation vastareaktio on defosforylaatio, jossa fosfataasientsyymi siirtää fosfaattiryhmän pois aminohappoketjusta. (Thermo Fisher Scientific 2017; Yu *et al.* 2011)

Ihmisen proteiineista noin kolmasosa fosforyloidaan kinaasien toimesta. Yli 500 proteiinikinaasigeeniä sekä n. 150 proteiinifosfataasigeeniä on löydetty ihmisen genomista. Fosforylaatio on osallisena melkein kaikissa solun elämään vaikuttavissa osa-alueissa, kuten esimerkiksi transkriptio, erilaistuminen, apoptoosi, solun liikkuminen, solusyklin säätely, solunsisäinen sekä solujen välinen viestintä. Tästä johtuen fosforylaatio on myös osallisena monen taudin synnyssä. Tautien ehkäisemisen kannalta on ensisijaisen tärkeää pyrkiä seulomaan haitalliset muokkaukset proteiineista sekä kontrolloimaan entsyymien toimintaa. (Thermo Fischer Scientific 2017; Jiang *et al.* 2008; Johnson 2009)

Vuonna 2014 tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että MARCKS-proteiinin fosforylaation korkea aktiivisuus korreloi pitkälle edennyttä keuhkosityöpää. Mikäli tämä fosforylaatio saataisiin inhiboitua, voisi olla mahdollista kontrolloida keuhkosityövän etenemistä. (Chen *et al.* 2014)

2.2 Deasetylaatio

Proteiinitranslaation jälkeisessä muokkauksessa, jossa asetyyliryhmä lisätään lysiinin aminoryhmään, kutsutaan asetylaatioksi. Suurin osa ihmisen proteiinien asetylaatiosta (80-90 %) tapahtuu translaation yhteydessä niin sanottuna N^α-terminaalissa asetylaatiossa. Reaktiota katalysoivat N-terminaali-asetyylitransferaasit (NATs). Viime vuosina on kuitenkin havaittu, että N-terminaalisia muutoksia tapahtuu myös proteiinitranslaation jälkeisissä muokkauksissa. Tämä osoittaa, että N-terminaalinen asetylaatio on osa monimutkaisempaa järjestelmää kuin on aiemmin luultu. (Drazic *et al.* 2016)



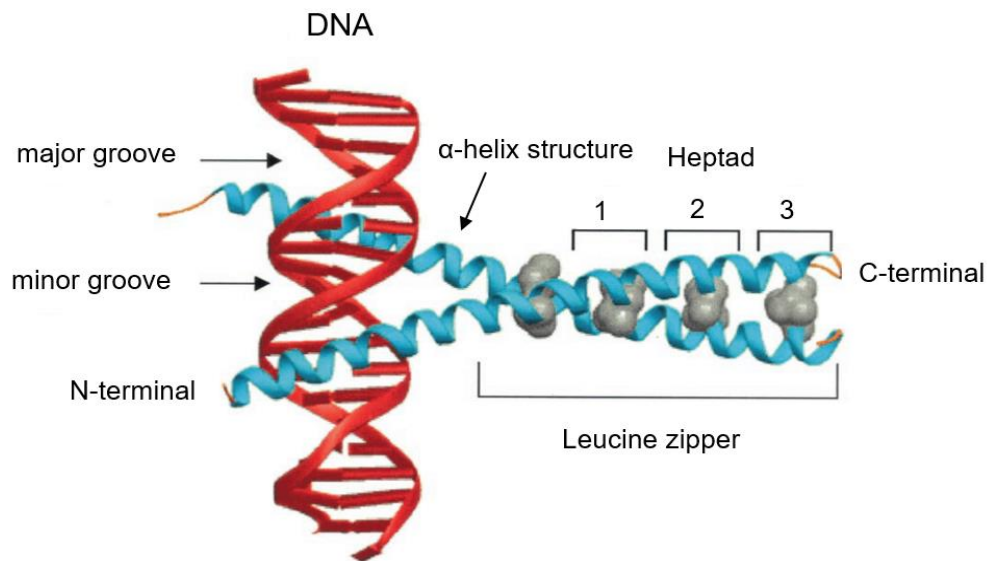
Kuva 2. Lysiinin asetylaatio ja deasetylaatio. Muokattu lähteestä (Drazic *et al.* 2016)

Toinen tunnettu proteiinin asetylaatio tapahtuu lysiinin ϵ -aminoryhmässä (Kuva 2). Lysiinin asetylaatioissa lysyiiniasetyylitransferaasi (KAT) siirtää asetyyliryhmän ($-\text{CH}_3\text{CO}$) asetyylikoentsyymi A:lta lysiinin N^ϵ -terminaalisen pään amiiniin muuttaen lysiinin varausta vähemmän positiiviseksi. Fosforylaation tapaan asetylaatio muuttaa proteiinin rakennetta sekä varausta ja voi joko aktivoida tai inaktivoida proteiinin. Asetylaatioissa peptidiin lisätään yksi negatiivinen ryhmä, joka neutralisoi lysiinin positiivisen varauksen. Reaktio on reversiibeli ja vastareaktiota kutsutaan deasetylaatioksi, joka oli opinnäytetyön toinen tutkimuskohde. Deasetylaatioissa koentsyymien aktivoima lysiinideasetylaasi (KDAC) irrottaa asetaattiryhmän lysiinin ϵ -terminaalisisesta amiinista. Deasetylaatio inaktivoi proteiinin muokkaamalla sen rakennetta. Molemmat reaktiot ovat tärkeä osa geenin säätelyä, erityisesti kromatiiniin perustuvan transkription säätelyssä. (Drazic *et al.* 2016)

Tyypin 2 diabeteksen synnyn perustana on metabolisen oireyhtymän ilmentyminen, jonka yksi oire on luurankoli hasten insuliiniresistenssi. Tällöin insuliinin vaikutus kudoksiin on heikentynyt. Tutkimuksissa on huomattu, että tyypin 2 diabeetikoiden lihaksissa on alentunut SIRT1-entsyymien aktiivisuus, joka saattaa edesauttaa insuliiniresistenssin syntyä, koska entsyymi on luurankoli hasten aineenvaihdunnan keskeisin säätelijä. SIRT1-entsyymi on deasetylaasi, joka irrottaa asetaattiryhmän lysyiinistä. Insuliiniresistivisyyden hoidossa tärkeää olisi aktivoida SIRT1-entsyymi, joka voisi parantaa insuliiniherkkyyttä. (Cao *et al.* 2016)

3 LEUSIINIVETOKETJU

Opinnäytetyössä tutkittiin proteiinin jälkitranslaation jälkeisiä muutoksia leusiinivetoketjuissa (ZIP, *leucine zipper*), jotka kuuluvat ns. transkriptiotekijöiden superperheeseen. Leusiinivetoketju muodostuu kahdesta α -helikaalisessa konformaatioissa olevasta proteiinista, jotka ovat dimerisoituneet eli pariutuneet. α -helikaalisessa konformaatioissa proteiinin hydrofobiset aminohapot jäävät negatiivisesti varautuneiden sivuryhmien muodostaman hydrofiilisen ulkokuoren sisään. Näin α -heliksin sisään on muodostunut hydrofobinen ydin, joka mahdollistaa leusiinivetoketjurakenteen. Muodostuva rakenne on kolmiulotteinen ja sitä kutsutaan kierteinen-kierre-rakenteeksi (*coiled coil*). Molempien proteiinien aminohappojärjestyksessä joka seitsemäs aminohappo on leusiini ja kun nämä proteiinit yhdistyvät, muodostuu leusiinivetoketju. Leusiinit muodostavat välilleen heikkoja vuorovaikutuksia. (Hakoshima 2014; Krylov & Vinson 2001)



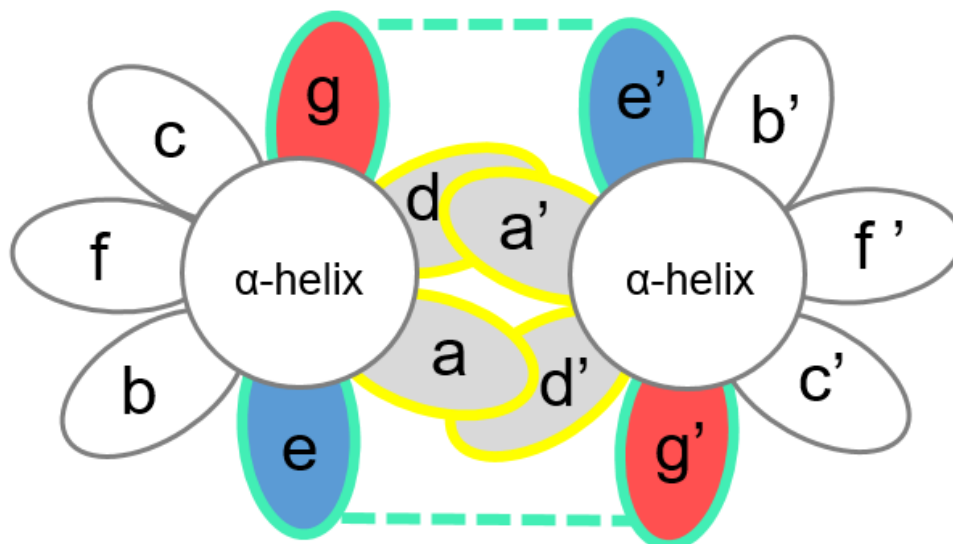
Kuva 3. Leusiinivetoketjun rakenne ja kiinnittyminen DNA:han. Muokattu lähteestä (Vinson *et al.* 2002)

Vetoketjun rakenne koostuu C-terminaalisesta osasta (Kuva 3), jossa sijaitsee leusiinivetoketju sekä N-terminaalisesta osasta, jossa sijaitsee positiivisesti varautuneet arginiini ja lysyiini. N-terminaalia kutsutaan nimellä emäksinen alue (*basic region*). Emäksinen alue kiinnittyy negatiivisesti varautuneen DNA:n suuremman uurteen (*major groove*) fos-

faattiryhmiin ja muodostunut rakenne muistuttaa saksia. Kiinnittyessään DNA:han leusiinivetoketju joko aktivoi tai inaktivoi geenin transkription. (Hakoshima 2014; Krylov & Vinson 2001)

Monissa eukaryoottien geenien säätelyproteiineissa on useimmiten C-terminaalinen leusiinivetoketju sekä N-terminaalinen emäksinen osa, joka kiinnittyy DNA:han. Tällöin puhutaan bZIP (bZIP, *basic region* ZIP) -luokan transkriptiotekijöistä. (Krylov & Vinson 2001)

Ihmisestä on löydetty 53 uniikkia bZIP-domeenia. Näiden domeenien dimerisaatio-osa, C-terminaali, voi muodostaa joko heterodimeerisen tai homodimeerisen rakenteen. Tämä riippuu C-terminaalien keskenään vuorovaikuttavien aminohappojen varauksista. (Vinson *et al.* 2002)



Kuva 4. Leusiinivetoketjun yhden heptadin dimerisaatio.

Kuvassa 4 on esitetty leusiinivetoketjun rakenteen aminohappojen järjestys, katsottuna N-terminaalista päästä kohti C-terminaalista päätä. Keltainen alue, johon kuuluu a, d, a' sekä d' muodostavat hydrofobisen ytimen. Kohdissa d/d' sijaitsee leusiini ja a/a' kohdassa vaihdellen joko asparagiini, jolla on taipumusta olla vuorovaikutuksessa toisen asparagiinin kanssa ja muodostaa homodimeeri, tai lysiini ja seriini, joilla on taipumusta muodostaa heterodimeeri eli a aminohappo on eri kuin kohdassa a' oleva aminohappo. Leusiinivetoketjussa hydrofobinen ydin on välttämätön dimerisaation pysyvyyden kannalta. (Hakoshima 2014; Vinson *et al.* 2002)

Vihreällä kuvatut aminohapot ovat varauksellisia aminohappoja ja kuvassa 4 g monomeeri tuottaa elektrostaattisia voimia e' monomeerin kanssa kuten myös e tuottaa g' kanssa. Nämä elektrostaattiset voimat vakauttavat leusiinivetoketjua, koska hydrofobisessa kuoressa olevat leusiinit muodostavat vain heikkoja vuorovaikutuksia. Varauksellisilla aminohapoilla on myös vaikutusta dimerisaation spesifisyyteen. Suurin osa ihmisen bZIP proteiinien g, e, g' ja e' kohdista muodostuvat joko arginiinistä, lysiinistä, glutamiinihaposta tai glutamiinista. Tyypillisin pari on glutamiinihappo kohdassa g ja joko lysiini tai arginiini kohdassa e'. Monomeerit, jotka on kuvassa jätetty valkoiseksi (c, f, b, c', f' ja b') luovat hydrofiilisen pinnan leusiinivetoketjulle. (Hakoshima 2014; Vinson *et al.* 2002)

4 ANALYSOINTIMENETELMÄT

Suurin osa nykyisistä proteiinin jälkitranslaation määrittymenetelmistä perustuu vasta-aineiden käyttöön. Opinnäytetyössä kehitetään vasta-aineetonta määrittystä proteiinien jälkitranslaation modifikaatioiden detektointiin. Tässä kappaleessa esitellään lyhyesti muutama nykyinen määrittymenetelmä, sekä lopuksi kehitettävä QRET-menetelmä.

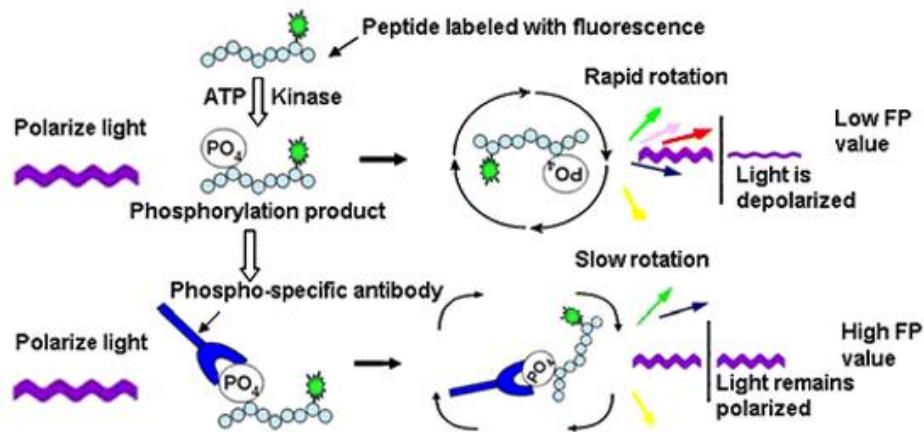
4.1 Vasta-aineisiin perustuvat menetelmät

4.1.1 Radioaktiivinen leimaus

Perinteisesti määrittymenetelmässä käytetään radioaktiivisia leimoja. Entsymaattisissa reaktioissa radioaktiivinen leima, P^{32} , on useimmiten fosforylaatiossa ATP:n y-fosfaatissa, jonka entsyymi siirtää proteiinin hydroksyyliin. Asetyylaatioissa taas vastavasti asetyylikoentsyymi a:n asetaattiryhmässä, joka siirretään proteiinin aminoryhmän jatkoksi. Lisäksi reaktiossa on vasta-aine, joka on spesifinen siirrettävälle funktionaaliselle ryhmälle. Radioaktiivinen leima ei juurikaan vaikuta entsyymin aktiivisuuteen tai leimatun molekyylin rakenteeseen ja sen etuna on matala taustasignaali. Tehoseulontaan radioaktiiviset leimat eivät ole paras mahdollinen menetelmä, johtuen määrittymen heterogeenisyydestä. Heterogeeninen analyysi vaatii useita välivaiheita kuten esim. pesuja, jotka hidastavat analyysin tekemistä. Myöskin radioaktiivisen materiaalin hävitys on hankalaa ja leimatulla ligandilla on suhteellisen lyhyt puoliintumisaika. P^{32} :n puoliintumisaika on vain 14 päivää. (Chen & Chen 2015; Tong-Ochoa *et al.* 2015)

4.1.2 Fluoresenssipolarisaatio

Radioaktiivisen leimauksen tilalla käytetään nykyisin fluoresenssiin perustuvia määrittymenetelmiä. Yksi tällaisista menetelmistä on fluoresenssipolarisaatio (FP, *fluorescence polarization*). Menetelmä on tekniikka, jossa pienillä (<10,000 Da) molekyyileillä ja suurilla molekyyileillä (>10,000 Da) on erilaiset fluoresenssin rotaatio-ominaisuudet.



Kuva 5. Fluoresenssipolarisaation periaate. (Li *et al.* 2008)

Menetelmässä peptidi on leimattu fluoresoivalla (Kuva 5) molekyylillä. Peptidiin liitetään entsyymien toimesta funktionaalinen ryhmä, jolloin funktionaaliselle ryhmälle spesifinen vasta-aine sitoutuu liitettyyn ryhmään. Tämä saa aikaan sen, että molekyylin koko kasvaa ja sen rotaatio hidastuu, jolloin saadaan vaakatasossa mitatuksi korkea fluoresenssipolarisaatio. Valo on polarisoitunutta, kun sen sähkökentän värähtely tapahtuu vain yhteen suuntaan. Ilman vasta-aineen kiinnittymistä molekyylin koko on niin pieni, että rotaatio on nopeaa, jolloin valo on polarisoimatonta eli valon sähkökenttä värähtelee kaikissa suunnissa. FP:n etuja ovat homogeenisuus, soveltuvuus tehoseulontaan sekä edullisuus verrattuna radioaktiiviseen leimaukseen. Menetelmän haittapuolina ovat soveltuvuus vain pienille molekyyleille kuten peptideille, sekä yhteen analyysiin tarvittavan spesifisen vasta-aineen korkea määrä. Myöskin menetelmän herkkyys sekä signaalin ja taustan suhde ovat rajalliset. (Li *et al.* 2008)

4.1.3 Muut määritysmenetelmät

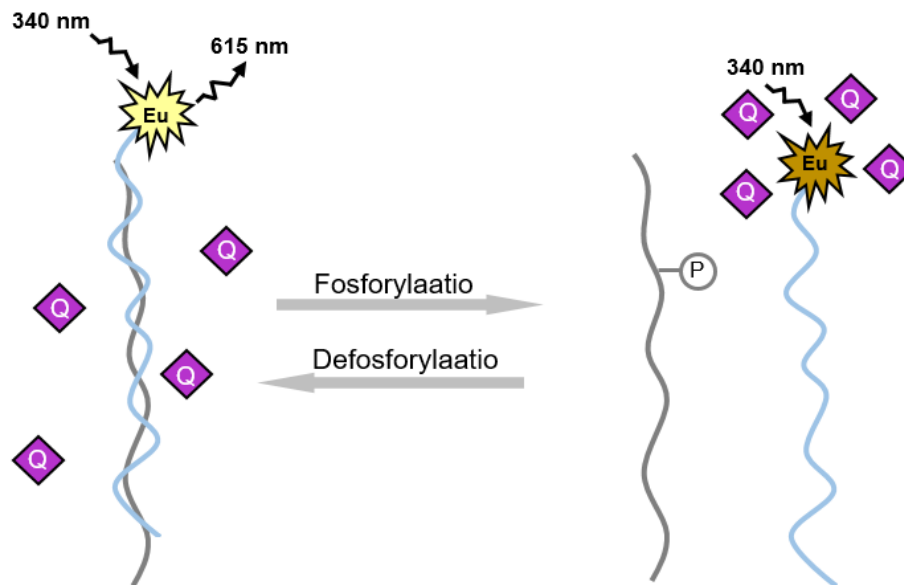
Muita käytettyjä menetelmiä on esim. LANCE *Ultra* -määritysmenetelmä, jossa käytetään europium-leimattua vasta-ainetta sekä *ULight* -leimattua peptidisubstraattia. *ULight* on PerkinElmerin kehittämä pieni ja kirkas punainen leima, joka soveltuu erikokoisten molekyylien suoraan leimaukseen. Leima on kooltaan enintään noin 800 Daltonia. *ULight* omaa hydrofiilisen luonteen, joten sillä on minimaalinen vaikutus leimatun molekyylin liukoisuuteen.

Vasta-aine sitoutuu spesifisesti peptidiin lisättyyn funktionaaliseen ryhmään. Substraattissa oleva leima on ns. vastaanottaja kun taas vasta-aineen leima on luovuttaja, tapahtumaa kutsutaan fluoresenssin resonanssienergian siirroksi (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*). Näiden leimojen välillä tapahtuu siis energiansiirtoa, kun europium siirtää eksitaatioenergiansa vastaanottajalle eli substraatin leimalle joka emittoi, jolloin voidaan mitata luminesenssi 665 nm aallonpituudella. Menetelmän etuina ovat homogeenisyys ja hyvä soveltuvuus tehoseulontaan. Haittana on leimojen etäisyys toisistaan. (Kopra & Härmä 2015; PerkinElmer 2017)

Useimmat analyysitekniikat perustuvat joko fluoresenssin resonanssienergian siirron tai aikaerotteisen fluoresenssin resonanssienergian siirron (TR-FRET, *time-resolved fluorescence resonance energy transfer*) käyttöön.

4.2 QRET-tekniikka

Opinnäytetyössä analysointimenetelmänä käytettiin Turun yliopistolla kehitettyä sammutusresonanssienergiansiirtotekniikkaa (QRET, *Quenching resonance energy transfer*). Menetelmä perustuu homogeenisessä liuoksessa olevien kohdemolekyylin ja lantanidikelaatilla (esim. Eu^{3+}) leimatun ligandimolekyylin sitoutumisen havainnointiin liukoisen sammuttajan avulla. Leimatun ligandin ollessa vapaana liuoksessa lantanidikelaatin ja liukoisen sammuttajan vuorovaikutus kasvaa, jolloin havaitaan matala aikaerotteinen luminesenssi (TRL, *time-resolved luminescence*) signaali. Ligandin sitoutuminen kohdemolekyylin kanssa suojaa kelaattia (Eu^{3+}) sammuttajalta, näin ollen sammuttajan ja ligandimolekyylin vuorovaikutus vähenee sekä etäisyys kasvaa, tällöin saadaan korkea signaali mitattaessa aikaerotteista luminesenssia. (Kopra & Härmä 2015)



Kuva 6. QRET-tekniikan periaate.

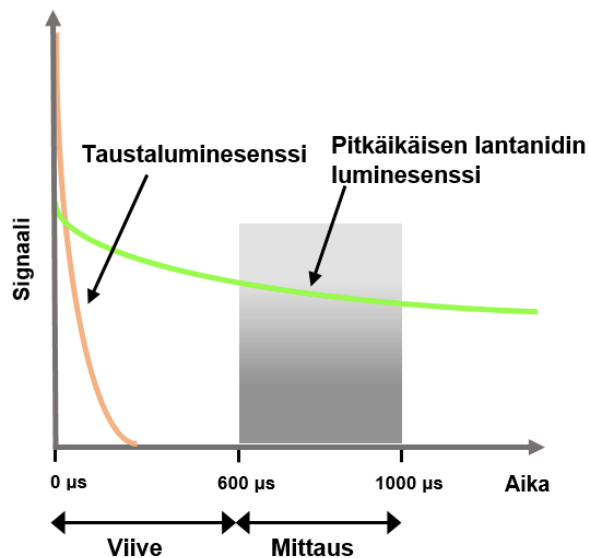
Kuvassa 6 on havainnollistettu kuinka opinnäytetyössä hyödynnettiin QRET-tekniikkaa. Peptidisubstraatissa eli kohdemolekyylissä (kuvassa vasemmalla) ei ole fosfaattiryhmää, jolloin europium-leimattu peptidi voi sitoutua kohdemolekyyliin. Sitoutuminen suo- jaa europiumia ja sammuttaja (Q) ei pääse hiljentämään sen luminesenssia, tällöin ha- vaitaan korkea TRL-signaali. Ensyymien katalysoimassa fosforylaatiossa pepti- disubstraattiin liitetään fosfaattiryhmä, joka estää europium-leimatun peptidin sitoutumi- sen kohdemolekyyliin. Leimattu peptidi on nyt vapaana liuoksessa ja sammuttaja (Q) pääsee läheiseen vuorovaikutukseen tämän kanssa sammuttaen signaalin, jolloin mita- taan matala TRL-signaali. Opinnäytetyössä tutkittiin myös deasetylaatiota, jossa käytet- tiin tätä samaa periaatetta. Deasetylaatioissa fosfaattiryhmän tilalla peptidisubstraatissa on asetyyliryhmä.

Leimattuna ligandina voidaan käyttää mitä vain pientä molekyyliä jonka voi leimata, ku- ten esimerkiksi peptidi, DNA:n fragmentti tai nukleotidi. Sammuttajaksi voidaan periaat- teessa valita mikä vain luminofori, jonka absorptiospektrillä on päällekkäisyyttä lantani- dikelaatin (Eu^{3+}) emissiospektrin kanssa. (Kopra & Härmä 2015)

Verrattuna muihin tekniikoihin, QRET-tekniikassa ei tarvita vasta-aineita ja leimata tar- vitsee vain yksi reaktioliuoksessa oleva molekyyli. Menetelmän etuja ovat nopeus, kor- kea herkkyys ja edullisuus.

4.2.1 Aikaerotteinen luminesenssi

Mittaustekniikassa haluttu signaali on saatu erotettua häiritsevistä taustasignaaleista käyttämällä pitkäikäisiä luminiforeja, joiden avulla varsinainen mittaus voidaan suorittaa viiveen jälkeen. Taustasignaalia aiheuttavat mm. käytettävän kuoppalevyn materiaali sekä erilaiset biologiset yhdisteet ja proteiinit. Signaalin tyypillinen elinikä on pikosekunnista nanosekuntiin. Useimmiten pitkäikäisinä luminiforeina käytetään lantanideja, joiden signaalin elinikä on 0,2-1,5 millisekuntia. (Handl & Gillies 2005)



Kuva 7. Aikaerotteisen luminesenssin periaate.

Aikaerotteisessa luminesenssimittauksessa fluoresoivat molekyylit aluksi absorboivat energiaa tietyllä eksitaatio aallonpituudella eli virittyvät. Tämän jälkeen tulee lyhyt viive, jolloin taustafluoresenssi hiipuu, jonka jälkeen voidaan suorittaa varsinainen mittaus (Kuva 7). (Handl & Gillies 2005)

5 REAKTIOIDEN AINESOSAT

Opinnäytetyössä tehtiin kaksi entsyymaattista reaktiota, fosforylaatio sekä deasetylaatio. Tässä kappaleessa käsitellään tarkemmin molempien reaktioiden ainesosien toimintaperiaatetta.

5.1 Peptidisubstraatti

Työssä käytettiin peptidisubstraatteina pMO5, MO5 ja P8g. pMO5 ja MO5 ovat muuten samanlaisia, mutta ensimmäinen on synteettisesti fosforyloitu. P8g ja MO5 ovat sekvenssiltään samanlaisia, ainoa ero on, että P8g:ssä on tyrosiini aminohappojen tilalla seriini. Parhaan affiniteetin saavuttamiseksi substraattien sekvenssejä on muutettu.

5.2 Entsyymi

Rakenteellisesti entsyymit koostuvat suurikokoisesta proteiiniolosuhteesta eli apoentsyymistä, joka määrittää entsyymin spesifisyyden. Joissakin tapauksissa entsyymin aktiivisuuden aktivoituminen vaatii kofaktorimolekyylin kiinnittymisen apoentsyymiin reaktion ajaksi. Entsyymien aktiivinen kohta sijaitsee apoentsyymissä, joka on spesifinen vain tietyille substraattimolekyyleille. Tämä tarkoittaa sitä, että kukin entsyymi katalysoi vain tarkoin määrättyä reaktiota ja hyväksyvät vain tietyn rakenteen omaavia substraatteja. Molekyylin kiinnittyminen entsyymien aktiiviseen kohtaan saa aikaan reaktion katalysoinnin, jolloin koko kompleksi voi toimia katalyyttinä tai substraatti on muuttunut tuotteeksi ja irtaantuu entsyymistä. (Alberts *et al.* 2014; Heino & Vuento 2014)

Entsyymit toimivat biokatalyytteinä elimistön aineenvaihduntareaktioissa. Ne alentavat reaktion aktivaatioenergiaa muuttamatta reaktion tasapainoa, toisin sanoen entsyymit siis edesauttavat kemiallisten reaktioiden käynnistymistä. Ilman entsyymejä reaktiot olisivat soluissa liian hitaita, mikä tekisi elämästä mahdotonta.

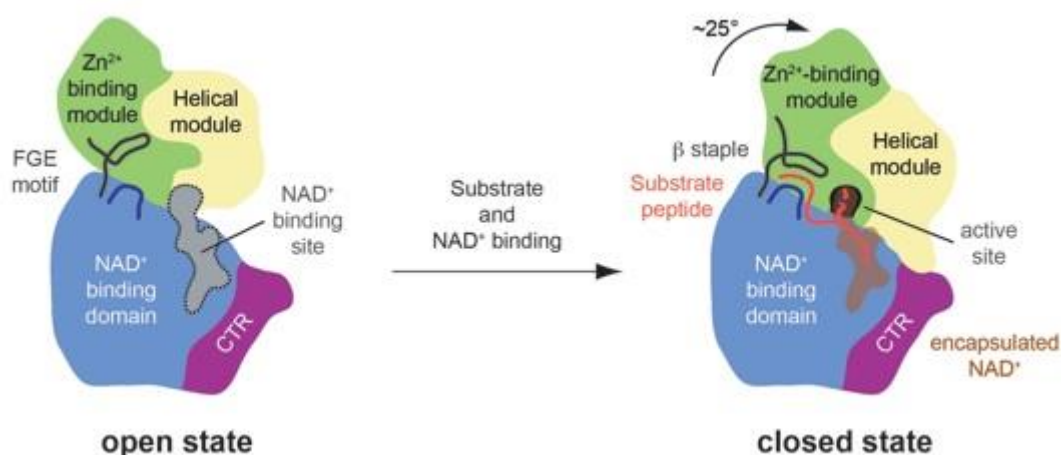
5.2.1 Proteiinikinaasi A

Fosforylaatioreaktiossa fosfaattiryhmän siirtämiseen käytettiin proteiinikinaasi A entsyymiä (PKA, *protein kinase a*), joka aktivoituu kohonneesta syklisen adenosinimonofosfaatin (cAMP, *cyclic AMP*) pitoisuudesta. Rakenteeltaan PKA on tetrameeri ja koostuu siis neljästä alayksiköstä. Kaksi näistä alayksiköistä ovat entsyymin säätely-yksiköitä, joihin cAMP-molekyylit kiinnittyvät ja toiset kaksi alayksikköä ovat katalyyttisiä-yksiköitä, joissa entsyymin aktiivinen alue sijaitsee. Neljän cAMP-molekyylin kiinnittyessä säätely-yksiköihin entsyymin konformaatio muuttuu ja aktivoituneet katalyyttiset-yksiköt irtoavat. Vapautuneisiin yksiköihin kiinnittyy ATP, jolta entsyymi siirtää fosfaattiryhmän proteiinin hydroksyyliiryhmän jatkoksi ja näin proteiini on fosforyloitu, ja ATP on muuttunut ADP:si. (Cheung *et al.* 2015; Turnham & Scott 2016)

Proteiinikinaasi A entsyymi osallistuu kriittisiin soluprosesseihin kuten geenien ilmentymiseen, solujen lisääntymiseen ja aineenvaihduntaan. Mutatoituneen entsyymin aktiivisuus voi aiheuttaa mm. Cushingin oireyhtymän, joka on munuaisten häiriö, jossa lisämunuaiset tuottavat liikaa kortisolia. Liiallinen kortisoli vaikuttaa aineenvaihduntaan ja altistaa näin lisäsairauksille, kuten tyypin 2 diabetekselle ja osteoporoosille. (Cheung *et al.* 2015; Turnham & Scott 2016)

5.2.2 Sirtuin 1

Deasetylaatiossa entsyyminä käytettiin histonideasetylaasientsyymien (HDAC) ryhmään kuuluvaa HDAC3:ta sekä Sirtuin 1 tyyppiä, joka on nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (NAD⁺) koentsyymistä riippuvainen entsyymi.



Kuva 8. SIRT 1:n aktivoituminen. (Davenport *et al.* 2014)

Kuvassa 8 on havainnollistettu Sirtuin 1:n rakenne. Entsyymän aktiivinen alue sijaitsee NAD(+) sitoutumisdomeenin, sinkin sitoutumismoduulin ja helikaalisen moduulin rajapinnalla. Peptidisubstraatin asetyloitunut lysiini ja NAD(+) sitoutuvat tämän aktiivisen alueen vastakkaisille puolille kuvassa oikealla ja koentsyymi ikään kuin suljetaan rakenteen sisään taskuun. Tällöin entsyymän rakenne on muuttunut. Asetyloidun lysiinin ja NAD(+):n välille muodostuu hydrofobinen tunneli (punainen viiva kuvassa), jolloin yhdisteet ovat läheisessä vuorovaikutuksessa keskenään. Yhdiste hydrolysoituu ja kiinnittynyt lysiini ilman asetaattiryhmää irtoaa entsyymistä. (Davenport *et al.* 2014; Gertz *et al.* 2013)

Sirtuin 1 -entsyymi on osallisena mm. ikääntymisessä, solujen välisessä viestinnässä, apoptoosissa ja solujen kasvussa. Hallitsematon geenien säätely voi aiheuttaa esim. aiemmin kappaleessa 2.2 mainitun diabeteksen lisäksi myös syövän. Syöpäsolut kasvavat hallitsemattomasti eli soluilta puuttuu kontakti-inhibiatio, joka pysäyttää solujen kasvun kun solut ovat läheisessä kontaktissa toisten solujen kanssa tai solunulkoisen aineen kanssa. SIRT 1 säätelee p27 geenin ilmentymistä. p27 on sykliiniriippuvainen kinaasi-inhibiittori, joka säätelee solun lisääntymistä eli kontakti-inhibitiota ja liikkuvuutta sekä apoptoosia. Vuonna 2016 tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että soluissa korkea SIRT 1 aktiivisuus alentaa p27:n määrää, jolloin kontakti-inhibiatio voi sammua ja solut voivat alkaa kasvaa hallitsemattomasti. SIRT 1:n matala aktiivisuus taas nostaa p27 määrää, jolloin kontakti-inhibiatio pysyy toiminnassa. Samaisessa tutkimuksessa havaittiin myös syöpäsoluissa korkea SIRT 1 aktiivisuus ja mikäli entsyymi saataisiin inhiboitua, saattaisi kontakti-inhibiatio palautua. (Cho & Dai 2016)

5.3 Leimattu peptidi

Taustafluoresenssin minimoimiseksi työssä käytettiin lantanidi-kelaatti-leimamolekyyliä. Pitkäikäiset lantanidit ovat harvinaisia maametalleja, joihin kuuluu terbium (Tb), dysprosium (Dy), samarium (Sm) sekä europium (Eu). Muihin fluoroforeihin verrattuna lantanideilla on pitkä luminesenssin elinikä, mikä mahdollistaa taustafluoresenssin erottamisen varsinaisesti signaalista. Lantanidit eivät fluoresoi sellaisenaan vaan ne tulee liittää ligandiin. Tätä ligandin ja lantanidin muodostamaa kompleksia kutsutaan kelaatiksi, joka on rakenteeltaan stabiili. Useimmiten, kuten myös tässä työssä, aikaerotteisen fluoresenssin mittauksessa käytetään europium(III)kelaatteja, jotka absorboivat valoa aallonpituudella 340 nm ja emittoivat 615 nm aallonpituudella. (Song & Quirk 2012)

5.4 Inhibiittori

Inhibiittorit ovat molekyyliä, jotka sitoutuvat entsyymiin, joko estäen tai hidastaen entsyymin toimintaa. Sitoutumisensa perusteella inhibiittorit voidaan jakaa kompetiivisiin, nonkompetiivisiin sekä unkompetiivisiin. Substraatin kanssa entsyymiin aktiiviseen kohtaan sitoutumisesta kilpailevaa inhibiittoria kutsutaan kompetiiviseksi. Kilpailevalla inhibiittorilla on suurempi affiniteetti entsyymiin aktiivista kohtaan kuin substraatilla. Sitoutuessa entsyymiin se estää substraattia sitoutumasta, jolloin muodostuu entsyymi-inhibiittorikompleksi, ja entsyymi on inhiboitu eli toiminta on estetty. Kompetiivisen inhibiittorin konformaatio muistuttaa paljon substraatin muotoa, jolloin inhibiittorin sitoutuminen entsyymiin aktiiviseen kohtaan on mahdollista. (Heino & Vuento 2014)

Nonkompetiiviset eli ei-kilpailevat inhibiittorit sitoutuvat entsyymiin aktiivisen kohdan ulkopuolelle. Tämä ei kuitenkaan estä substraattia kiinnittymästä aktiiviseen kohtaan, mutta molempien molekyylien ollessa läsnä reaktiotuotetta ei synny. Substraatin sitoutuessa entsyymiin aktiiviseen kohtaan muodostuu entsyymi-substraattikompleksi. Joissakin tapauksissa substraatin kiinnittyminen aktiiviseen kohtaan saa aikaan entsyymiin konformaation muutoksen, jolloin inhibiittorille muodostuu oma kiinnittymiskohta. Unkompetiiviset inhibiittorit sitoutuvat vain tällaisiin entsyymi-substraattikomplekseihin, estäen reaktiotuotteen muodostumisen. (Heino & Vuento 2014)

Inhibiittorien toiminta on joko palautuvaa tai palautumatonta. Palautuvat inhibiittorit muodostavat heikkoja ei-kovalenttisia sidoksia entsyymin kanssa, kuten vetysidoksia ja ionisidoksia. Tällaiset inhibiittorit ovat joko kompetiivisia, nonkompetiivisia tai unkompetiivisia. Palautumattomat inhibiittorit muodostavat kovalenttisia sidoksia. Tällaisessa tapauksessa inhibiittorit usein muokkaavat entsyymin toiminnallisia ryhmiä, jotka vastaavat katalyyttisestä aktiivisuudesta. (Heino & Vuento 2014)

Opinnäytetyössä fosforylaatioissa käytettiin inhibiittorina H-89 ja deasetyloaatioissa EX-527 -inhibiittoria sekä trikostatiini a:ta (TSA). Kaikki ovat palautuvia kompetiivisia inhibiittoreita. (Gertz *et al.* 2013; Herbst *et al.* 2009)

5.5 Sammuttaja

Sammuttajan avulla selvitetään reaktion onnistumista ja kuinka hyvin kohdemolekyylillä sekä europiumilla (Eu) leimattu peptidi ovat sitoutuneet toisiinsa. Reaktiossa liukoisen sammuttajan on tarkoitus päästä reagoimaan europium-peptidin kanssa, jolloin niiden välinen vuorovaikutus kasvaa. Tällöin sammuttaja hiljentää signaalin ja mitataan matala aikaerotteinen luminesenssisignaali. Mikäli kohdemolekyylillä ja leimattu peptidi sitoutuvat toisiinsa, sammuttajan ja peptidin vuorovaikutus vähenee ja europiumin luminesenssin elinikä pitenee, jolloin mitataan korkea aikaerotteinen luminesenssisignaali. (Kopra & Härmä 2015)

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyössä karakterisoitiin määritysmenetelmää lääkeaineiden tehoseulontaan. Menetelmä perustuu luminesenssin mittaamiseen mikrotiitterilevyformaattissa. Määrittelyssä tehtiin vähintään kolme rinnakkaista määrittystä, joista laskettiin keskiarvo, CV-prosentti sekä signaalin ja taustan suhde (S/B arvo). Signaalin ja taustan suhteen ollessa 3 tai yli, voitiin todeta reaktion onnistuneen.

Opinnäytetyössä testattiin useita eri peptidisubstraatteja. Nämä peptidit poikkesivat toisistaan pituudeltaan, aminohappojärjestykseltään, funktionaalisilta ryhmiltään ja varaukseltaan. Työssä käytettyjen peptidisubstraattien kuten myös leimattujen peptidien sekvenssit ovat vain toimeksiantajan tiedossa. Tulosten analysointiin käytetyt tiedot peptideistä ovat luottamuksellisia.

Osa peptideistä puhdistettiin HPLC-laitteella (Thermo Fisher Scientific, Dionex UltiMate 3000 LC) ennen varsinaisten töiden alkua. Ohjelmana käytettiin peptidipuhdistus 50 mM TEAA:ta ja virtausnopeus oli 1,5 ml/min. Kromatogrammatriisina oli Sigma-Aldrichin Ascentis RP-Amide HPLC kolumni (15 cm x 4,6 mm, 5 μ M).

Liuokset valmistettiin pääasiassa PKA-puskuriin (HEPES, Triton, EDTA, NaCl, pH 7.5). Deasetylaatio määrittelyssä puskurina käytettiin asetylaatiopuskuria (HEPES, MgCl₂, EDTA, Triton, NaCl, pH 8) sekä histonideasetylaasi (HDAC, *histone deacetylase*) puskuria (HEPES, MgCl₂, Triton, NaCl, KCl, pH 8). Puskurit valmistettiin hyvissä ajoin ennen töiden aloittamista ja ne säilytettiin 50 ml Falcon-putkessa jääkaapissa. Määrittelyt suoritettiin 50 μ l tilavuudessa.

Peptidit hankittiin PepMic Co:lta, entsyymit SignalChemilta ja inhibiittorit Santa Cruz Biotechnologiesilta. Sammutinmolekyylit (Quencher III) saatiin QRET Technologies Oy:ltä (Turku). Tarkemmat tiedot sammutinmolekyylit ovat vain toimeksiantajan tiedossa.

Kuoppalevyinä käytettiin mustia mikrotiitterilevyjä (Optiplat 284F, PerkinElmer). Määrittelyt mitattiin Labrox Oy:n levylukijalla käyttäen 600 μ s viivästysaikaa ja 25 leimahdusta 615 nm (emissio) ja 340 nm (eksitaatio) aallonpituuksilla.

6.1 Työn alkuvalmistelut

Työn alussa suoritettiin kolmen eri peptidin leimaus, jolloin europium-kelaatti konjugoitiin peptidiin sekoittaen huoneenlämmössä yön yli valolta suojattuna. Leimauksen jälkeen peptidit puhdistettiin HPLC-laitteella, josta fraktiot kerättiin manuaalisesti talteen Eppendorf-putkiin. Kerätyt fraktiot tarkistettiin UV-valon avulla, jolloin varmistettiin, että näyte luminoi ja merkittiin mitkä Eppendorf-putket luminoivat eniten. Tämän jälkeen fraktiot kuivattiin ja laitettiin pakastimeen odottamaan analysointia. Analysoinnin tarkoituksena oli määrittää Eu-peptidien pitoisuus. Kuivatut fraktiot liuotettiin ja niistä mitattiin fluoresenssi. Tulokseksi saatuja signaaleja verrattiin kontrollina olleen Eu-leimatun peptidin (konsentraatio tiedettiin) mitattuihin signaaleihin.

6.2 Sitoutumistestit

Opinnäytetyössä käytettiin useita eri peptidisubstraatteja, jolloin tuli ennen entsyymaattisia reaktioita tehdä sitoutumistestejä, joilla selvitettiin käytettävien peptidien affiniteettia. Sitoutumistesteillä haluttiin myös selvittää millä peptidipareilla saadaan parhaimmat signaalit ja taustan suhdeluvut. Osa peptideistä oli fosforyloitu ja osa fosforyloimattomia. Toinen osa peptideistä oli asetyloitu ja osa taas asetyloimattomia.

Liuokset valmistettiin PKA-puskuriin. Peptidisubstraateilla käytettiin kahta eri loppukonsentraatiota 10 nM sekä 100 nM ja Eu-peptidillä yhtä 10 nM konsentraatiota. Liuokset valmistettiin Eppendorf-putkiin, joihin ensin pipetoitiin puskuria ja sen jälkeen haluttu peptidi. Valmistetut peptidiliuokset säilytettiin jäähauteessa kuoppalevyllä pipetoimiseen asti. Liukoinen sammuttaja pidettiin huoneenlämmössä valolta suojattuna. Kuoppalevynä käytettiin 384-kuoppaista mustaa levyä, johon pipetoitiin aina kolme rinnakkaista näytettä. Ensin pipetoitiin 10 µl jokaista peptidisubstraattia omiin kaivoihinsa, jonka jälkeen kaivoihin pipetoitiin 20 µl yhtä europium-leimattua peptidiä. Kuoppalevy laitettiin levyravistelijaan ja inkuboitiin huoneenlämmössä 6 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen mitattiin aikaerotteinen luminesenssi, jonka jälkeen kuoppiin pipetoitiin 20 µl 1,3 µM:sta valoherkkää sammuttajaa. Sammuttajan pipetoinnin jälkeen kuoppalevy suojattiin alumiinifoliolla ja laitettiin levyravistelijaan inkuboitumaan 8 minuutiksi, jonka jälkeen mitattiin uudelleen aikaerotteinen luminesenssi. Inkubointia jatkettiin mittauksen jälkeen vielä 12 minuuttia, jolloin mitattiin vielä kerran TRL-signaali. Tuloksista laskettiin signaalin ja taustan

suhde jakamalla peptidien signaalit määrittäessä käytettyjen fosforyloitujen sekä asetyloitujen peptidien signaaleilla.

6.3 Fosforylaatioreaktio

Sitoutumistesteissä käytetyt fosforyloimattomat peptidit fosforyloitiin tässä analyysissä ja niiden sitoutumista europium-leimattuihin peptideihin analysoitiin.

Liuokset valmistettiin PKA-puskuriin ja niitä säilytettiin jäähauteessa. 10 nM peptidisubstraattiliuokset valmistettiin ensin, jonka jälkeen valmistettiin 50 µM ATP-liuos ja 2 µM inhibiittori H-89-liuos. Fosforylaatioreaktio tehtiin Eppendorf-putkiin, joista sitten pipetoitiin kuoppalevyille kolme rinnakkaista näytettä. Eppendorf-putkiin pipetoitiin ensin inhibiittori/PKA-puskuria, jonka jälkeen pipetoitiin peptidisubstraattia sekä ATP:tä ja sekoitettiin. Ensimmäisen aktiivisuuden säilymistä varten vasta sekoituksen jälkeen valmistettiin 0,5 nM PKA-liuos, jota pipetoitiin välittömästi reaktioputkiin, jonka jälkeen Eppendorf-putkia sekoitettiin. ATP, PKA sekä H-89 säilytettiin -21 °C:ssa, josta ne otettiin sulamaan. Sulatus tapahtui jäähauteessa. Reaktiokomponenttien pipetointi tilavuudet reaktioputkiin vaihtelivat analyysin koon mukaan. Kun kaikki reaktiokomponentit oli saatu pipetoitua Eppendorf-putkiin ja vortexoitu, aloitettiin kaivoihin pipetoiminen. Aluksi pipetoitiin 10 µl reaktioliuosta, jota inkuboitiin huoneenlämmössä sekoituksessa 30 minuuttia. Inkuboinnin aikana valmistettiin 10 nM europium-peptidi liuos, jota pipetoitiin inkuboinnin jälkeen 20 µl kaivoihin ja jatkettiin inkubointia sekoituksessa 5 minuuttia. Tämän jälkeen mitattiin TRL-signaali, jonka jälkeen kaivoihin pipetoitiin 20 µl 0,9 µM sammuttajaa. Kuoppalevy peitettiin alumiinifoliolla ja inkuboitiin 8 minuuttia levyravistelijassa ennen uuden mittauksen suorittamista. Levyn inkubointia jatkettiin, kunnes oli saatu mitattua TRL-signaali myös 20 ja 30 minuutin inkuboinnin jälkeen.

6.4 Deasetylaatioreaktio

Reaktio tehtiin samalla periaatteella kuin yllä kuvattu fosforylaatioreaktio. Liuokset valmistettiin asetylaatiopuskuriin ja niitä säilytettiin jäähauteessa. Ensimmäisen valmistettiin 10 nM peptidisubstraattiliuokset, jonka jälkeen valmistettiin 500 µM NAD⁺-liuos ja 5 µM inhibiittori EX-527 ja TSA. Fosforylaatioreaktion tapaan, myös deasetylaatio tehtiin ensin Eppendorf-putkiin. Putkista pipetoitiin kolme rinnakkaisnäytettä kuoppalevyille. Eppendorf-

putkiin pipetoitiin ensin inhibiittori/asetylaatiopuskuria, jonka jälkeen pipetoitiin peptidisubstraattia sekä NAD⁺:a ja sekoitettiin. Entsyymien aktiivisuuden säilymistä vasta sekoituksen jälkeen valmistettiin 0,5 nM SIRT1- ja HDAC-liuos, joita pipetoitiin välittömästi reaktioputkiin ja vorteksoitiin. NAD⁺, SIRT1, HDAC, TSA sekä EX-527 säilytettiin -80 °C:ssa, josta ne otettiin sulamaan jäähauteeseen. Tässäkin tapauksessa reaktiokomponenttien pipetointilavuudet reaktioputkiin vaihtelivat analyysin koon mukaan. Kun kaikki reaktiokomponentit oli saatu pipetoitua Eppendorf-putkiin ja sekoitettu aloitettiin kaivoihin pipetoiminen. Ensimmäiseksi pipetoitiin 10 µl reaktioliuosta, jota inkuboitettiin huoneenlämmössä sekoituksessa 30 minuuttia. Inkuboinnin aikana valmistettiin 10 nM europium-peptidi liuos, jota pipetoitiin inkuboinnin jälkeen 20 µl kaivoihin ja jatkettiin inkubointia sekoituksessa 5 minuuttia. Tämän jälkeen mitattiin TRL-signaali, jonka jälkeen kaivoihin pipetoitiin 20 µl 2,1 µM sammuttajaa. Kuoppalevy peitettiin alumiinifoliolla ja inkuboitettiin 8 minuuttia levyravistelijassa ennen uuden mittauksen suorittamista. Levyn inkubointia jatkettiin, kunnes oli saatu mitattua TRL-signaaleita myös 20 ja 30 minuutin inkuboinnin jälkeen.

7 TULOKSET

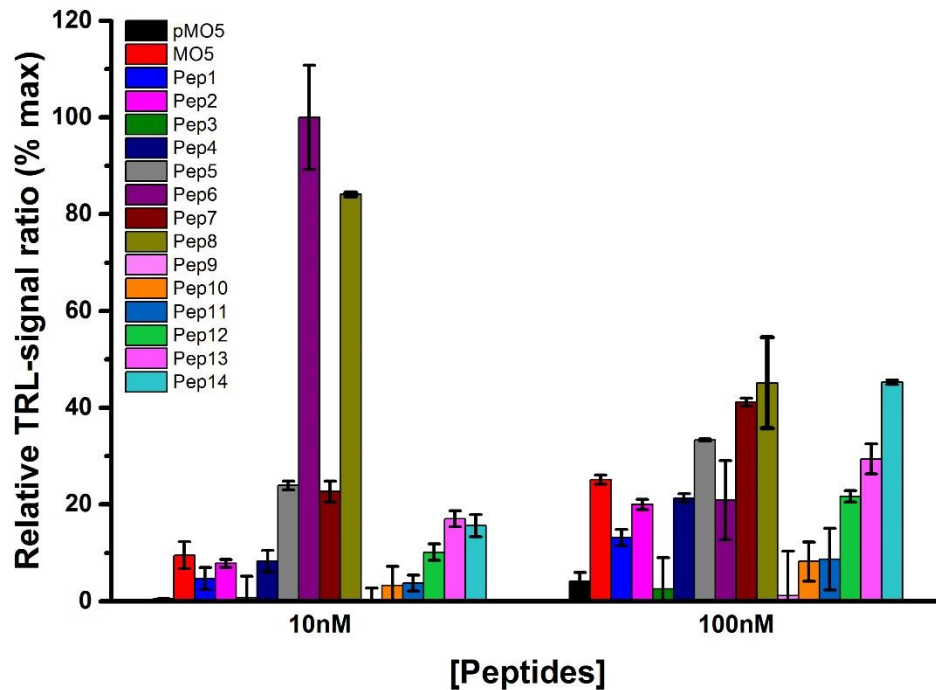
7.1 Sitoutumistestit

Peptide break -teknologiaa kehitettäessä kulut halutaan mahdollisimman alas, jolloin tarkoitus on, että analyysi saataisiin onnistumaan pienillä konsentraatioilla. Tuloksista kiinnostaa erityisesti 10 nM tulokset. 100 nM tulokset toimivat vain vertailukohteena.

Sitoutumistestit tehtiin kaikille kolmelle työssä leimatulle europium-peptidille, jotka olivat pep21, pep22 ja pep23. Näiden lisäksi tehtiin testit myös europium-leimatuille pep31:lle ja pep32:lle, joista pep31 on alkuperäisen sekvenssin omaava ja muista saatuja tuloksia verrattiin tähän peptidiin. Peptidejä testattiin kahdella eri konsentraatiolla 10 nM ja 100 nM.

Jokaisessa tehdyssä sitoutumistestissä oli peptidisubstraatteja, jotka sisälsivät konsensussekvenssin fosfataasientsyymille. Nämä peptidit olivat MO5-pep8. Mukana analyysissä oli lisäksi vielä fosforyloitu peptidi pMO5, jonka avulla saatiin laskettua signaalin ja taustan suhde. Sitoutumistesteissä oli myös peptidisubstraatteja, jotka sisälsivät konsensussekvenssin asetylaasitransferaasille. Nämä peptidit olivat pep10, pep12 ja pep14. Näiden signaalin ja taustan suhteen laskemiseksi mukana oli myös valmiiksi asetyloituja peptidejä, jotka olivat pep9, pep11 ja pep14.

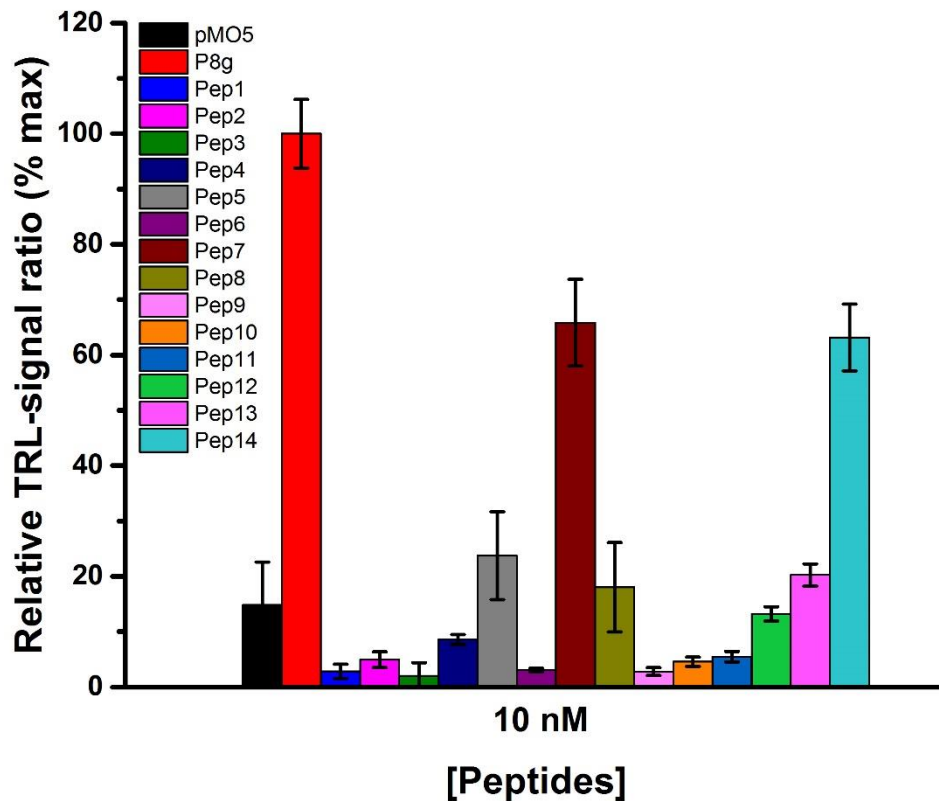
MO5:n, pMO5:n, P8g:n, pep14:sta ja pep16:sta sekvensseissä joka seitsemäs aminohappo oli leusiini. Peptidit pystyivät muodostamaan leusiinivetoketjun Eu-pep31:n kanssa, jonka sekvenssistä löytyi myös nämä samat leusiinit. Kaikki käytetyt peptidisubstraatit sekä leimatut peptidit poikkeavat toisistaan mm. varaukseltaan, kooltaan sekä aminohappojärjestykseltään.



Kuva 9. Eu-pep31:n sitoutumistesti.

Ensimmäiseksi tehtiin sitoutumistesti Eu-pep31:lle, joka toimi muiden leimattujen peptidien vertailukohteena. Kuvassa 9 fosforyloimattomien peptidien kontrollina toimi MO5/pMO5 pari, jonka S/B arvo oli 17. Kuvasta nähdään, että parhaiten europium-leimatun peptidi 31:n kanssa sitoutui 10 nM konsentraatiolla pep6, jonka S/B arvoksi saatiin 179. Pep8 sitoutui toiseksi parhaiten ja sen S/B arvoksi saatiin 121.

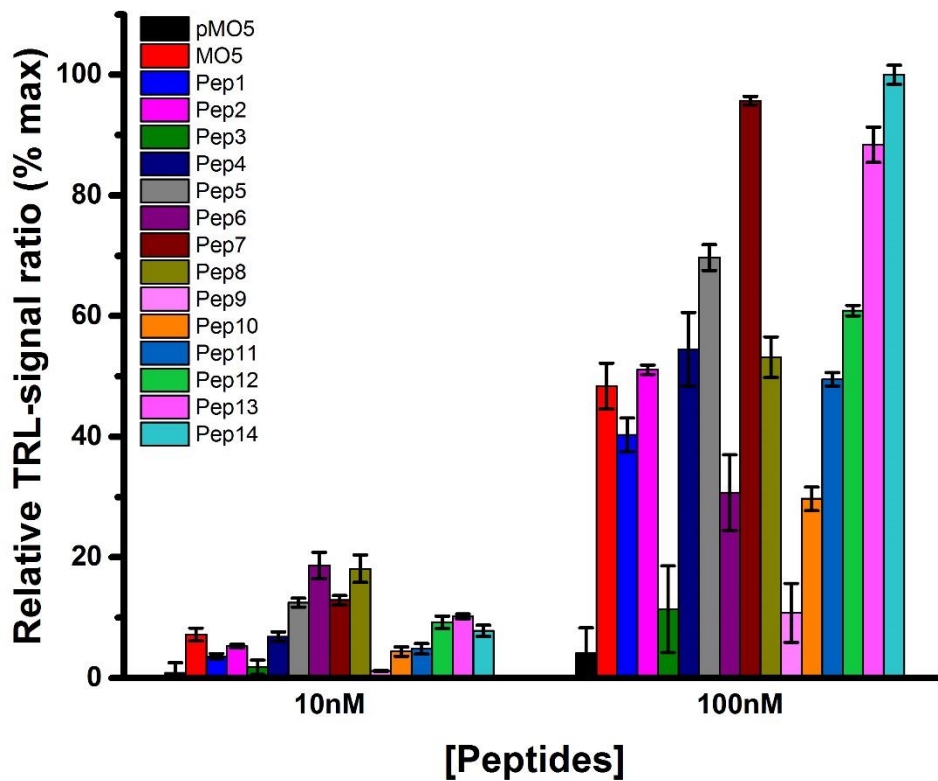
Peptidiparit pep9/pep10, pep11/pep12 ja pep13/pep14 olivat muuten samanlaisia, mutta vasemman puoleiseen oli vain lisätty asetyyliryhmä. Kuvasta 9 nähdään, että asetyloiduilla/asetyloimattomilla peptideillä on kohtalaisen korkea sitoutumisaffiniteetti peptidi31:een eli ne sitoutuvat, vaikka näin ei pitäisi tapahtua. Jopa asetyloidut pep11 ja pep13 sitoutuvat. Poikkeuksen tekee kuitenkin 10 nM konsentraatiolla pep9/pep10 pari, jonka S/B arvoksi saatiin 11.



Kuva 10. Eu-pep32:n sitoutumistesti.

Eu-pep32:n analyysissä unohtui tehdä 100 nM rinnakkainen analyysi, jota ei jälkepäin enää tehty. Tästä syystä kuvassa 10 on vain yksi konsentraatio 10 nM. Kuvasta 10 huomataan, että fosforyloidun peptidin (pMO5) signaali on korkeampi kuin edellisessä sitoutumistestissä, mutta muuten signaalit ovat aika alhaiset. Tästä voidaan päätellä, että sitoutuminen Eu-pep32:n kanssa ei ole onnistunut kunnolla. Kuvasta nähdään, että MO5 antoi korkeimman signaalin, joten se sitoutui parhaiten europium-leimatun peptidi 32:n kanssa. S/B arvoksi saatiin 7, ja se toimi kontrollina muille samassa analyysissä oleville peptidisubstraateille. Myös pep7:n signaali oli kohtalainen ja S/B arvoksi tuli 4. Muiden S/B arvot jäivät huomattavasti alle kolmen.

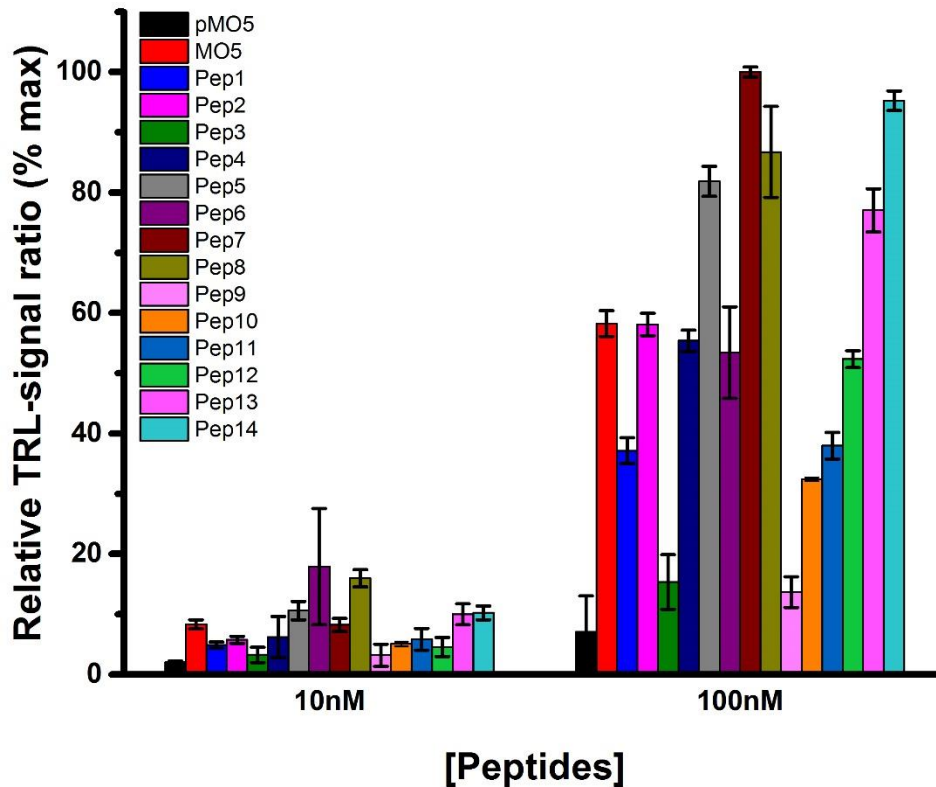
Peptidiparit pep9/pep10, pep11/pep12 ja pep13/pep14 olivat muuten samanlaisia, mutta vasemman puoleiseen oli lisätty asetyyliryhmä. Kuvasta 10 nähdään että asetyloiduilla/asetyloimattomilla peptideillä saatiin erittäin matalat signaalit, joten voidaan olettaa, että sitoutumista Eu-pep32:n kanssa ei ole tapahtunut. Poikkeuksen kuitenkin tekee pep13/pep14 pari, jonka S/B arvoksi saatiin 4.



Kuva 11. Eu-pep21:n sitoutumistesti.

Kuvassa 11 fosforyloimattomien peptidien kontrollina toimivan MO5/pMO5 parin S/B arvo oli 8. Kuvasta nähdään, että parhaiten europium-leimatun peptidi 21:n kanssa sitoutui 10 nM konsentraatiolla pep6, jonka S/B arvoksi saatiin 22. Myös pep8 antoi melkein yhtä korkeat signaalit, sen S/B arvoksi saatiin 21.

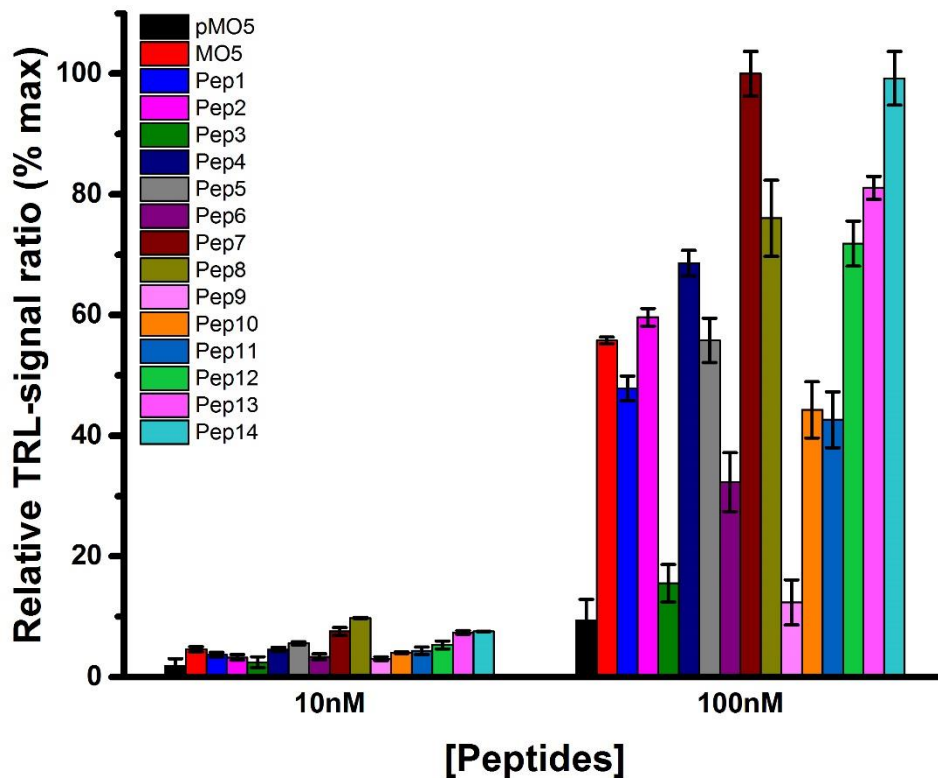
Asetyloidut/asetyloimattomat peptidiparit pep9/pep10, pep11/pep12 ja pep13/pep14 olivat muuten samanlaisia, mutta vasemman puoleiseen peptidiin oli lisätty asetyyliryhmä. Kuvasta nähdään, että asetyloituilla/asetyloimattomilla peptideillä on korkea sitoutumisaffiniteetti peptidi21:een eli ne sitoutuvat, vaikka näin ei pitäisi tapahtua. Jopa asetyloidut peptidit 11 ja 13 sitoutuvat. Poikkeuksen tekee pep9/pep10 pari, jonka S/B arvo 10 nM konsentraatiolla on 4.



Kuva 12. Eu-pep22:n sitoutumistesti.

Eu-pep22:n sitoutumistestissä kontrollina toimivan MO5/pMO5 parin S/B arvoksi saatiin 4. 10 nM konsentraatiolla parhaiten Eu-pep22:n kanssa sitoutui suurimman signaalin antanut pep6, jonka S/B arvo oli 10. Myös pep8 antoi korkean signaalin, sen S/B arvo oli 8.

Eu-Pep22:n sitoutumistestissä käytettiin samoja asetyloimattomia/asetyloituja peptideitä kuin muissakin sitoutumistesteissä. Peptidi 9 oli asetyloitu ja se oli peptidi 10 taustasignaali. Peptidi 11 oli asetyoitu ja se oli peptidi 12 taustasignaali. Myös peptidi 13 oli asetyloitu ja se oli peptidi 14 taustasignaali. Kuvasta 12 nähdään, että myös tässä analyysissä asetyloiduilla/asetyloimattomilla peptideillä on korkea sitoutumisaffiniteetti peptidi22:een eli ne sitoutuvat, vaikka näin ei pitäisi tapahtua. Kaikki asetyloidut peptidit sitoutuvat. S/B arvo jäi kaikissa tapauksissa alle kolmen.



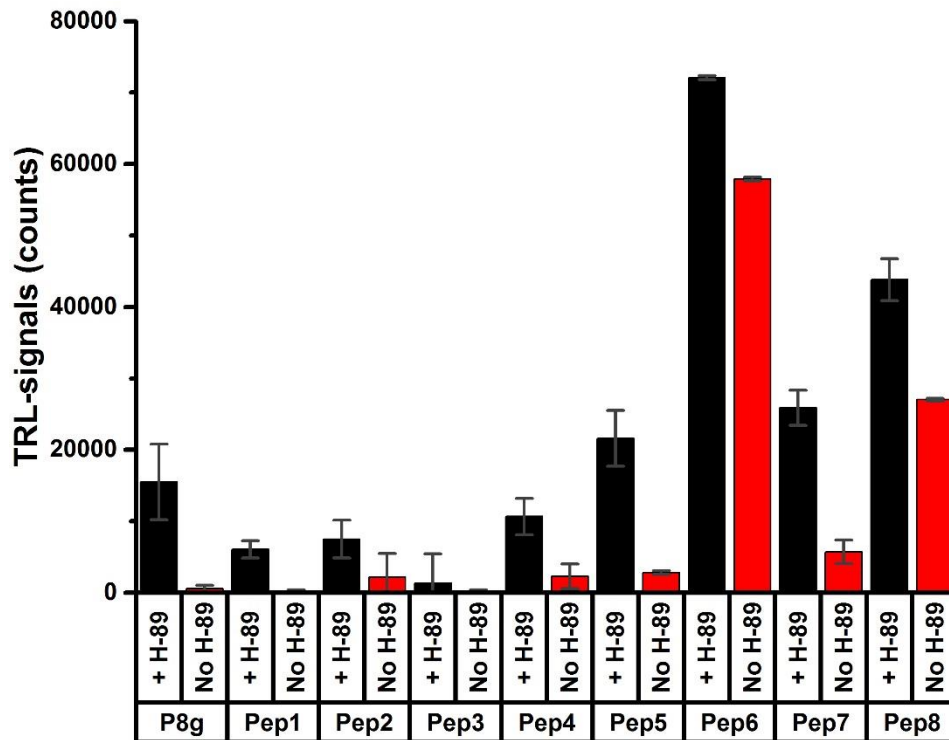
Kuva 13. Eu-pep23:n sitoutumistesti.

Eu-Pep23:n sitoutumistestissä saatiin MO5/pMO5 parin S/B arvoksi 2, joka on alle kolmen, joten sitoutuminen ei onnistunut kunnolla. Kuvasta 13 nähdään, että suurimman signaalin 10 nM konsentraatiolla antoi pep8, jonka S/B arvoksi saatiin 5. Pep7 sitoutui europium-leimattuun peptidiin kohtuullisen hyvin. S/B arvoksi saatiin 4. Eu-pep23:n sitoutumistestistä (Kuva 13) on havaittavissa, että signaalit ovat suhteessa paljon matalampia kuin kahdessa aiemmassa analyysissä. Sitoutumisaffiniteetti on korkeampi, koska erot taustan ja varsinaisen signaalin välillä ovat pienemmät. Paremmat S/B arvot saatiin suuremmalla 100 nM konsentraatiolla.

Kuvasta 13 nähdään edelleen, että analyysissä asetyloiduilla/asetyloimattomilla (pep9-pep14) peptideilla on korkea sitoutumisaffiniteetti Eu-pep23:n eli ne sitoutuvat, vaikka näin ei pitäisi tapahtua. Kaikki asetyloidut peptidit sitoutuvat peptidi 23:n kanssa. S/B arvo jäi tässäkin tapauksessa kaikissa alle kolmen.

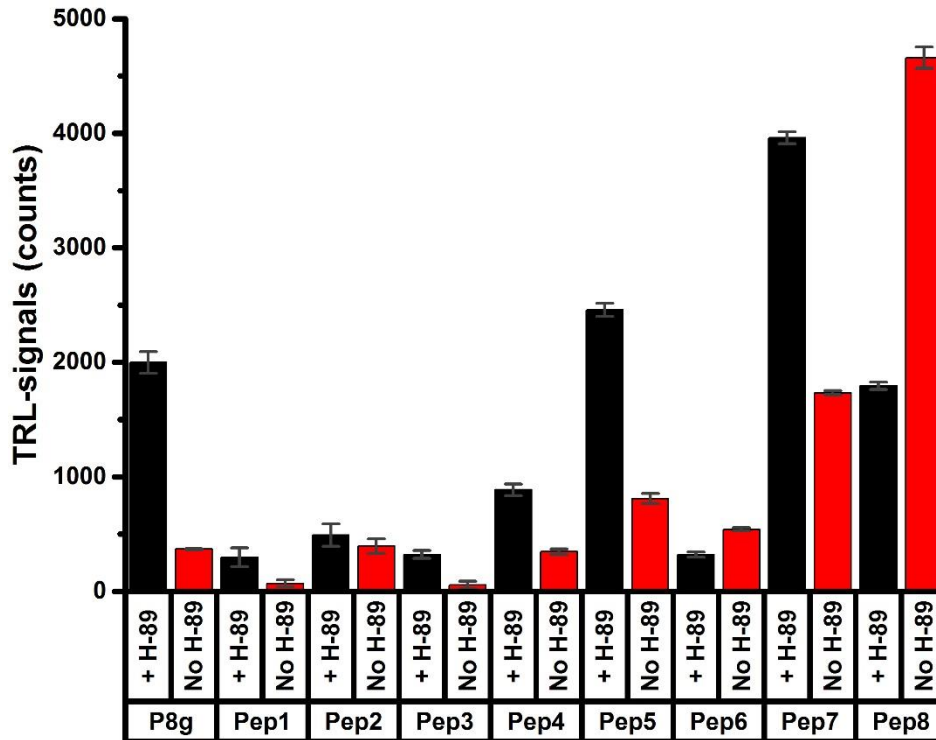
7.2 Fosforylaatio

Fosforylaatioreaktio tehtiin kaikille samoille leimatuille peptideille, joille aiemmin oli tehty sitoutumistestit. Tarkoituksena oli testata kuinka sitoutuminen muuttuu oikeassa tilanteessa. Kontrollina toimi P8g peptidisubstraatti ja sen sekä kaikkien muiden peptidisubstraattien konsentraatio oli 10nM.



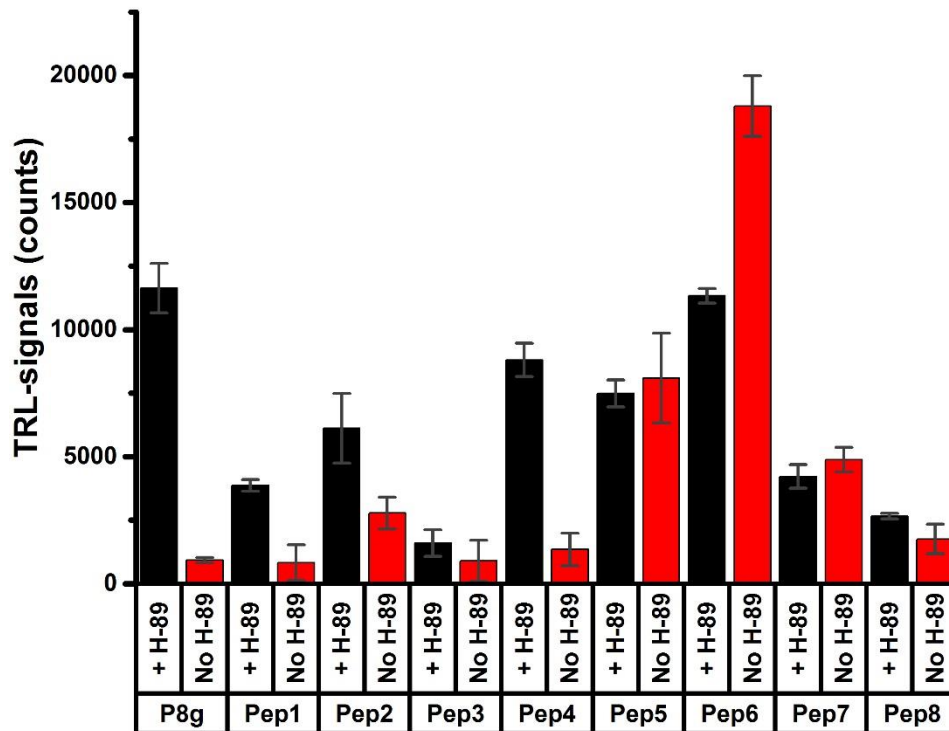
Kuva 14. Eu-pep31:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.

Kuvasta 14 nähdään kuinka pep1 sitoutui parhaiten europium-leimattuun peptidi 31:een. S/B arvoksi saatiin 30, koska tausta oli erittäin alhainen, mutta ei kuitenkaan alle 200. Toiseksi paras tulos saatiin kontrollina toimivan P8g:n sitoutumisesta europium-leimattuun peptidiin, jonka S/B arvo oli 28. Suurin osa peptideistä sitoutui hyvin Eu-pep31:een, koska S/B arvo oli yli kolmen. Poikkeuksen tekivät pep6 ja pep8, näiden S/B arvot jäivät alle kolmen.



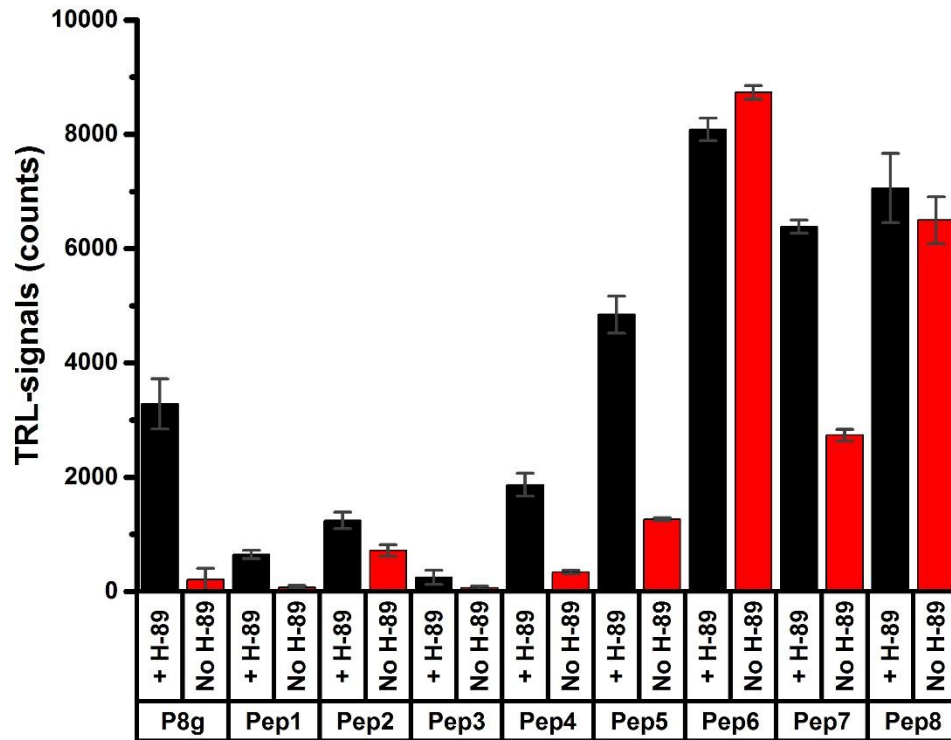
Kuva 15. Eu-pep32:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.

Kuvasta 15 on nähtävissä, että signaalin ja taustan välinen ero on aika pieni, mikä kertoo peptidisubstraattien korkeasta affiniteetista Eu-pep32:een. Signaaleista on havaittavissa myös, että inhibiittori ei pystynyt inhiboimaan kaikissa tapauksissa entsyymiä yhtä hyvin. Signaalit ovat matalammat kuin edellisessä analyysissä (Kuva 14). Sitoutuminen Eu-pep32:een ei ole onnistunut kunnolla. Parhaiten fosforylaatio toimi pep3:n ja europium-leimatun pep32:n välillä. S/B arvoksi saatiin 6. Kontrollina olleen P8g:n fosforylaatio toimi kohtalaisesti europium-leimatun peptidi 32:n kanssa ja S/B arvoksi saatiin 5.



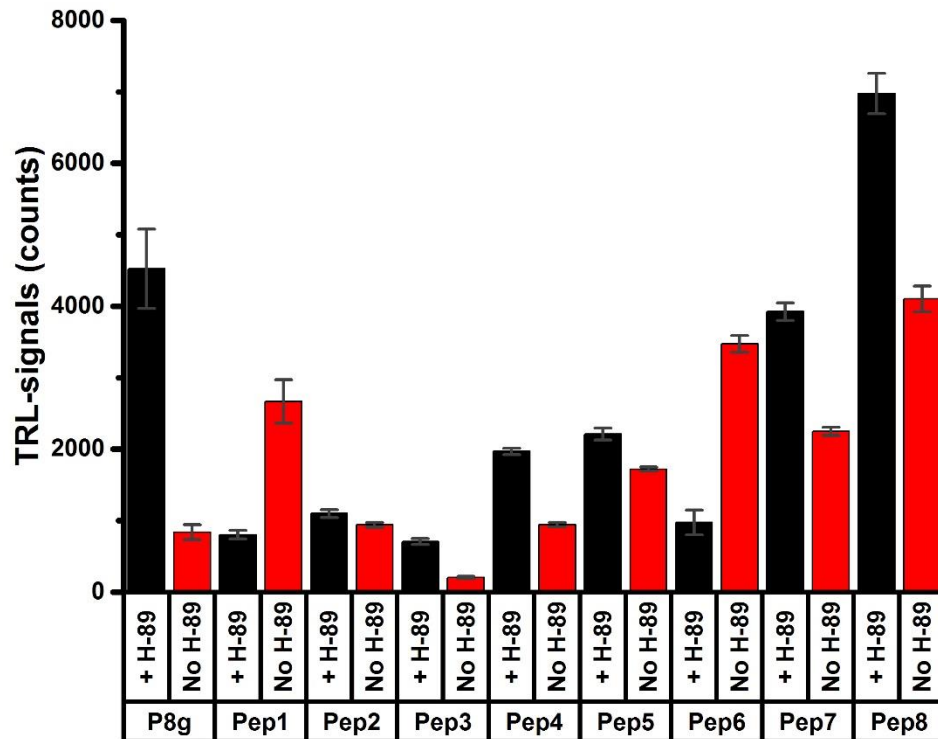
Kuva 16. Eu-pep21:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.

Eu-pep21:n ja fosforyloimattomien/fosforyloitujen peptidien välisessä sitoutumistestissä on nähtävissä (Kuva 16), että korkein signaali on saatu kontrollilla P8g. S/B arvoksi saatiin 13. Toiseksi parhaiten fosforylaatio toimi pep4:n ja europium-leimatun pep21:n välillä, antaen S/B arvon 7. Myöskin pep1:n fosforylaatiolla saatiin europium-leimatun peptidi 21:n kanssa sitoutumisesta kohtalainen S/B arvo, joka oli 5.



Kuva 17. Eu-pep22:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.

Kuvassa 17 Eu-pep22:n ja peptidisubstraattien fosforylaatiossa signaalien nähdään olevan jonkin verran pienemmät kuin aiemmassa reaktiossa (Kuva 16). Kuvasta 17 on nähtävissä, että tällä kertaa kontrolli ei antanut korkeinta signaalia. Fosforyloidulla P8g:llä oli kuitenkin erittäin matala affiniteetti Eu-pep22:een, joten taustasignaali on erittäin matala. Kontrollin P8g:n S/B arvoksi saatiin 16. Parhaiten fosforylaatio toimi Eu-pep22:n kanssa samoilla peptidisubstraateilla kuin edellisessäkin reaktiossa (Kuva 16). Erona oli vain se, että pep1 antoi korkeamman S/B arvon kuin pep4. Pep1:n S/B arvo oli 9 ja pep4:n arvo oli 6.



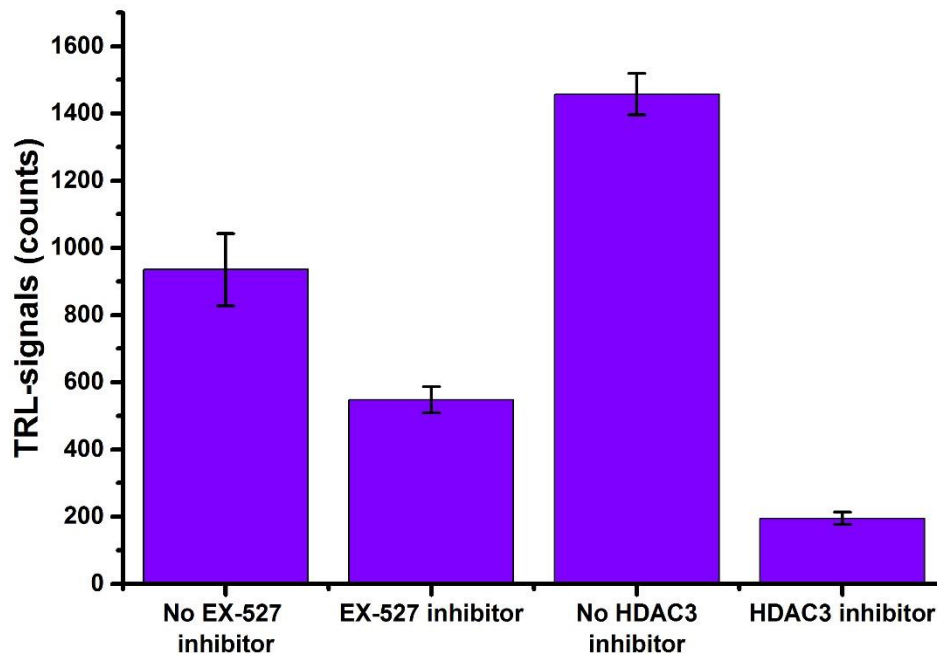
Kuva 18. Eu-pep23:n sitoutuminen fosforylaatioreaktiossa.

Eu-pep23:n sitoutumistestissä signaalit ovat samaa luokkaan kuin Eu-pep22:n sitoutumistestissä. Kuvasta 18 voidaan nähdä, että taustasignaalit ovat paljon korkeammat kuin kahdessa edellisessä analyysissä. Tämä kertoo fosforyloitujen peptidisubstraattien korkeasta sitoutumisaffiniteetista Eu-pep23:a kohtaan. P8g kontrollin sitoutumisesta europium-leimattuun peptidi 23:een saatiin paras tulos. S/B arvoksi saatiin 5. Kuvasta nähdään, että vaikka pep3:n fosforyloimaton peptidi (mukana inhibiittori H-89) antaa pienimmän signaalin. Niin siitä huolimatta tausta jonka muodostaa pep3:n fosforyloidun peptidin sitoutuminen Eu-pep23:een on kuitenkin suhteessa pienempi kuin muiden. Siksi se antaa toiseksi korkeimman S/B arvon, joka oli 3, muut jäivät alle kolmen.

7.3 Deasetylaatio

Sitoutumistesteistä kävi ilmi, että asetyloiduilla sekä asetyloimattomilla peptideillä on korkea sitoutumisaffiniteetti europium-leimattuihin peptideihin, jolloin S/B arvo jäi todella alhaiseksi. Tästä syystä päätettiin tehdä deasetylaatioreaktio vain Eu-pep28:lle, joka antoi korkeimman S/B arvon 11, pep9/pep10 parilla.

Alun perin tarkoitus oli testata vain Sirtuin 1 -entsyymiä, mutta havaittiin että entsyymi ei onnistu täysin poistamaan asetaattiryhmää peptidiketjusta. Näistä deasetylaatioreaktioista ei saatu kunnan tuloksia. Lopuksi päätettiin tehdä analyysi, jossa oli mukana myös HDAC-entsyymi ja TSA-inhibiittori.



Kuva 19. Pep9:n deasetylaatioreaktio kahdella eri entsyymillä.

Kuvasta 19 on nähtävissä saatujen signaalien suhde toisiinsa nähden. Molemmat käytetyt entsyymit tunnistavat peptidistä saman konsensussekvenssin. Tästä huolimatta nähdään, että SIRT1-entsyymi ei onnistu deasetyloimaan peptidisubstraattia täysin. Kuvasta 19 käy myös ilmi, että inhibiittori EX-527 ei onnistu täysin inhiboimaan SIRT1-entsyymiä ja inhibiittorin läsnä ollessa tapahtuu myös deasetylaatiota, jolloin peptidisubstraatti ja Eu-pep28 pääsevät sitoutumaan toisiinsa. Reaktiossa, jossa on käytetty EX-527-inhibiittoria, S/B arvo jää alle kolmen. Oikealla kuvassa on TSA-inhibiittori, jonka on tarkoitus inhiboida HDAC-entsyymi. Ilman inhibiittoria saadaan huomattavasti korkeampi signaali, jolloin voidaan todeta entsyymien onnistuvan paremmin deasetylaatiassa. HDAC-entsyymien käyttö deasetylaatioreaktiossa antoi S/B arvon 8.

8 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Sitoutumistesteissä oli hyvin huomattavissa kuinka suurin osa analysoiduista europium-leimatuista peptideistä sitoutui samoihin substraatteihin kuin kontrolli Eu-pep31. Kontrolli sitoutui parhaiten pep6:een sekä pep8:aan. Näihin samoihin peptidisubstraatteihin sitoutui myös Eu-pep21 sekä Eu-pep22. Eu-pep23:n havaittiin myös sitoutuvan pep8:aan, mutta S/B arvo oli kuitenkin kahteen muuhun verrattuna huomattavasti alhaisempi. Eu-pep32 erottui muista paljon, koska se ei sitoutunut kontrollia lukuun ottamatta tarpeeksi hyvin muihin peptidisubstraatteihin.

Asetyloiduilla sekä asetyloimattomilla peptidisubstraateilla havaittiin olevan korkea sitoutumisaffiniteetti leimattuihin peptideihin. Tämä johtuu siitä, että asetylaatioissa liitettävä asetyyliryhmä ainoastaan neutralisoi lysiinin varauksen, joka saa aikaan korkean affiniteetin. Tästä johtuen, lukuun ottamatta Eu-pep31:tä ja pep9/pep10 paria, muiden S/B arvot eivät olleet tarpeeksi hyvät ja useimmiten ne olivat alle kolmen. Korkeaan sitoutumisaffiniteettiin vaikuttaa mm. peptidisubstraattien pituus. Affiniteetin alentamiseksi peptidisubstraatteja tulisi muokata niin, että ne olisivat lyhempiä. Peptidiparissa 9/10 on potentiaalia menetelmän kehitykseen jatkossa.

Fosforylaatioissa europium-leimatut peptidit sitoutuivat aivan eri substraatteihin kuin sitoutumistesteissä, joissa suurin osa sitoutui pep6:een ja pep8:aan. Reaktiossa Eu-pep31:en kaikki S/B arvot oli yli kolmen, paitsi pep6:n ja pep8:n kohdalla. Paras tulos kontrollin P8g:n lisäksi tuli pep1:n kanssa sitoutumisesta. Myös Eu-pep21 sekä Eu-pep22 sitoutuivat pep1:een, lisäksi nämä sitoutuivat myös pep4:ään. Eu-pep32 sitoutui parhaiten kontrollin P8g:n lisäksi pep3:een kuten myös Eu-pep23. Europium-leimattu peptidi 23 on muihin leimattuihin peptideihin verrattuna todella negatiivisesti varautunut ja kooltaan noin puolet pidempi. Tästä syystä sitoutumistuloksista ei saatu yhtä hyviä tuloksia kuin muiden leimattujen peptidien tuloksista. Hyviä tuloksia saatiin Eu-pep21:stä sekä Eu-pep22:sta, joita voidaan hyödyntää jatkossa entsyymiaktiivisuusmenetelmän kehityksessä. Substraateista pep4:n sekä pep1:n kanssa saatiin hyviä tuloksia, molemmat toimivat yllä mainittujen leimattujen peptidien kanssa. Tuloksista havaittiin selkeästi, että leimattua peptidiä pidemmällä peptidisubstraatilla oli huomattavasti korkeampi affiniteetti leimattuun peptidiin (Kuva 17 peptidi 6 ja peptidi 8).

Sitoutumistestien huonoista tuloksista johtuen deasetyylaatioreaktioon valittiin vain yksi peptidisubstraatti sekä yksi europium-leimattu peptidi. Deasetyylaatio tehtiin aluksi vain

yhdellä entsyymillä, mutta näistä analyyseistä ei saatu hyviä tuloksia. SIRT1-entsyymi ei onnistunut täysin deasetyloimaan pep9:ää. Reaktiossa, jossa oli mukana inhibiittori EX-527, havaittiin että EX-527 ei onnistu täysin inhiboimaan entsyymiä. Lopuksi kokeiltiin rinnakkaisessa deasetylaatioreaktiossa toista entsyymiä ja inhibiittoria. HDAC-entsyymi onnistui huomattavasti paremmin deasetyloimaan peptidin ja myös TSA-inhibiittori pystyi paremmin estämään entsyymin toiminnan. Tuloksista voi päätellä, että SIRT1-entsyymi on liian hidas verrattuna HDAC-entsyymiin. Entsyymien aktiivisuustietojen perusteella SIRT1-entsyymi on 26 kertaa hitaampi kuin HDAC-entsyymi. Jotta entsyymi saataisiin toimimaan paremmin reaktiossa, tulisi sen konsentraatiota nostaa.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli karakterisoida peptide break-teknologiaa ja mahdollisesti löytää uusia työkaluja määrityksen kehitykseen. Työssä onnistuttiin hyvin, löydettiin potentiaalisia työkaluja, sekä saatiin tärkeää tietoa teknologian ominaisuuksista. Oletuksena oli, että pitkillä peptideillä on korkea sitoutumisaffiniteetti. Opinnäytetyö vahvisti tämän oletuksen. Europium-leimattu peptidi 23 oli erittäin negatiivinen ja todella pitkä peptidi, noin 30 aminohappoa pitkä. Peptidillä on korkea sitoutumisaffiniteetti käytettyihin peptidisubstraatteihin, eikä peptidin signaalin ja taustan suhde ollut tästä syystä tarpeeksi hyvä. Mikäli peptidiä haluttaisiin käyttää tulevaisuudessa, tulee sitä muokata lyhemmäksi ja vähemmän negatiiviseksi. Sama huomattiin asetuloitujen peptidisubstraattien kanssa, näitä tulisi vastaavasti muokata vähemmän positiivisiksi.

Peptide break-teknologiaa karakterisoitiin *in vitro*. Menetelmää kehitettäessä tulee ottaa huomioon myös se, että vaikka SIRT1-entsyymi ei toiminut kunnolla *in vitro* olosuhteissa. Se ei kuitenkaan tarkoita, että entsyymi ei toimisi *in vivo*. Tilanteet ovat aivan erilaiset. Deasetylaatiota suuremmalla Sirtuin 1 konsentraatiolla voisi olla hyvä testata.

Työssä leimatuista peptideistä sekä peptidisubstraateista ei ole aiempaa tietoa, miten ne soveltuvat kehitykseen, joten tulosten vertailu on hankalaa. Analysoinnissa käytetty QRET-tekniikka on kuitenkin yksinkertainen. Menetelmän korkean herkkyyden takia tuloksista voitiin havaita pienetkin erot. Tuloksissa olevista kuvista nähdään jokaisen tuloksen keskivirhe, joka on alle 15 %. Keskivirhe kertoo tulosten luotettavuudesta. Mikäli virhe on alle 15 % voidaan tuloksia pitää luotettavana.

Entsyymiaktiivisuusmääritystä kehitettäessä on hankalaa sovittaa kaikkien erilaisten entsyymien edellyttämät olosuhteet, kuten pH, suolakonsentraatio ja kofaktorit yhteen samaan muottiin siten, että sama analyysi toimisi kaikilla entsyymeillä yhtä hyvin. Nyt kun tiedetään missä olosuhteissa fosforylaatio sekä asetylaatio toimii hyvin, voidaan näiden

tietojen perusteella lähteä kehittämään määrittystä jonkin toisen post-translationalisen modifikaation kanssa, joka muistuttaa toiminnaltaan edellä mainittuja reaktioita. Esimerkiksi sitrullinaatioreaktio on samankaltainen asetylaatioreaktion kanssa. Sitrullinaatiossa arginiinin aminoryhmä hydrolysoidaan ja korvataan karbonyyliryhmällä. Post-translationalinen muokkaus neutralisoi arginiinin varauksen, aivan kuten asetylaatiossa tapahtuu lysiinille. Opinnäytetyössä deasetylaatiossa käytettyä pep9/pep10 paria voidaan muokata niin, että aminohappojärjestykseen lisätään sitrullinaation aikaansaavan entsyymin konsensussekvenssi SIRT1-entsyymin konsensussekvenssin tilalle.

Opinnäytetyössä haluttiin selvittää leusiinivetoketjun kolmiulotteisen rakenteen vaikutusta peptide break -teknologiaan. Asian selvittämiseksi analyyseissä oli mukana peptidejä jotka eivät muodosta leusiinivetoketjuja. Tuloksista havaittiin, että leusiinivetoketjun muodostama kolmiulotteinen rakenne ei haittaa proteiinin jälkitranslaation modifikaatioiden tutkimista. Fosforylaatioreaktioista löydettiin myös uusia peptidejä leusiinivetoketjun muodostavien peptidiparien rinnalle. Proteiinitranslaation jälkeisiä muokkauksia voidaan jatkossa tutkia peptide break -teknologiassa myös ilman leusiinivetoketjujen muodostumista.

Karakterisoitu peptide break -teknologia on yksi proteiinin jälkitranslaation määrittämis menetelmistä. Tämän vasta-aineettoman menetelmän etuja ovat, pienet kustannukset, yksinkertaisuus ja mittaustuloksissa havaittavat pienimmätkin erot. Opinnäytetyö oli vain yksi osa kehitettävää entsyymiaktiivisuummäärittystä. Jatkotutkimusten jälkeen peptide break -teknologiaa voidaan tulevaisuudessa hyödyntää lääkeaineiden tehoseulonnassa ja sitä kautta löytää uusia molekyyliä, joilla voidaan esimerkiksi hidastaa syövän etenemistä tai parantaa tyypin 2 diabetespotilaiden insuliiniherkkyyttä.

LÄHTEET

- Acker, M. G. & Auld, D. S., 2014. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 56-73.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter P., 2014. *Molecular Biology of the Cell*. 6 toim. New York: Garland Science.
- Cao, E. H. & Dai, Y., 2016. SIRT1 and insulin resistance. *Journal of Diabetes and its Complications*, 30(1), 178-183.
- Chen, C.-H., Chiu, C.-L., Adler, K. B. & Wu, R., 2014. A Novel Predictor of Cancer Malignancy: Up-regulation of Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate Phosphorylation in Lung Cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(8), 1002-1004.
- Chen, J. & Chen, L.-F., 2015. Methods to detect NF- κ B Acetylation and Methylation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Osa/vuosikerta 1280, 395-409.
- Cheung, J., Ginter, C., Cassidy, M., Franklin, M. C., Rudolph, M. J., Robine, N., Darnell, R. B. & Hendrickson, W. A., 2015. Structural insights into mis-regulation of protein kinase A in human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), 1374.
- Cho, E. H. & Dai, Y., 2016. SIRT1 controls cell proliferation by regulating contact inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(2), 868-872.
- Cieřła, J., Fraćzyk, T. & Rode, W., 2011. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochimica Polonica*, 58(2), 137-148.
- Davenport, A. M., Huber, F. M. & Hoelz, A., 2014. Structural and Functional Analysis of Human SIRT1. *Journal of Molecular Biology*, 426(3), 526-541.
- Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R. & Arnese, T., 2016. The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864(10), 1372-1401.
- Gertz, M., Fischer, F., Thi Tuyet Nguyen, G., Lakshminarasimhan, M., Schutkowski, M., Weyand, M. & Steegborn, C., 2013. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), E2772-E2781.
- Grotenbreg, G. & Ploegh, H., 2007. Chemical biology: Dressed-up proteins. *Nature*, 446(993-995), 1143-1150.
- Hakoshima, T., 2014. Leucine Zippers. Teoksessa: eLS. s.l. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Handl, H. & Gillies, R., 2005. Lanthanide-based luminescent assays for ligand-receptor interactions. *Life Sciences*, 77(4), 361-371.
- Heino, J. & Vuento, M., 2014. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Herbst, K. J., Allen, M. D. & Zhang, J., 2009. The cAMP-Dependent Protein Kinase Inhibitor H-89 Attenuates the Bioluminescence Signal Produced by Renilla Luciferase. *PLOS ONE*, 4(5), e5642.
- Jiang, Y., Wang, Q., Wang, J., Wu, S., Gang, C., Wei, O., Zhu, Y., Qian, X. & He, F., 2008. Profiling of Phosphorylated Proteins in Human Fetal Liver. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 1(9), 437-457.

Johnson, L. N., 2009. The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 627-641.

Karve, T. & Cheema, A., 2011. Small Changes Huge Impact: The Role of Protein Posttranslational Modifications in Cellular Homeostasis and Disease. *Journal of Amino Acids*, Osa/vuosikerta 2011.

Kopra, K. & Härmä, H., 2015. Quenching resonance energy transfer (QRET): a single-label technique for inhibitor screening and interaction studies. *New Biotechnology*, 32(6), 575-580.

Krylov, D. & Vinson, C. R., 2001. Leucine Zipper. Teoksessa: eLS. s.l.:John Wiley & Sons, Ltd.

Li, Y., Xie, W. & Fang, G., 2008. Fluorescence detection techniques for protein kinase assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(8), 2049-2057.

PerkinElmer, 2017. *LANCE Ultra Kinase Assays*. [Online]
Available at: <http://www.perkinelmer.com/fi/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/lance/lance-tr-fret-kinase.html>
[Haettu 12 03 2017].

Song, X. & Quirk, S., 2012. Time-Resolved Luminescence Detection and Imaging Promises a Bright. *Biosensors & Bioelectronics*, 3(5), e115.

Thangavelu, B., Mutthamsetty, V., Wang, Q. & Viola, R. E., 2017. Design and optimization of aspartate N-acetyltransferase inhibitors for the potential treatment of Canavan disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(3), 870-885.

Thermo Fisher Scientific, 2017. *Phosphorylation*. [Online]
Available at: <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html>
[Haettu 10 03 2017].

Thermo Fisher Scientific, 2017. *Overview of Post-Translational Modification*. [Online]
Available at: <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>
[Haettu 25 01 2017].

Tong-Ochoa, N., Kopra, K., Syrjänpää, M., Legrand, N. & Härmä, H., 2015. Homogeneous single-label tyrosine kinase activity assay for high throughput screening. *Analytica Chimica Acta*, Osa/vuosikerta 897, 96-101.

Turnham, R. E. & Scott, J. D., 2016. Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene*, 577(2), 101-108.

Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A. A., Moll, J. R. & Bonovich, M., 2002. Classification of Human B-ZIP Proteins Based on Dimerization Properties. *Molecular and Cellular Biology*, 22(18), 6321-6335.

Yu, L., Xu, L., Xu, M., Wan, B., Yu, L. & Huang, Q., 2011. Role of Mg²⁺ ions in protein kinase phosphorylation: insights from molecular dynamics simulations of ATP-kinase complexes. *Molecular Simulation*, 37(14), 1143-1150.