

Opinnäytetyö (AMK)

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2021

Henna Jalo

HSD17B10- ENTSYYMIAKTIIVISUUSTESTIN KEHITYS



Henna Jalo

HSD17B10-ENTSYYMIAKTIIVISUUSTESTIN KEHITYS

Entsyymit katalysoivat eli nopeuttavat kemiallisia reaktioita ja ovat välttämättömiä solujen toiminnalle. Ne ovat lähes aina proteiineja ja niiden oikea kolmiulotteinen rakenne mahdollistaa niiden biologisen aktiivisuuden. Entsyymien toimintaa voidaan estää erilaisten estäjien eli inhibiittoreiden avulla, joita ovat useat lääkeaineet, ja moni entsyymi on myös aktiivisen lääkekehityksen kohteena.

Hydroksisteroidi-17-beta-dehydrogenaasi tyyppi 10 (*HSD17β10*) -geenin aktivoitumisen tuloksena syntyy HSD17β10-entsyymiä, joka tunnetaan myös tyyppin II 3-hydroksiasyyli-CoA-dehydrogenaasina. Tämä mitokondrionaalinen entsyymi saa aikaan rasvahappojen, alkoholien ja steroidien hapettumista. Se pystyy katalysoimaan esimerkiksi biologisesti aktiivisen estrogeenin, 17β-estradiolin, hapettumista vähemmän aktiiviseksi estroniksi, 3α-androstanediolin hapettumista 5α-dihydrotestosteroniksi ja allopregnanolonin hapettumista 5α-dihydroprogesteroniksi.

HSD17β10-entsyymiaktiivisuutta on havaittu aivojen eri osa-alueilla, eniten hippokampuksessa. Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla HSD17β10-entsyymin tasot kohoavat, jolloin hermostoa suojaavien estradiolin ja allopregnanolonin tasot vastaavasti laskevat. HSD17β10-entsyymin inhibitiolla on mahdollista pitää yllä aivojen hermosoluja suojaavia steroiditasoja, minkä vuoksi tämä entsyymi onkin mielenkiintoinen lääkekehityksen kohde.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää uusi HSD17β10-entsyymin aktiivisuustesti, jota voitaisiin myöhemmin käyttää lääkeainekandidaattien seulonnassa. Menetelmän kehityksessä hyödynnettiin tieteellisissä julkaisuissa olevaa tietoa ja yrityksessä olevaa kokemusta vastaavista entsyymiaktiivisuustestien kehittämisestä. Työhön sisältyi entsyymin toimintaan vaikuttavien tekijöiden analyysijä, jotka toteutettiin 96-kuoppalevyformaattissa fluoresenssi- ja UPLC-menetelmillä.

Opinnäytetyölle asetetut tavoitteet toteutuivat, sillä uusi HSD17β10-entsyymin aktiivisuustesti saatiin kehitettyä osaksi yrityksen lääkeaineseulontaa.

ASIASANAT:

Alzheimerin tauti, entsyymi, HSD17β10, estradioli, inhibiittori, entsyymiaktiivisuustesti

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and Materials Engineering

Spring 2021 | 72 number of pages, 3 of pages in appendices

Henna Jalo

DEVELOPMENT OF HSD17B10-ENZYME ACTIVITY TEST

Enzymes catalyze or accelerate chemical reactions and are essential for cell function. They are almost always proteins, and their proper three-dimensional structure allows their biological activity. The activity of enzymes can be inhibited by various inhibitors, which many drugs are, and many enzymes are also subject to active drug development.

As a result of activation of the hydroxysteroid-17-beta dehydrogenase type 10 (*HSD17β10*) gene, HSD17β10 enzyme, also known as type II 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, is produced. This mitochondrial enzyme induces the oxidation of fatty acids, alcohols, and steroids. It catalyzes, for example, the oxidation of a biologically active estrogen, 17β-estradiol, to a less active estrone, the oxidation of 3α-androstane-2,17-diol to 5α-dihydrotestosterone, and the oxidation of allopregnanolone to 5α-dihydroprogesterone.

HSD17β10 enzyme activity has been observed in different regions of the brain, most in the hippocampus. In patients with Alzheimer's disease, levels of the enzyme HSD17β10 increase, resulting in a decrease in the levels of estradiol and allopregnanolone, which are known for their protective role in the nervous system. By inhibiting the HSD17β10 enzyme it is possible to maintain the neuroprotective steroid levels of the brain, which is why this enzyme is an interesting target for drug development.

The goal of the thesis was to develop a new activity test for the enzyme HSD17β10, which could later be used in screening drug candidates. During the development of the method, scientific publications and in-house experience in the development of similar enzyme activity tests were utilized. The work included analyses of various factors influencing the activity of the enzyme. These analyses were carried out in the 96 well plate format using fluorescence and UPLC methods.

The objectives set for the thesis were realized as a new activity test for the HSD17β10 enzyme was successfully developed as part of the company's drug screening.

KEYWORDS:

Alzheimer's disease, enzyme, HSD17β10, estradiol, inhibitor, enzyme activity test

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	8
1 JOHDANTO	11
2 ENTSYYMIT	12
2.1 Entsyymien toiminta solussa	12
2.2 Substraatit ja kofaktorit	14
2.3 Entsyymit bioteknisestä näkökulmasta	15
2.4 EC-luokat	16
2.5 Inhibiittorit	17
2.5.1 Palautumattomat inhibiittorit	18
2.5.2 Palautuvat inhibiittorit	18
3 ENTSYYMIN KINETIIKKA	21
3.1 Edistymiskäyräanalyysi	21
3.2 Lineaarinen alue	22
3.3 Michaelis-Menten yhtälö	22
4 HSD17B-ENTSYYMIPERHE	25
4.1 HSD17 β -entsyymityypit	25
4.2 HSD17 β 10-entsyymi	26
4.2.1 Mitokondrioiden toimintaproteiini	28
4.2.2 HSD17 β 10-entsyymi osallisena steroidien metaboliassa	30
4.2.3 HSD17 β 10:n merkitys ihmisen sairauksissa	31
5 MENETELMÄT	36
5.1 Analyysilaitteisto	36
5.1.1 Waters Aquity UPLC H-Class System ja UPLC-analyysi	37
5.1.2 Tecan Spark [®] ja fluoresenssimittaus	38
5.2 HSD17 β 10-entsyymien testaus	38
5.3 HSD17 β 10-entsyymiaktiivisuuden optimointi radioleimatulla substraatilla	39
5.3.1 HSD17 β 10-entsyymiaktiivisuuden testaus fluoresenssireaktiossa	40
5.3.2 Proteiinkonsentraation ja inkubointilämpötilan optimointi radioleimatulla substraatilla	41
5.3.3 Substraattipitoisuuden optimointi radioleimatulla substraatilla	42

5.3.4 Kofaktoripitoisuuden optimointi radioleimatulla substraatilla	43
5.3.5 HSD17 β 10-entsyymireaktion kinetiikkamääritys radioleimatulla substraatilla	43
5.4 HSD17 β 10-entsyymiaktiivisuuden inhiboinnin testaus fluoresenssireaktiossa	43
5.4.1 Inhibiittorien seulonta radioleimatulla substraatilla ja fluoresenssireaktiolla	44
5.5 HSD17 β 10-entsyymien uusi seulontamenetelmä	45
5.6 Tulosten käsittely	45
6 TULOKSET	46
6.1 HSD17 β 10-entsyymien testaus	46
6.2 Proteiinikonsentraation ja inkubointilämpötilan vaikutus HSD17 β 10-entsyymien toimintaan	48
6.3 Eri puskurien vaikutus HSD17 β 10-entsyymien toimintaan	49
6.4 Substraatin vaikutus HSD17 β 10-entsyymien reaktioon	52
6.5 Kofaktoripitoisuuden vaikutus HSD17 β 10-entsyymien reaktioon	54
6.6 HSD17 β 10-entsyymien edistymiskäyräanalyysi	55
6.6.1 HSD17 β 10-entsyymien inhibiittorikoe	56
6.6.2 HSD17 β 10-entsyymien inhibiittoreiden seulonta	58
7 POHDINTA	64
LÄHTEET	67

LIITTEET

- Liite 1. Reagenssien tiedot.
- Liite 2. Laitteiden tiedot.
- Liite 3. HSD17 β 10-proteiinin sertifikaatti.

KAAVAT

Kaava 1. Soluissa tapahtuva entsyymien synteesi (von Weymarn 2017, 2–8).	13
Kaava 2. MM-yhtälö (Yun & Han 2020, 12–20).	23
Kaava 3. V_{max} -suhde MM-yhtälössä (Yun & Han 2020, 12–20).	24
Kaava 4. K_m -suhde MM-yhtälössä (Yun & Han 2020, 12–20).	24
Kaava 5. Keskiarvon laskukaava.	45
Kaava 6. Keskihajonnan laskukaava.	45
Kaava 7. Inhibitioprosentin laskukaava (Porkka 2016).	45

KUVAT

Kuva 1. HSD17 β 10-entsyymin kolmiulotteinen rakenne.	12
Kuva 2. Holoentsyymin muodostuminen.	15
Kuva 3. EI-kompleksin (entsyymi-inhibiittori-kompleksin) muodostuminen kompetitiivisen inhibiittorin kiinnittymisen ansiosta.	19
Kuva 4. ESI-kompleksin (entsyymi-substraatti-inhibiittori-kompleksin) muodostuminen substraattiin kiinnittyvän nonkompetitiivisen inhibiittorin ansiosta.	20
Kuva 5. Entsyymiin sitoutuva unkompetitiivinen inhibiittori.	20
Kuva 6. Monosubstraatin peruuttamaton entsyymireaktion kaava.	23
Kuva 7. Neurosteroidien ja isoleusiinin aineenvaihdunnassa tapahtuvat välttämättömät reaktiot HSD17 β 10-entsyymin katalysoinnin ansiosta.	27
Kuva 8. HSD17 β 10 asyyli-CoA-metaboloivana entsyyminä ja oikealla C-6-CoA-substraatin p-hapetusreitti.	29
Kuva 9. Alzheimerin taudin eteneminen.	34
Kuva 10. HSD17 β 10-entsyymi ajan funktiona.	47
Kuva 11. Proteiinikonsentraation ja inkubointilämpötilan vaikutukset HSD17 β 10-entsyymin reaktioon ajan funktiona.	48
Kuva 13. Puskurivertailun, Tris-HCl vs KH ₂ PO ₄ , ja niiden eri pH-arvojen, 5,5; 6,5; 7,5 ja 8,5, vaikutukset HSD17 β 10-entsyymin reaktioon ajan funktiona.	50
Kuva 12. Eri puskurien vaikutukset HSD17 β 10-entsyymin reaktioon ajan funktiona fluoresenssimäärityksenä substraateilla ID 7008 ja ID 7010.	52
Kuva 14. Substraattipitoisuuden vaikutus HSD17 β 10-entsyymin reaktioon eri substraattipitoisuuksilla.	53
Kuva 15. Kofaktoripitoisuuden vaikutus HSD17 β 10-entsyymin reaktioon eri kofaktoripitoisuuksilla.	54
Kuva 16. HSD17 β 10-entsyymin edistymiskäyräanalyysi ajan funktiona.	56
Kuva 17. HSD17 β 10-entsyymin inhibitiomääritys ID 7333 -inhibiittorilla ajan funktiona kolmella eri proteiini- ja inhibitiopitoisuudella fluoresenssimäärityksenä.	57
Kuva 18. HSD17 β 10-entsyymin inhibitiomääritys ID 7333-inhibiittorilla ajan funktiona.	58
Kuva 19. Inhibiittoriryhmä 1: HSD17 β 10-entsyymin inhibiittoreiden seulonta kahdella inhibiittoripitoisuudella.	59
Kuva 20. Inhibiittoriryhmä 2: HSD17 β 10-entsyymin inhibiittorien seulonta kahdella inhibiittoripitoisuudella.	60
Kuva 21. Inhibiittoriryhmä 1: HSD17 β 10-entsyymin inhibiittoreiden seulonta kahdella inhibiittoripitoisuudella.	62
Kuva 22. Inhibiittoriryhmä 2: HSD17 β 10-entsyymin inhibiittorien seulonta kahdella inhibiittoripitoisuudella.	63

TAULUKOT

Taulukko 1. EC-luokat.	17
Taulukko 2. UPLC-analyysien ajo-olosuhteet.	36
Taulukko 3. Monimoodimikrolevylukijalla tehtyjen määritysten mittausolosuhteet.	37
Taulukko 4. HSD17 β 10-entsyymin testausmäärityksen reaktio-olosuhteet.	39
Taulukko 5. Fluoresenssireaktiomäärityksen reaktio-olosuhteet.	41
Taulukko 6. Standardien laimennokset.	41
Taulukko 7. Substraattipitoisuusmäärityksessä käytetyt substraattipitoisuudet.	42

Taulukko 8. Inhibiittorilaimennokset.	44
Taulukko 9. Inhibiittorien seulontamääryyksissä käytetyt ID-numerot.	44
Taulukko 10. Radioleimattujen substraattien ja kofaktorien konversioprosentit 24 h aikapisteessä.	47
Taulukko 11. Proteiinikonversion ja inkubointilämpötilan konversioprosentit eri aikapisteissä.	49
Taulukko 12. Tris-HCl ja KH ₂ PO ₄ -puskurin ja niiden eri pH-arvojen konversioprosentit kahden tunnin aikapisteessä.	51
Taulukko 14. Eri kofaktoripitoisuuksien konversioprosentit 90 minuutin aikapisteessä.	55

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

AKR	Aldo-keto-reduktaasi (Hiltunen ym. 2019, 107–118).
Aktiivinen alue	Entsyymien sitoutumiskohta substraatille ja kilpailevalle inhibiittorille (Reunanen ym. 2006a).
Aktivaatioenergia	Energiamäärä, mikä vaaditaan reaktion käynnistämiseksi (Palmer & Bonner 2011, 67–75).
ALLOP	Allopregnanoloni (C ₂₁ H ₃₄ O ₂) (Yang ym. 2014, 460–472).
CoA	Koentsyymi A (Hiltunen ym. 2019, 107–118).
DHP	5 α -dihydroprogesteroni (C ₂₁ H ₃₂ O ₂) (Yang ym. 2007, 36–42).
DMSO	Dimetyylisulfoksidi (C ₂ O ₆ OS) (Rockinger ym. 2021).
EI-kompleksi	Entsyymi-inhibiittori-kompleksi (CSUSM 2018, 1–7).
ES-kompleksi	Entsyymi-substraatti-kompleksi eli yhdistelmä, jonka entsyymi muodostaa substraatin kanssa (Hayes ym. 1994, 28606–28612).
ESI-kompleksi	Entsyymi-substraatti-inhibiittori-kompleksi (Moura-Tamames 2009, 908–920).
E1	Estroni (C ₁₈ H ₂₂ O ₂) (Vinklarova ym. 2020, 231–243).
E2	Estradioli (C ₁₈ H ₂₄ O ₂) (Vinklarova ym. 2020, 231–243).
ER	Endoplasmakalvosto (Zschocke 2012).
GABA	Gamma-aminovoihappo (C ₄ H ₉ NO ₂) (Vinklarova ym. 2020, 231–243).
GABA _A	Gamma-aminovoihapporeseptori, joka on ionikanavareseptori. (Vinklarova ym. 2020, 231–243).
Inhibiittori	Aine, mikä estää entsyymiä toimimasta (Yang ym. 2014, 460–472).
<i>In vivo</i>	Elämässä tai elävässä eliössä toteutettu tutkimus (Duodecim 2016a).
<i>In vitro</i>	Tutkimus on toteutettu koeputkessa, ei elävässä organismissa (ECHA 2021).
Katalyytti	Aine, mikä vähentää aktivaatioenergiaa samalla nopeuttaen kemiallista reaktiota (Hiltunen ym. 2019, 107–118).
Kofaktori	Aine, mikä ei ole mukana reaktiossa, mutta silti välttämätön entsyymille. Mahdollistaa proteiinosan kanssa entsyymien toimivaksi (Nagel ym. 1992).

Koentsyymi	Kofaktori, mikä on orgaaninen ja isokokoinen (Reunanen ym. 2006b).
Lopputuote	Entsyyminreaktion lopuksi valmistuva tuote, joka muodostuu substraatista (Feng ym. 2021).
NAD ⁺	Hapettunut nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin muoto (C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₄ P ₂) (Kärki 2016, 3–5).
NADH	Pelkistynyt nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin muoto (C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₄ P ₂) (Kärki 2016, 3–5).
NADP ⁺	Hapettunut nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatin muoto (C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃) (Kärki 2016, 3–5).
NADPH	Pelkistynyt nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatin muoto (C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃) (Kärki 2016, 3–5).
Substraatti	Entsyymin aktiiviseen alueeseen kiinnittyvä molekyyli/yhdiste, minkä rakenne muokkautuu entsyyminreaktiossa (Palmer & Bonner 2011a).
SDR	Lyhytkejuinen dehydrogenaasi/reduktaasi (Hiltunen ym. 2019, 107–118).
TCA	Trikloorietikkahappo (C ₂ HCl ₃ O ₂) (Obaleye ym. 2020).
³ H	Tritium eli radioaktiivinen vedyn isotooppi (Augustyn ym. 2018).

1 JOHDANTO

Alzheimerin tauti (AD) on hitaasti etenevä muistisairaus, jonka esiintyvyys kasvaa iän myötä. Kun tauti etenee, potilaan toimintakyky huononee. Ensimmäisinä oireina esiintyy muun muassa vaikeuksia uusien asioiden sisäistämässä ja lieviä tapahtumamuistin häiriöitä, ja taudille ominaista on myös myöhäisemmät oireet, joita ovat esimerkiksi toimintakyvyn heikkeneminen ja ajantajun katoaminen. Taudin aiheuttajalle ei ole löydetty pätevää selitystä. Aivoissa tapahtuu mikrotasolla erilaisia muutoksia (solunulkoisten seiniin plakkien ja neurofibrillikimppujen muodostuminen), jotka aiheuttavat hermoratojen ja aivosolujen vaurioita. Vauriot lähtevät aivoissa sijaitsevista ohimolohkojen sisäosista, joista ne etenevät aivokuoreen asti heikentäen muistia ja tiedonkäsittelyä. (Haltia 1995; Juva 2018; Härmä & Juva 2021, 1–11.)

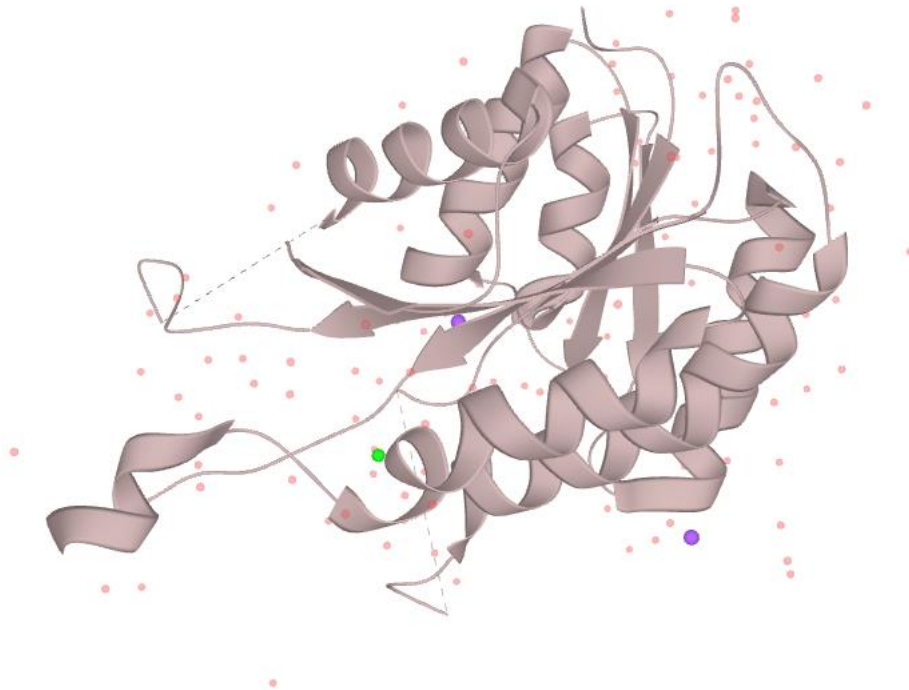
HSD17β10-geenin aktivoinnin tuloksena syntyy HSD17β10-proteiinia (*tyypin II 3-hydroksiasyyli-CoA-dehydrogenaasia*), ja tämä mitokondriaalinen entsyymi pystyy katalysoimaan rasvahappojen, alkoholisten ja steroidien hapettumista. HSD17β10-entsyymiaktiivisuutta on havaittu aivoissa eri osa-alueilla, ja se kykenee katalysoimaan 17β-estradiolia ja allopregnanolonia (ALLOP), jotka ovat neuroaktiivisia steroideja. Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla mitokondrioiden HSD17β10-tasot kohoavat merkittävästi. HSD17β10-entsyymiä inhiboimalla on mahdollisuus säilyttää hermosoluja suojaavat steroiditasot aivoissa. Alzheimerin taudin lisäksi, HSD17β10-entsyymien toimintahäiriöistä tunnetaan synnynnäinen HSD17β10-puute, joka johtaa erilaisiin neurogeneratiivisiin sairauksiin. (Yang ym. 2014, 460–472.)

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää entsyymiaktiivisuustesti HSD17β10-entsyymille. Työn sisältöön kuului tutkimuksen taustateorian kokoaminen, kokeelliset analyysit, tulosten analyysit ja lopuksi pohdinta. Määrityksissä käytetty entsyymi oli tuotettu *Escherichia Coli* -bakteerissa (*E. coli*), ja entsyymien konversiota mitattiin fluoresenssi- ja UPLC-analyysillä 96-kuoppalevyformaattissa.

Opinnäytetyö tehtiin suunnitellulla tavalla ja tavoitteet toteutuivat uuden HSD17β10-entsyymiaktiivisuustestin kehityksessä. Opinnäytetyö toteutettiin yritykselle Forendo Pharma, jonka toimintaperiaatteena on olla edelläkävijä hormonaalisiin mekanismeihin vaikuttavien uusien hoitomuotojen kehittämisessä (Forendo Pharma 2021).

2 ENTSYYMIT

Proteiinit ovat biologisia katalyyttejä, entsyymejä. Proteiinisynteesin avulla solut pystyvät valmistamaan aminohappoja proteiineista, ja monta vaihetta sisältävässä prosessissa aminohapot synnyttävät aminohappoketjuja, jotka voivat kiertyä tai laskostua, vääntyä mutkille ja muodostaa yhtenäisiä entsyymejä. Entsyymien kolmiulotteista (kuva 1) rakennetta määrittää aminohappojärjestys, jonka lisäksi siitä vastaavat esimerkiksi rikkisillat ja vetysidokset. (Reunanen ym. 2006a; Palmer & Bonner 2011, 67–75; von Weymarn 2017, 2–8; Juva 2018; Manubolu ym. 2018, 313–330.)



Kuva 1. HSD17β10-entsyymin kolmiulotteinen rakenne (Lustbader ym. 2004).

2.1 Entsyymien toiminta solussa

Jokainen elävä eliö vaatii entsyymejä toimintaansa ja jokainen solu sisältää tuhansia entsyymejä. Solujen toiminta tapahtuu pääasiallisesti solun sisäpuolella, mutta osa entsyymeistä toimii myös solun ulkopuolella. DNA:n kaksoiskierteen avaavat entsyymit, RNA-polymeraasi ja hydrolaasi, pilkkovat nukleiinihappoja (lukuun ottamatta oksidoreduktaaseja ja transferaaseja) ja ravintoaineita lysosomissa solun sisäpuolella, kun taas

ruoansulatusentsyymit ovat esimerkki solun ulkopuolelle erittyvistä entsyymeistä. Soluissa tuotetaan ja eristetään entsyymejä elimistön tarpeiden mukaisesti (kaava 1), ja solun sisällä olevan tuman geenit ohjaavat entsyymien valmistumista. (Palmer & Bonner 2011b, 44–66; von Weymarn 2017, 2–8.)

Kaava 1. Soluissa tapahtuva entsyymien synteesi (von Weymarn 2017, 2–8).

Genomi → DNA → mRNA → Entsyymi

Ihmisen elimistössä tapahtuvia kemiallisia reaktioita vahvistavat entsyymit, mitkä luokitellaan biologisiksi aineiksi, proteiineiksi, joiden tarkoituksena on saada kemialliset reaktiot nopeutumaan esimerkiksi ihmiskehossa, eli entsyymit toimivat reaktioissa katalyytteinä. Reaktioiden kannalta entsyymejä tarvitaan vain vähän, koska entsyymien katalyyttisen kyvyn ansiosta ne kykenevät nopeuttamaan reaktioita ilman reaktiotasapainon tai termodynamiikan järkkymistä. Reaktionopeus saattaa kasvaa jopa 10^7 – 10^{14} kertaiseksi. (Reunanen ym. 2006a; Palmer & Bonner 2011, 65–75; von Weymarn 2017, 2–8; Feng ym. 2021.)

Ihmiskehon jokaisen solun sisällä on monia entsyymejä, jotka toimivat tietyissä toiminnoissa. Runsaan aktivaatioenergian avulla saadaan biologiset reaktiot käynnistymään, mutta jos entsyymejä ei olisi, suurin osa reaktioista jäisi tapahtumatta. Entsyymit vähentävät aktivaatioenergiaa ja saavat reaktion nopeutumaan, mutta tärkeimpänä tehtävänä niillä on lopputuotteiden (esim. hormonit) tuottaminen. Entsyymien toiminta reaktiossa katalyyttinä ei muuta itse entsyymiä, ja entsyymien kemiallisen reaktion katalyysi määräytyy sen rakenteen pohjalta. (Reunanen ym. 2006a; Palmer & Bonner, 2011, 65–75; von Weymarn 2017, 2–8; Feng ym. 2021.)

Katalyyttiset ja toiminnalliset RNA-molekyylit (ribotsyymit) ovat myös entsyymejä, joita tunnetaan paljon, mutta kuitenkin proteiinit eivät lukeudu näihin (Reunanen ym. 2006a). Ribotsyymit pystyvät katalysoimaan biokemiallisia reaktioita, ja niitä pystytään soveltamaan erilaisten biologisten järjestelmien manipulointiin niiden RNA-molekyyliminaisuuksiensa ansiosta (Park ym. 2019).

2.2 Substraatit ja kofaktorit

Entsyymikatalysoidun reaktion reaktanttia sanotaan substraatiksi, joka on yhdiste, jonka entsyymireaktio pystyy muuttamaan (Duodecim 2016b). Entsyymien luonne on spesifinen, ja jokainen entsyymi vaikuttaa tiettyyn substraattiin tai substraatteihin, jotta se saa tuotettua halutun tuotteen tai tuotteita. Substraatteja ovat muun muassa rasvahapot, sappihapot, estrogeenit, androgeenit, progestogeenit ja kortikosteroidit. Kosubstraatit eli koentsyymit ovat hajoamattomia, niillä on pieni molekyylipaino, eivätkä ne ole proteiinipitoisia orgaanisia yhdisteitä. Koentsyymit ovat mukana entsyymireaktioissa, joissa ne toimivat vastaanottajina tai luovuttajina kemiallisille ryhmille tai elektroneille, ja niillä on orgaaninen rakenne, joka toimii entsyymissä kofaktorin asemassa. (Palmer & Bonner 2011b, 105–125).

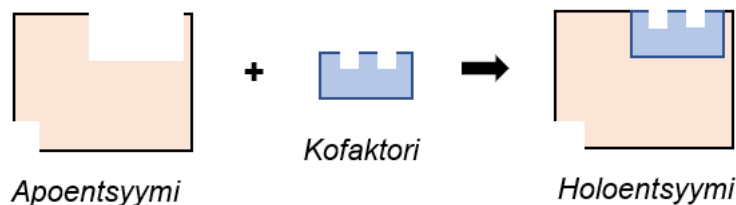
Entsyymi-substraatti-kompleksi eli ES-kompleksi muodostuu yleensä reaktioon, jonka entsyymi on jo katalysoinut. ES-kompleksi muodostuu tyypillisesti aktiiviseen kohtaan entsyymissä, jolloin kemiallinen reaktio käynnistyy. Katalyyttisen aktiivisuuden ja reaktion spesifisyyden määrittää entsyymin aktiivinen kohta. Yleensä entsyymi suosii sille spesifistä eli aktiiviseen kohtaan parhaiten sopivaa substraattia, mutta toisinaan entsyymi voi myös katalysoida toisia rakenteellisesti samankaltaisia substraatteja. (Reunanen ym. 2006a; Porkka 2016, 11–13).

Reaktiossa substraatti muuttuu lopputuotteeksi. Entsyymi poistuu lopputuotteesta, kun reaktio on loppunut, ja yleensä entsyymit toimivat peräkkäisissä reaktioissa katalysoiden niitä. Tämän kaltaisissa tapauksissa ensimmäisen reaktion lopputuotteesta syntyy seuraavalle reaktiolle substraatti. (Hayes ym. 1994, 28606–28612; Reunanen ym. 2006a.) Valitun substraatin, molekyylin tai yhdisteen toimintaan liittyy tietty entsyymi. Ne ovat spesifisiä, tehokkaita, mutta ei myrkyllisiä. (Palmer ja Bonner 2011b, 67–75; von Weymarn 2017, 2–8.)

Komplementaarisuudeksi kutsutaan entsyymin aktiivisen kohdan ja substraatin luomaa kolmiulotteista muodostelmaa. Reaktio vakautuu tämän kolmiulotteisen muodostelman ansiosta, koska entsyymin aktiivinen kohta ja substraatti kiinnittyvät keskenään ei-kovalenttisten vuorovaikutuksien avulla. Entsyymi saattaa ajautua konformaatiomuutokseen sidosenergian johdosta, jota aiheuttaa ei-kovalenttiset vuorovaikutukset. Ne myös vähentävät substraattientropiaa ja saavat aikaan fysikaalista jännitettä eräisiin sidoksiin substraattimolekyylissä. Entsyymin katalyyksille toimiva orientaatio voi mahdollisesti

syntyä konformaatiomuutoksen ansiosta, jolloin eräät toiminnalliset ryhmät sijoittuvat toisenlaiseen järjestykseen. Happo-emäs-katalyyysi ja kovalenttinen katalyyysi ovat myös entsyymeille toimivia katalyyttisiä toimintamekanismeja. (Reunanen ym. 2006a.)

Entsyymien spesifisyys määräytyy normaalisti apoentsyymistä (proteiiniosasta), joka toimii entsyymien rakennusaineena. Kun kyse on entsyymiaktiivisuudesta, sille välttämättömä voi olla entsyymirakenteen jokin molekyyliosaa. Tämän kaltaista molekyyliosaa sanotaan kofaktoriksi. Kofaktorit jaetaan kahteen ryhmään: epäorgaanisiin ja orgaanisiin. Epäorgaaninen kofaktori voi olla esimerkiksi metalli-ioni (esimerkiksi sinkki, rauta ja kupari) tai orgaaninen suurikokoinen koentsyymi. Kofaktorit muuntavat entsyymien aktiivista aluetta (kiinnityskohtaa) substraatille suotuisaksi, ja joidenkin entsyymien aktiivisuuden saavuttamiseen vaaditaan sekä metalli-ioniä että koentsyymiä. Prosteettinen ryhmä muodostuu metalli-ionista ja koentsyymistä, jotka ovat kiinnittyneet entsyymiin kovalenttisiin sidoksiin, ja holoentsyymi on nimitys entsyymille, joka on täydellinen ja katalyyttisesti aktiivinen. Kofaktori sitoutuu apoentsyymiin, joka on toiminnallisesti inaktiivinen, muodostaen holoentsyymien (kuva 2). Entsyymistä syntyy epävakaa tai se ei laskostu kunolla, jos kofaktoreita ei ole sitoutuneena siihen. (Nagel ym. 1992, 150; Hashim & Adnan 1994, 93–94; Reunanen ym. 2006a.)



Kuva 2. Holoentsyymien muodostuminen (mukaillen Chen ym. 2003, 63–71; Haynes 2010, 8).

2.3 Entsyymit bioteknisestä näkökulmasta

Aiemmin entsyymejä on tuotettu uuttaen eläimen tai kasvimateriaalien osia, mutta nykyään iso osa entsyymeistä tuotetaan mikrobisolujen avulla hallituissa olosuhteissa tehdasympäristössä. Solut pystyvät tuottamaan entsyymejä intrasellulaarisella (solun sisällä) tai ekstrasellulaarisella (solun ulkopuolella) tavalla, joista ekstrasellulaarinen tapa

on helpompi toteuttaa prosessiteknisellä tasolla, mutta tuotto voi silti olla vaikeaa. (Artin 2015, 19; von Weymarn 2017, 2–8.) Solut ovat entsyymeille toivotuin vaihtoehto, sillä soluissa on otollisimmat olosuhteet. Teollisissa olosuhteissa esimerkiksi pH-arvo, lämpötila ja suolapitoisuus on entsyymeille todella voimakasta. Tämän takia päästään harvoin tavoiteltuihin tuottotasoihin. (Villikka 2012, 8.)

Entsyaattinen reaktio tapahtuu nesteessä tai rajapinnassa, jossa entsyymi, substraatti ja syntyneet tuotteet sekoittuvat keskenään. Entsyymeillä on omat optimaaliset olosuhteensa, joihin sisältyy esimerkiksi pH-arvo ja lämpötila. Optimaalisilla olosuhteilla tarkoitetaan entsyymille parhaimpia olosuhteita toimia toivotulla tavalla, ja jokaiselle entsyymille on myös määräytynyt oma tehtävänsä. Entsyymi-substraattispesifisyydellä tarkoitetaan entsyymien kykyä käyttää tiettyjä spesifisiä substraatteja. (Palmer & Bonner 2011b, 67–75; von Weymarn 2017, 2–8.)

Luo ym. (1995) aloittivat HSD17 β 10-proteiinin puhdistamisen rotan maksasta ja isoleusiinimetaboliasta, ja kloonaus tapahtui lyhyketjuisena 3S-hydroksiasyyli-CoA-dehydrogenaasina (SCHAD), joka oli osallisena β -hapetuksessa. Tämä seulonta mahdollistettiin hyödyntämällä ihmisen maksan cDNA-kirjastoa, ja vastaava proteiini saatiin kloonattua naudan maksan cDNA-ilmentymiskirjaston seulonnoissa, kun hyödynnettiin puhdistettua HSD17 β 10-proteiinia vastaan muodostettua vasta-ainetta. (Luo ym. 1995, 214–220; Hiltunen ym. 2019, 107–118.)

2.4 EC-luokat

Entsyytikomissiojärjestelmän (EC) on perustanut kansainvälinen biokemian ja molekyylibiologialiiton nimikkeistökomitea. Järjestelmässä luokitellaan entsyymien toiminta hierarkkisessa neljän kokonaisluvun järjestelmässä, jossa kuvataan kemiallisia reaktioita. Ensimmäisen numeron luokituksessa entsyymit jaetaan kuuteen eri luokkaan: oksidoreduktaasit, transferaasit, hydrolaasit, lyaasit, isomeraasit ja ligaasit (taulukko 1), ja jokaiseen luokkaan kuuluu oma alakategoria, joka merkitään toisella kokonaisluvulla. Alaluokkien määrä saattaa vaihdella eri luokissa, ja ne sisältävät myös alakategoriat, jotka merkitään kolmannella numerolla, ja viimeinen numero määrittää entsyymien substraatin. Tutkijat ovat hyödyntäneet EC-numeroa tutkiessaan entsyymiluokituksia. (Rahimi ym. 2013, 36–43.)

Taulukko 1. EC-luokat.

EC-luokka	Entsyymiryhmä
1	Oksidoreduktaasit
2	Transferaasit
3	Hydrolaasit
4	Lyaasit
5	Isomeraasit
6	Ligaasit

Oksidoreduktaasit-entsyymiluokka (EC 1) katalysoivat kemiallisen aineen hapettumista pelkistysreaktion kanssa (Wei ym. 2020, 183–206). Transferaasit (EC 2) liikuttavat funktionaalisen ryhmän (metyyli- tai fosfaattiryhmä) yhdisteestä (luovuttaja) seuraavaan (vastaanottaja) (Gupta ym. 2013, 183–217). Hydrolaasit (EC 3) toimivat sidosten katkaisureaktioiden (hydrolyysi) katalysoinnissa (Paul & Fernández 2016). Lyaasit (EC 4) pilkkovat eliminoimalla sidoksia (esim. C–C, C–O, C–N) muodostaen monia sidoksia ja renkaita (Vaidya & Annapure 2018, 659–674). Isomeraasit (EC 5) katalysoivat reaktioita, joissa molekyylit uudelleenjärjestyvät rakenteellisesti. Viimeinen entsyymiluokka, ligaasit (EC 6), pystyvät yhdistämään katalysoimalla kaksi suurta molekyyliä reaktiossa kovalenttisella sidoksella. Ne luovat uuden kemiallisen sidoksen joko samalla hydrolysoimalla pienen kemiallisen ryhmän isosta molekyylistä tai yhdistäen kaksi yhdistettä (esim. C–O, C–S, C–N). (Manubolu ym. 2018, 313–330.) HSD17 β 10-entsyymi luokitellaan EC 1-luokkaan eli oksidoreduktaaseihin, jotka katalysoivat kemiallisen aineen hapettumista yhdessä pelkistysreaktion kanssa (He ym. 2000, 139–143; Wei ym. 2020, 183–206).

2.5 Inhibiittorit

Entsyymeillä on erilaisia inhibiittoriaineita, jotka vaikuttavat entsyymien toimintaan. Ne ovat molekyyliä, jotka sitoutuvat entsyymiin, ja estävät tai hidastavat entsyymin toimintaa. Lääkeaineiden kehityksessä inhibiittorien toimintamekanismit ovat tärkeässä osassa, ja niihin kuuluvat esimerkiksi inhibiittoreiden rakenteiden vaikutukset. Inhibiittorit voidaan jakaa kahteen luokkaan niiden toiminnan perusteella: palautumattomiin ja palautuviin inhibiittoreihin. (Reunanen ym. 2016.)

2.5.1 Palautumattomat inhibiittorit

Kun inhibiittorin ja entsyymin välille muodostuu kovalenttisia sidoksia, puhutaan niin sanotusti palautumattomista eli itsemurhainhibiittoreista. Sitouduttuaan entsyymiin inhibiittorit voivat muuttua reaktiivisiksi yhdisteiksi, jotka pystyvät sitoutumaan seuraavaan entsyymiin erittäin tiukasti kovalenttisin sidoksin. Tämän kaltaiset inhibiittorit pystyvät estämään entsyymiaktiivisuuden palautumattomasti, eikä inhibiittoria pystytä poistamaan entsyymistä. Palautumattomia inhibiittoreita kutsutaan myös mekanismiin perustuviksi inaktivaattoreiksi, koska ne hyödyntävät entsyymien normaalia reaktiomekanismia. Joissain tapauksissa inhibiittori pystytään poistamaan entsyymistä, kun lisätään toinen komponentti reaktioseokseen, mutta tällä ei kyetä vaikuttamaan entsyymien alkuperäiseen toimintaan. (Reunanen ym. 2016; Laine 2017, 25–26.)

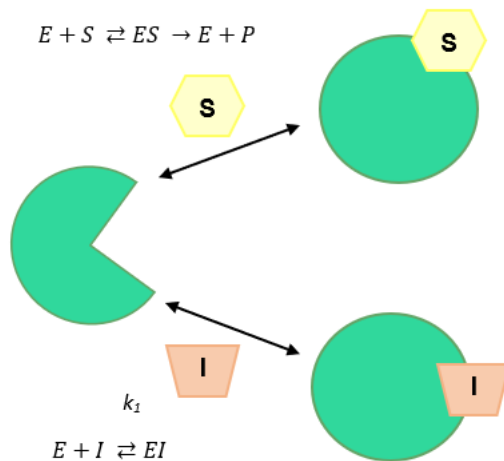
2.5.2 Palautuvat inhibiittorit

Palautuvat inhibiittorit sitoutuvat entsyymiin heikosti ei-kovalenttisin sidoksin, jolloin ne pystytään poistamaan dialyysillä tai laimennoksella, ja tällöin saadaan palautettua täydellinen entsyymiaktiivisuus. Normaalisti palautuvat inhibiittorit kykenevät muodostamaan nopealla tahdilla tasapainojärjestelmän entsyymien kanssa, jolla saavutetaan tietty inhibitiotaso. Inhibitio pysyy vakiona koko ajanjakson ajan, johon vaikuttaa entsyymien, inhibiittorin ja substraatin konsentraatiot. (Laine 2017, 25–26.) Kompetitiivinen (kilpaileva), nonkompetitiivinen (kilpailematon) ja unkompetitiivinen inhibitio kuvaavat palautuvan inhibitiion sitoutumismuotoja, joita esitellään seuraavissa kappaleissa (Reunanen ym. 2016).

Kompetitiiviset inhibiittorit

Kompetitiivisten inhibiittorien ja substraatin välillä tapahtuu kilpailua entsyymien aktiiviseen kohtaan sitoutumisesta (Reunanen ym. 2016). Kompetitiiviset inhibiittorit ovat rakenteeltaan lähes samankaltaisia kuin substraatit, minkä ansiosta ne pystyvät kilpailemaan samasta sitoutumiskohdasta entsyymissä, ja tällöin muodostuu entsyymi-inhibiittorikompleksiksi, jolloin entsyymiin ei sitoudu oikeaa substraattia (kuva 3). Entsyymien toiminta on tällöin estynyt eli entsyymi on inhiboitu. Substraatin määrää kasvattamalla

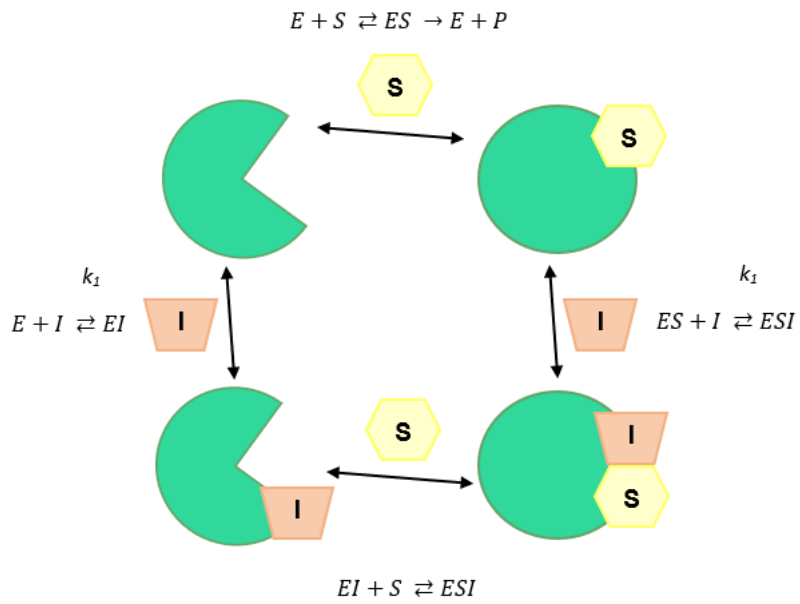
suhteessa inhibiittoriin pystytään kumoamaan kompetitiivinen inhibitio. (Reunanen ym. 2016; Laine 2017, 25–26.)



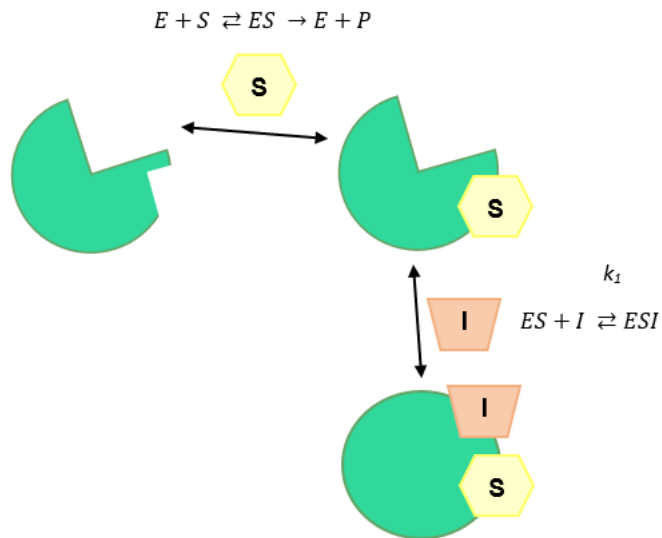
Kuva 3. EI-kompleksin (entsyymi-inhibiittori-kompleksin) muodostuminen kompetitiivisen inhibiittorin kiinnittymisen ansiosta (mukaiillen CSUSM 2018, 1–7).

Nonkompetitiiviset ja unkompetitiiviset inhibiittorit

Entsyymien aktiivisen kohdan ulkopuolelle sitoutuvat nonkompetitiiviset ja unkompetitiiviset inhibiittorit. Reaktiotuotetta ei muodostu, jos molemmat molekyylit ovat mukana, mutta substraatti pystyy silti kiinnittymään entsyymien aktiiviseen kohtaan. Nonkompetitiiviset inhibiittorit sitoutuvat ainoastaan entsyymiin tai ES-kompleksiin (entsyymi-substraatti-kompleksi, kuva 4), ja unkompetitiiviset inhibiittorit pystyvät sitoutumaan vain ES-kompleksiin, jolloin ne estävät reaktiotuotetta muodostumasta (kuva 5). ES-kompleksi muodostuu entsyymien ja substraatin kokonaisuudesta (Moura-Tamames ym. 2009, 908–920.). Kompetitiiviselle inhibitiolle saadaan muutos, kun lisätään substraatin määrää suhteessa inhibiittorin määrään, jolloin inhibitio kumoutuu, mutta unkompetitiivistä inhibitiota ei pystytä kumoamaan samalla tavalla eli substraattipitoisuuden nostamisella ei ole vaikutusta. (Reunanen ym. 2016; Laine 2017, 25–26.)



Kuva 4. ESI-kompleksin (entsyymi-substraatti-inhibiittori-kompleksin) muodostuminen substraattiin kiinnittyvän nonkompetitiivisen inhibiittorin ansiosta (mukaillen CSUSM 2018, 1–7).



Kuva 5. Entsyymiin sitoutuva unkompetitiivinen inhibiittori (mukaillen CSUSM 2018, 1–7).

3 ENTSYIMIN KINETIIKKA

Molekyyleissä esiintyy kemiallista kinetiikkaa, ja kemialliset reaktiot pystytään luokittelemaan molekyylipainon tai järjestyksen mukaisesti. Muuttuneiden molekyylilien lukumäärä kertoo reaktion molekyylisyyden, millä tarkoitetaan reagoivien lähtöaineiden (reaktanttien) molekyylilien määrää normaalissa reaktiovaiheessa. Reaktion kinetiikkaa pystytään kuvaamaan järjestyksellä. Se pysyy yleensä samana molekyylipitoisuuteen nähden yksivaiheisessa yksinkertaisessa reaktiossa ja monivaiheisessa kompleksisessa reaktiossa. Monimutkaisemmissa reaktioissa järjestyksen määrittäminen ei ole olennaista, koska entsyymaattisen reaktion nopeutta ei yleensä ilmoiteta pitoisuuden tulona. Esimerkki ensimmäisen asteen yksimolekyylisestä reaktiosta on ES-kompleksin muuntuminen tuotteiksi tai välituotteeksi, ja toisen asteen biomolekyylireaktiosta on substraattimolekyylin sitoutuminen entsyymimolekyyliin. (Cornish-Bowden 1979, 1–15.)

Integroinnilla pystytään tulkitsemaan tuloksia. Kun kineettisiä yhtälöitä integroidaan, täytyy olla selvillä integraation vakiot ja niiden laskut, koska ne harvoin ovat arvoltaan nolla, mutta kuitenkin jotkin reaktiot voivat olla nolla astetta. Tällöin nopeus on vakio riippumatta reagoivan aineen pitoisuudesta. Reaktion järjestys pystytään määrittämään mitaamalla nopeutta reagenssien eri pitoisuuksilla. Entsyymikineettisiä tuloksia ja algebrallisia virheitä havaitaan ja tarkastellaan ulottuvuusanalyysin avulla. Lämpötilalla on suuri vaikutus reaktioiden nopeuksiin. (Cornish-Bowden 1979, 1–15.)

3.1 Edistymiskäyräanalyysi

Edistymiskäyräanalyysi (Progress Curve) on graafisesti toteutettu kuvaaja, josta ilmenee kemiallisen reaktion tai entsyymin katalysoiman reaktion edistyminen. Edistymiskäyräanalyysissä tuotteen pitoisuus, substraatin pitoisuus tai kaksiosainen ES-kompleksi piirretään ajan funktiona. (Biology Online 2021.) Edistymiskäyräanalyysillä pystytään karakterisoimaan entsyymitoimintaa, jossa yhdellä reaktioseoksella pystytään tuottamaan monia kokeellisesti mitattuja pisteitä jatkuvasti vaihteleville määrille substraatteja ja tuotteita entsyymikonsentraation ja muiden pitoisuuksien pysyessä muuttumattomina. (Nikolova ym. 2008, 345–346.)

Tätä menetelmää hyödynnettiin tässä opinnäytetyössä määrittämään tuotteen muodostumisnopeutta. Entsyymi sitoutuu substraattiin ja samalla se saattaa vähentää tuotteen

muodostumisnopeutta tietyissä olosuhteissa, mutta päinvastainen vaikutus on myös mahdollinen. Kun substraattikonsentraatiot kasvavat, pystytään saavuttamaan sitoutumisnopeuden kasvu, joka johtaa reaktionopeuden nousuun eikä laskuun. (Shlomi ym. 2014, 4391–4396.)

3.2 Lineaarinen alue

Lineaarisella alueella kuvataan sellaista pitoisuusaluetta, jossa analyytin näytepitoisuus on suoraan verrannollinen signaaleihin. Jokaiselle määrittämiselle tulee selvittää oma lineaarinen alue ja matriisi. Lineaarisella alueella voi olla erilaisia kriteerejä ja lineaarisen alueen saattaa pystyä selvittämään lineaarisuuden arviointikokeiden pohjalta. Yleensä lineaarisen alueen halutaan olevan 0–150 % tai 50–150 % analyytin toivotusta pitoisuudesta. Pienemmät pitoisuudet ja näytelaimennokset mahdollistavat lineaarisen alueen laajenemisen, mutta tällöin myös analyytin signaalin tulee olla tarpeeksi voimakas. (University of Tartu 2021.)

Tätä menetelmää hyödynnettiin tässä opinnäytetyössä määrittämään lineaarinen mitta-alue. Lineaarisen mitta-alueen määrittämisellä selvitetään missä vaiheessa konsentraation lisäys ei enää vaikuta signaalitasoon. Tässä vaiheessa signaalitaso voi mahdollisesti jopa laskea, vaikka mitattavan aineen pitoisuus kasvaa. (University of Tartu 2021.)

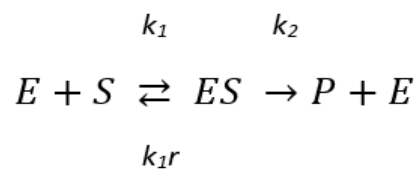
3.3 Michaelis-Menten yhtälö

Michaelis-Menten yhtälöä (MM-yhtälö) kuvataan kahdella vakiolla: Michaelis-vakio (K_m) ja suurin reaktionopeus (V_{max}), jotka antavat tietoja entsyymin ominaisuuksista sen ollessa tietyssä tilassa. Alkunopeuskokeen ja aikakokeen avulla pystytään arvioimaan näitä vakioita. Alkunopeuskoetta hyödynnetään useammin, koska se vähentää palautuvaa reaktiota, entsyymin epävakautta ja tuotteen inhibition aiheuttamia häiriöitä. (Palmer & Bonner 2011a, 105–125; Yun & Han 2020, 12–20.)

Nopeuskokeissa MM-yhtälö kuvaa useimmin substraatin alkuperäisen pitoisuuden $[S]_0$ ja alkureaktion nopeuden v_0 suhdetta. Entsyymimäärittämisissä pystytään selvittämään reaktio-olosuhteiden alueita, joihin kuuluu: lämpötila, puskuripitoisuus, pH-arvo ja substraattikonsentraatio, mutta entsyymikonsentraatiolle ei ole reaktio-olosuhteiden

alueita. Entsyymikonsentraatio tulee määrittää kokeiden avulla, jotta saadaan alkunopeus mitatuksi, ja jos entsyymin stabiilisuus on todella alhainen tai reaktio etenee hitaasti, on suositeltavaa nostaa entsyymikonsentraatiota korkeammaksi. Korkeampi entsyymikonsentraatio vaikuttaa mittausherkkyyteen positiivisesti parantaen sitä. (Palmer & Bonner 2011a, 105–125; Yun & Han 2020, 12–20.)

Monosubstraatin peruuttamattomasta entsyymireaktiosta pystytään luomaan kaava (kuva 6), jossa E kuvaa entsyymiä, S substraattia, ES entsyymisubstraattikompleksia ja P tuotetta. Reaktion yhtenäisyyttä kuvaavat nopeusvakiot k_1 , k_{1r} ja k_2 . (Palmer & Bonner 2011a, 105–125; Yun & Han 2020, 12–20.)



Kuva 6. Monosubstraatin peruuttamaton entsyymireaktion kaava (Yun & Han 2020, 12–20).

Kaavaan pystytään soveltamaan massatoimilakia, jolloin yhtälöstä muutetaan differentiaaliyhtälö (HMM-järjestelmä), joka pystytään pienentämään MM-yhtälöksi (kaava 2), jossa v_0 kuvaa alkureaktion nopeutta, $[S]_0$ substraatin alkupitoisuutta, K_m Michaelis-vakiota ja V_{max} reaktion suurinta nopeutta. (Palmer & Bonner 2011a, 105–125; Yun & Han 2020, 12–20.)

Kaava 2. MM-yhtälö (Yun & Han 2020, 12–20).

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0}$$

Kaavasta 2 pystytään määrittämään myös K_m ja V_{max} suhteet (

kaava 3 ja kaava 4), joissa $[E]_0$ kuvaa alku- tai kokonaisentsyymireaktiota. (Palmer & Bonner 2011b, 105–125; Yun & Han 2020, 12–20.)

Kaava 3. V_{max} -suhde MM-yhtälössä (Yun & Han 2020, 12–20).

$$V_{max} = k_2 [E]_0$$

Kaava 4. K_m -suhde MM-yhtälössä (Yun & Han 2020, 12–20).

$$K_m = \frac{k_1 r + k_2}{k_1}$$

4 HSD17B-ENTSYYMIPERHE

HSD17 β -entsyymiperheeseen kuuluu hydroksisteroidi-17-beta-dehydrogenaasientsyymit, jotka katalysoivat hydroksyyli- tai ketoryhmien NAD (P)⁺ (H) -riippuvaista hapettumista ja pelkistymistä. Niiden tehtävänä on ylläpitää androgeeni- ja estrogeenitasapainoa ja säädellä steroidihormoniligandien solunsisäistä saatavuutta tumaydinreseptoreihin. Tämä mahdollistaa kontrollimekanismin, jossa HSD17 β -entsyymit katalysoivat aktiivisia 17 β -hydroksisteroideja vähemmän aktiivisiksi 17-oksteroideiksi tai toisinpäin, ja näin säätelevät steroidihormonitasoja. Monet HSD17 β -perheeseen kuuluvat entsyymit ovat katalyyttisesti aktiivisia myös muiden kuin sukupuolihormonien kanssa. Osa entsyymiperheen jäsenistä pystyy myös prosessoimaan esimerkiksi retinoleja ja karboksyylihappoja. (Hiltunen ym. 2019, 107–118.)

4.1 HSD17 β -entsyymityypit

Karakterisoituja nisäkkään HSD17 β -entsyymejä on 14. Poikkeuksena HSD17 β 5, joka kuuluu aldo-keto-reduktaasi (*Aldo-keto reductase, AKR*) perheeseen. Koko entsyymiperhe kuuluu lyhytketjuiseen dehydrogenaasi/reduktaasi (*short-chain dehydrogenase/reductase, SDR*) perheeseen. Nukleotidikofaktori- ja substraattispesifisyys, solun sisäinen ilmentyminen ja kudosspesifisyys ovat ihmisellä esiintyvien HSD17 β -perheenjäsenien erilaisuuksien syinä. HSD17 β -entsyymien dehydrogenaasiyksiköillä (DH) on kanoninen Rosmann-taitto, joka mahdollistaa rakenteellisen telineen sitoutumispaikkaan joko NAD (P)⁺ -riippuvaiselle dehydrogenaasille tai NAD (P) H -riippuvaiselle reduktaasille. Rosmann-taittuva dinukleotidisidos koostuu seitsemästä yhdensuuntaisesta säikeestä, joita reunustavat kuusi α -heliksia, jota kutsutaan β -kalvoksi (Vinklarova ym. 2020, 231–243).

HSD17 β -perheenjäsenet ovat jaoteltu suurimmilta osin *in vivo* -oksidatiivisiksi entsyymeiksi, joita ovat HSD17 β -tyypit 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 ja 14, ja ne katalysoivat NAD (P)⁺ -riippuvaista steroidireseptoriligandien inaktivaatiota. *In vivo* -reduktiivisiksi entsyymeiksi on luokiteltu HSD17 β -tyypit 1, 3, 5, 7, 12 ja 13, jotka ovat NAD (P) H -riippuvaisia entsyymejä, joiden reaktiot tuottavat steroidireseptoriligandeihin. (Szajnik ym. 2012, 587–594; Hiltunen ym. 2019, 107–118; Su ym. 2019, 119–125.) HSD17 β -entsyymiperheen

kaikki jäsenet ovat myös osallisina joissakin syöpätyypeissä, esimerkiksi rintasyövässä, kohdun limakalvon syövässä ja eturauhassyövässä (Vinklarova ym. 2020, 231–243).

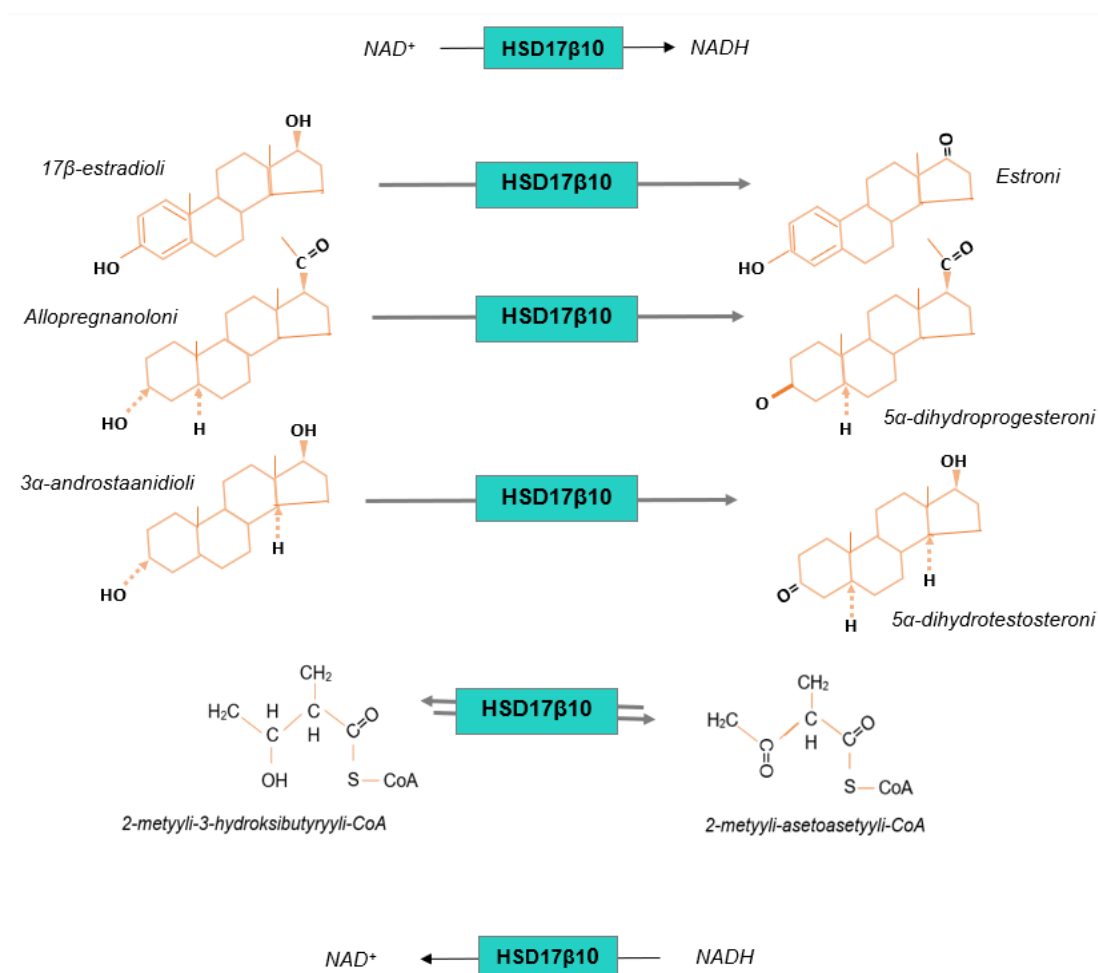
HSD17 β -tyypit 4, 8, 10 ja 12 pystyvät prosessoimaan tioestereitä ja karboksyylihappoja, osallistuvat rasvahappojen peroksisomaaliseen β -hapettumiseen, 3R-hydroksiasyyliiryhmien mitokondrioiden hapettumiseen, isoleusiinin hajoamiseen ja rasvahappoketjun pidentymiseen endoplasmassa. Ne myös mahdollistavat reaktion tapahtumisen välittäjäaineenvaihdunnassa. Evoluution aikaansaannoksen johdosta entsyymit eroavat substraattien hyödyntämisen suhteen, missä katalyyttinen kohta on muuttunut adaptiiviseksi. HSD17 β 4-entsyymi syntyy geenifuusion avulla, kun taas HSD17 β 8- ja HSD17 β 10-entsyymi ovat liitettyinä monitoimintoihin proteiinikomplekseihin. HSD17 β -tyyppien: 4, 8 ja 10 kristallirakenteiden avulla pystytään saamaan käsitys niiden rakenne-funktio-suhteesta. (Lukacik ym. 2006, 61–71; Hiltunen ym. 2019, 107–118.)

HSD17 β -entsyymien toiminnallisten roolien määrittäminen estrogeeni- ja androgeenitasapainossa fysiologisissa olosuhteissa on ollut vaikea tutkimuskohde. HSD17 β -tyyppien ilmeneminen ei liity ainoastaan steroidogeenisiin kudoksiin ja proteiinimäärät ovat vaihtelevat. Karakterisointi on osoittanut, että useimmilla HSD17 β -entsyymeillä on sukupuolisteroideihin kohdistuvan vaikutuksen lisäksi katalyyttistä aktiivisuutta myös muiden steroidisubstraattien kanssa, joita ovat: retinolit, kolesteroli, sekundääriset alkoholit ja ketonit, ksenobiotit ja erilaiset pitkäketjuisten karboksyylihappojen tioesterit (rasvahapot ja niiden metaboliitit). (Lukacik ym. 2006, 61–71; Hiltunen ym. 2019, 107–118.)

4.2 HSD17 β 10-entsyymi

HSD17 β 10-geenin aktivoinnin tuloksena syntyy tyypin II 3-hydroksiasyyli-CoA-dehydrogenaasia eli HSD17 β 10-proteiinia, joka kuuluu SDR-suurperheeseen. Aikaisemmin tämä proteiini on tunnettu myös nimillä SC-HMAD (lyhytketjuinen L-3-hydroksi-2-metyyliasyyli-CoA-dehydrogenaasi), HADH₂ (tyypin II hydroksiasyyli-koentsyymi A-dehydrogenaasi) ja SCHAD (lyhytketjuinen 3-hydroksiasyyli-CoA-dehydrogenaasi). (Luo ym. 1995, 214–220; Korman and Yang 2007, 115; Yang ym. 2014, 460–472.) HSD17 β 10 on monitoiminen dehydrogenaasi, joka toimii eri reiteissä ja prosesseissa mitokondriossa. Ihmisellä HSD17 β 10-geeni sijaitsee kromosomissa X, paikassa 11.2. Se koostuu kuudesta eksonista ja viidestä intronista. Geenituotteena toimii mitokondrioproteiini, joka pystyy katalysoimaan monien rasvahappojen ja steroidien hapettumista (kuva 7), ja se

on mitokondrioiden ribonukleaasi P:n alayksikkö, joka on mukana tRNA:n (*transfer-RNA*) kypsymisessä. (Yang ym. 2014, 460–472.)



Kuva 7. Neurosteroidien ja isoleusiinin aineenvaihdunnassa tapahtuvat välttämättömät reaktiot HSD17β10-entsyymin katalysoinnin ansiosta (mukailten Yang ym. 2007, 36–42; Vinklarova ym. 2020, 231–243).

Proteiini on yhdistetty Alzheimerin taudin kehittymiseen, koska se pystyy sitomaan taudin puhkeamiseen osallistuvan amyloidi-beeta ($A\beta$) peptidin, ja aminohappoalue, silmukka D, mahdollistaa $A\beta$:n sitoutumiskohtaan. Muilla SDR-perheeseen kuuluvilla entsyymeillä ei ilmene kyseistä sitoutumiskohtaa. (Vinklarova ym. 2020, 231–243.) Geeni-mutaatiot taas ovat syynä HSD17β10 puutteeseen. Monia transkriptiomuunnelmia on tunnistettu, mutta koko luonne on pystytty määrittämään ainoastaan kahdelle transkriptiomuunnelmalle. (Yang ym. 2014, 460–472.)

4.2.1 Mitokondrioiden toimintaproteiini

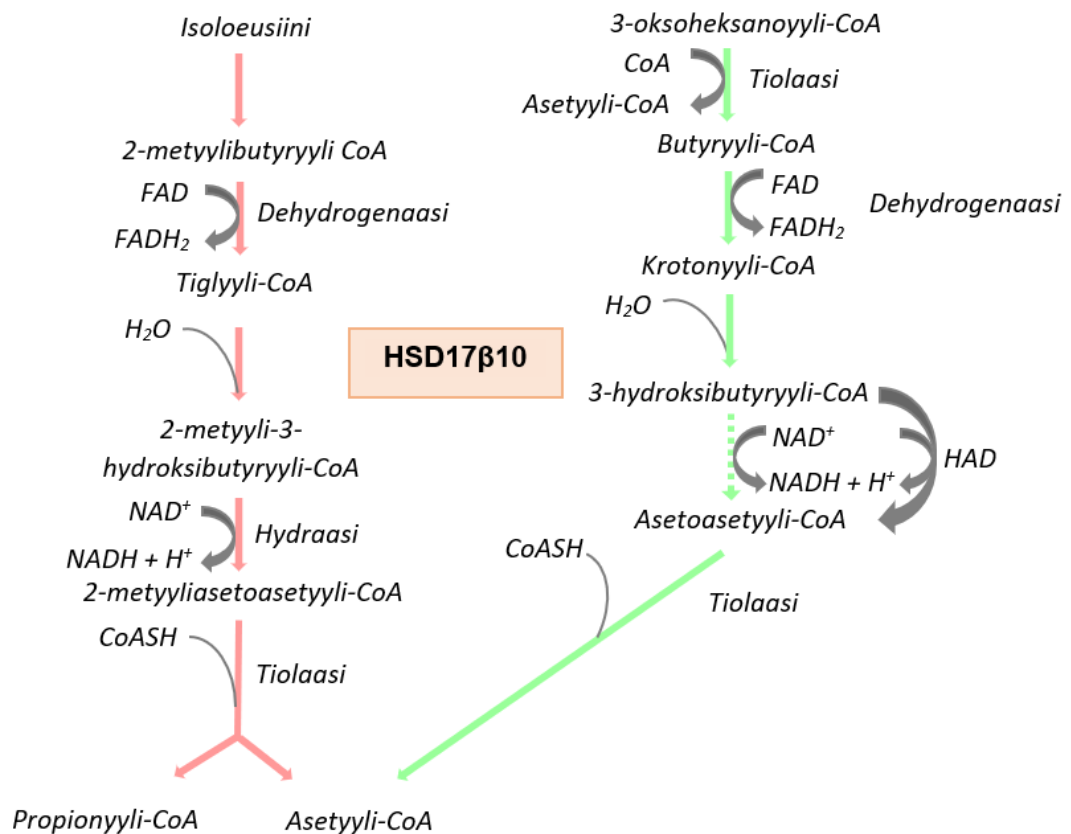
HSD17 β 10-proteiini koostuu neljästä toisistaan identtisistä alayksiköistä, muodostaen homotetrameerin, joista jokainen sisältää aktiivisen kohdan, ja sen molekyylipaino on 108 kDa. Alayksiköt taas koostuvat jokainen aminohappolähteistä, joita on 261. (Vinklarova ym. 2020, 231–243.)

Aluksi HSD17 β 10:n luultiin esiintyvän endoplasmakalvostolla (*endoplasmic reticulum, ER*), mutta myöhemmillä tutkimuksilla osoitettiin, että proteiini on mitokondrioproteiini. (Zschocke 2012; Yang ym. 2014, 460–472.) Tämä dehydrogenaasi on NAD⁺-riippuvainen ja se kykenee muuttamaan aktiivisen kohdan avulla monia erilaisia substraatteja. Aivoissa tämän kyseisen entsyymin epäillään osallistuvan synaptisten toimintojen ylläpitoon. Hermosolujen välinen viestintä tapahtuu postsynaptisten kompleksien avulla, ja kompleksit ovat myös keskeisessä asemassa synaptisen ja käyttäytymisen plastisuutta välittävien signaalien vastaanottamisessa ja prosessoinnissa. Postsynaptinen tiheys (*postsynaptic density, PSD*) sisältää mahdollisesti 1124 proteiinia, ja siksi sitä kutsutaan suurimmaksi kompleksiksi. HSD17 β 10 on yksi mitokondrioiden entsyymeistä, joka on tunnistettu PSD:ssä. (Yang & He 2007, 36–42.) Yksi tunnetuimmista metabolisista entsyymeistä on alkoholidehydrogenaasi (ABAD), joka sitoo mitokondrioiden amyloideja, ja tämä entsyymi on toiselta nimeltään HSD17 β 10. (Hroch ym. 2016, 3675–3678.)

Ihmisillä, jotka kärsivät 2-metyyli-3-hydroksibutryyli-CoA-dehydrogenaasin (MHBD) puutteesta, on HSD17 β 10-proteiinin puutostila. Tällöin muodostuu orgaanista happamuutta epätavallisella neurogeneratiivisella tavalla. (Rauschenberger ym. 2010, 51–62). Tämä mitokondrioiden isoleusiinin hajoamisreitin synnynnäinen virhe on häiriö, joka aiheuttaa isoleusiinin hajoamistuotteiden 2-metyyli-3-hydroksibutyyraatin ja tiglyyliglysiinin kertymistä elimistöön. Näillä ihmisillä HSD17 β 10 oli myös mutatoitunut, joka johti HSD17 β 10 puutostilaan. (Yang ym. 2014, 460–472; Hiltunen ym. 2019, 107–118.)

HSD17 β 10, mitokondrioiden lyhytketjuinen asyyli-CoA-dehydrogenaasi (SHADH), sisältää kineettisiä ominaisuuksia, jotka osoittavat korkean katalyyttisen tehon lyhytketjuisten 3-hydroksiasyyli-CoA-substraattien kanssa, ja proteiini toimii myös sellaisten lyhytketjuisten substraattien kanssa, joilla metyyliiryhmä sijaitsee asyyliketjun toisessa hiilessä. Mitokondrioiden 3-hydroksiasyyli-CoA-dehydrogenaasit (HAD), jotka eivät ole aktiivisia substraatin suhteen ja omaavat 2-metyyliiryhmän, kineettiset ominaisuudet ovat jokseenkin päällekkäiset HSD17 β 10:n aktiivisuusprofiiliin kanssa. Päällekkäisyys ilmenee

suoraketjuisten 3-hydroksiasyyli-CoA-substraattien suhteen, joilla ei ole metyyliiryhmää, ja tämän vuoksi isoleusiinin hajoamiseen tarvitaan päätekijäksi HSD17 β 10-proteiinia, joka kykenee muodostamaan 2-metyylihaaroittuneen välituotteen hajoamisreitille (kuva 8). (Yang ym. 2014, 460–472; Hiltunen ym. 2019, 107–118.)



Kuva 8. HSD17 β 10 asyyli-CoA-metaboloivana entsyyminä ja oikealla C-6-CoA-substraatin p-hapetusreitti (mukaillen Hiltunen ym. 2019, 107–118).

HSD17 β 10-proteiinin ominaisuudet on karakterisoitu, ja sen ansiosta on selvinnyt, että proteiini hyväksyy suoran väliaineen, lyhytketjuiset 3-hydroksiasyyli-CoA-substraatit *in vitro*, kun tehokkuus on suurimmillaan C4-substraattiin nähden. Proteiinille sopiva on myös 2-metyyli-3-hydroksibutyryyli-CoA, asyyli-substraatti, jossa on 2S-metyyliiryhmä. Kun mitokondrioiden proteiineja lokalisoitiin, huomattiin, että sen katalyyttiset ominaisuudet antoivat sille merkityksen rasvahappojen β -hapetuksessa. (Yang ym. 2014, 460–472; Hiltunen ym. 2019, 107–118.)

Proteiiniluokittelu HSD17 β 10-proteiiniksi tapahtui sen reaktion katalysointikyvyn ansiosta, koska se hyödyntää 17 β -estradiolia substraattina. HSD17 β 10-proteiini kykenee muodostamaan komplekseja muihin proteiineihin nähden, jotta muodostuu mtRNAasi P-aktiivisuus (*mitochondrial RNase P*). (Yang ym. 2014, 460–472.) Sitouduttuaan estrogeenireseptori alfaan, jotkin HSD17 β 10-toiminnot estyvät, joista esimerkkinä kompleksien muodostumisen estyminen (Yang ym. 2014, 460–472; Jazbutyte ym. 2009, 450–454).

4.2.2 HSD17 β 10-entsyymi osallisena steroidien metaboliassa

HSD17 β 10-entsyymille tärkeimpinä substraatteina pidetään estrogeenejä ja androgeenejä. Aivoissa esiintyvien aktiivisten steroidien pitoisuuksia pystytään katalysoimaan HSD17 β 10-entsyymillä avulla, esimerkkinä allopregnanolonin hapettuminen 5 α -dihydroprogesteroniksi. HSD17 β 10-entsyymi pystyy katalysoimaan myös 3 α -androstaanidiolin 5 α -dihydrotestosteroniksi, ja aktiivisen 17 β -estradiolin hapettumisen vähemmän aktiiviseksi estrogeenituotteeksi eli estroniksi. Nämä HSD17 β 10-entsyymillä toiminnat viittaavat siihen, että entsyymillä on merkittävä rooli neuroaktiivisten yhdisteiden metaboliassa ja steroidihormonien fysiologiassa. Kyseinen entsyymi saattaa olla myös mukana gestageenien ja glukokortikoidien metaboliassa ja se mahdollisesti osallistuu myös sappihappojen isomerointiin, koska entsyymillä on oksidatiivinen vaikutus 20 β -OH- ja 21-OH-ryhmiin C₂₁-steroideissa. (Vinklarova ym. 2020, 231–243.)

Ihmisen tärkeimpänä estrogeeninä pidetään estradiolia, joka on keskeisessä asemassa naisilla niiden lisääntymisfysiologiassa, ja se on myös mukana esimerkiksi miesten lisääntymisessä ja aineenvaihdunnassa. Estradioli vaikuttaa erilaisten geenien transkriptioiden modulointiin sitoutumalla estrogeenireseptoreihin α ja β , jolloin reseptori dimerisoi ja siirtyy tumaan. Sillä on myös kudosten ravitsemukseen liittyvä vaikutus kolienergisten hermosolujen kasvussa, kehityksessä ja niiden selviytymisessä, jolloin sen määrät ovat ratkaisevia aivosairauksissa, kuten skitsofreniassa (hermovälittäjäaineiden häiriö). (Vinklarova ym. 2020, 231–243.) Estradioli säätelee myös neuroinflammaatiota (lievää tulehdustilaa), joten se pystytään liittämään mahdolliseksi tekijäksi Alzheimerin taudissa (Vinklarova ym. 2020, 231–243; Toppala ym. 2021).

HSD17β10-entsyymi osallisena allopregnanolonin aineenvaihdunnassa

ALLOP kuuluu gamma-aminovoihapporeseptoreiden (GABA_A) positiiviseen steroidimodulaattoriin, joka pystyy avaamaan Cl-kanavia (Na⁺, K⁺ ja Ca⁺), jonka lisäksi se pystyy tehostamaan GABA:ta. ALLOP muodostuu 5α-dihydroprogesteronista (DHP), jossa apuna toimii sytosolinen 3α-HSD3-katalyyysi. Hapetusreaktiossa ALLOP hapetetaan 5α-DHP:ksi, jota mitokondrioiden HSD17β10-proteiini katalysoi samanaikaisesti NAD⁺ -pelkistysreaktion kanssa, ja tällä ei ole vaikutusta GABA_A-reseptoreihin. (Yang ym. 2007, 36–42; Yang ym. 2014, 460–472.)

Allopregnanolonin ja 17β-estradiolin inaktivointi tapahtuu yksisuuntaisena samanaikaisesti tapahtuvan NAD⁺:n vähenemisen kanssa. HSD17β10-entsyymi katalysoi NAD⁺ -riippuvaisen dehydrogenaasin avulla palautuvasti 2-metyyli-3-hydroksibutyryyli-CoA:n ja 2-metyyliasetoasetyyli-CoA:n muunnokset. (Yang ym. 2007, 36–42; Yang ym. 2014, 460–472.)

Tutkimuksista on selvinnyt, että HSD17β10:n ilmeneminen mitokondrioissa oletetaan olevan vastuussa ALLOP oksidatiivisen inaktivaation katalysointiin. HSD17β10:n ko-faktorina toimii NAD⁺ ja se on paikannettu mitokondrioihin, joissa ALLOP palautuu takaisin 5α-DHP-muotoon. Tällöin NADH ja NAD⁺ ovat noin 1/10 suhteessa toisiinsa nähden. Entsyymeistä HSD17β10 ja 3α-HSD3 (AKR1C2) osallistuvat ALLOP:n aineenvaihduntaan. (Yang ym. 2014, 460–472.)

4.2.3 HSD17β10:n merkitys ihmisen sairauksissa

Aivojen kehityksen ja kognitiivisen toiminnan turvaa välttämätön normaalitasoinen HSD17β10-proteiini, mutta silti neuroaktiivista steroidien metaboliaa on vielä tutkittava. Epätasapaino ALLOP:n aineenvaihdunnassa toimivan HSD17β10-proteiinin puutteessa potilaan aivoissa saattaa olla merkittävässä asemassa neurogeneratiivisissa häiriöissä, ja lisätutkimuksilla pystyttäisiin mahdollisesti kehittämään tehokasta hoitoa potilaille, jotka kärsivät HSD17β10-proteiinin puutteesta. (Yang ym. 2014, 460–472.)

Syöpä

HSD17 β 10-entsyymi on todettu yliekspressoituvan syöpäsoluissa, muun muassa eturauhas- ja luusyöpätyypeissä sekä feokromosytoomasoluissa. Feokromosytoomasoluissa yliekspressio johtaa lisääntyneeseen solujen kasvuun *in vivo* ja *in vitro*. Yliekspressio tapahtuu ravintoa rajoittavissa olosuhteissa, jolloin se voi olla apuna solujen homeostaasin ylläpitämiseen. Tällöin entsyymi tarjoaa lisästeroideja sisältäviä metaboliitteja, jotka saattavat edistää solujen selviytymistä ja suojata niitä solukuolemalta. (Vinklarova ym. 2020, 231–243.)

HSD17 β 10-entsyymi yliekspressio edesauttaa hengitysketjun aktiivisuutta ja energian muodostumista, mikä taas mahdollistaa solujen kasvun ja niiden paremman vastustuskyvyn muodostumisen oksidatiiviselle stressille. Tämä edistää syöpäsolujen tuumorigeneesiä ja aggressiivisuutta. HSD17 β 10-entsyymi mahdollistaa steroidisynteesin tapahtumisen eturauhassyövässä, missä se katalysoi dihydrotestosteronin reaktiota. Ihmisen HSD17 β 10-entsyymi on mahdollisesti potentiaalinen lääkekohde tietyille syöpätyypeille (esimerkiksi paksusuolen syöpä). HSD17 β 10-entsyymien merkitystä syövässä ei ole kuitenkaan määritelty tieteellisillä tutkimuksilla perusteellisesti ja lisätutkimuksia tarvitaan, jotta pystytään ymmärtämään paremmin sen rooli eri syövässä. (Vinklarova ym. 2020, 231–243.)

HSD17 β 10-tauti ja neurodegeneratiiviset häiriöt

Synnyynnäisistä HSD17 β 10-geenin mutaatioista johtuvat HSD17 β 10-proteiinin toimintahäiriöt voivat johtaa neurodegeneratiivisiin sairauksiin. Tätä harvinaista tautia kutsutaan HSD10-taudiksi, ja sen oireet voivat olla hyvin erityyppisiä, ja niitä voi esiintyä niin vastasyntyneillä kuin myös myöhemmällä iällä. Naisilla, joilla on todettu HSD17 β 10-proteiinin puutostila, on havaittu vaihtelevaa psykomotorisen hidastumisen astetta. Mitokondrioissa HSD17 β 10-proteiinin puute aiheuttaa isoleusiinin hajoamisen, jolloin metaboliitit kertyvät elimistöön, mutta kuitenkin kliiniset tutkimukset eivät ole löytäneet tukea tälle väitteelle. Henkiset ja motoriset taidot heikkenevät asteittain, joka viittaa vahvasti mitokondrioiden toimintahäiriöön (esimerkiksi laktaattitasojen nousu), johon sisältyy näön menetystä, koreoatetoosia (pakkoliikkeitä) ja epilepsiaa. (Yang ym. 2014, 460–472; Hiltunen ym. 2019, 107–118.)

HSD17 β 10-proteiinin puutostila saattaa aiheuttaa mikrokefaliaa (pienipäisyyttä), mutta ei kuitenkaan dysmorfiaa (ruumiinkuvan häiriötä) tai organomegaliaa (plasmasolutautia), ja psykomotorinen taantuma on yksi taudin pahimmista kliinisistä oireista (Yang ym. 2014, 460–472; Duodecim 2016c; Lievonen 2017). Oireet puhkeavat yleensä kuuden kuukauden ja kolmen ikävuoden välillä. HSD17 β 10-puutostilasta kärsivän potilaan soluissa on havaittu mitokondrioiden rakenteiden muutoksia, jolloin mitokondriot ovat pyöristyneet tyhjentyneillä kristalleilla, josta pystytään päättelemään, että tauti matkii mitokondrioiden tautia. (Yang ym. 2014, 460–472.)

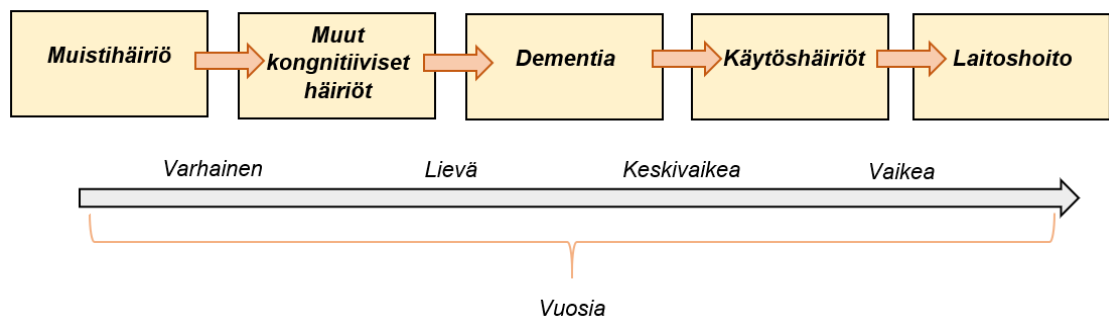
Mutatoitun HSD17 β 10:n jäännösentzymaattinen aktiivisuus ei korreloi potilaiden kliinisiin oireisiin. HSD17 β 10-proteiinin ominaisuudet ovat välttämättömiä, riippumatta entsyymaattisesta aktiivisuudesta, mitokondrioiden rakenteelliselle ja toiminnalliselle eheydelle, ja jos tämä toiminta heikkenee, hermosoluissa tapahtuu apoptoottinen solukuolema. HSD17 β 10:n entsyymaattinen aktiivisuus ei ole välttämätöntä solujen eloonjäämisen kannalta, ja sen takia potilaiden HSD17 β 10-geenimutaatiot eivät aiheuta myrkyllisten metaboliittien kertymistä isoleusiinireitille, vaan ne viittaavat mitokondrioiden yleisiin toiminnallisiin puutoksiin. (Rauschenberger ym. 2010, 51–62.)

HSD17 β 10-entsyymi kykenee edistämään neurogeneratiivisiä prosesseja ja hermosolujen apoptoosia. Täten sillä on merkittävä rooli neurogeneratiivisissa häiriöissä, esimerkiksi Parkinsonin taudissa (*Parkinson's disease, PD*). PD on neurogeneratiivinen sairaus, jossa dopaminenergiset hermosolut vähenevät *substantia nigra*ssa (mustatumakkeessa). Tämä johtaa erilaisiin motorisiin oireisiin, joita ovat muun muassa asennon epävakaus, kävelyongelmat ja jäykkyys. Kohonneet HSD17 β 10-tasot saattavat suojata ihmistä PD:lta. (Vinklarova ym. 2020, 231–243.)

Alzheimerin tauti

Alzheimerin tauti (*Alzheimer's disease, AD*) on vanhuksilla esiintyvä dementian muoto. Kognitiivisten toimintojen heikkeneminen on yleistä taudille. A β :ta kertyy ja muodostuu plakkeiksi neurofibrillaaristen muodostumien mukana, ja ne aiheuttavat patologisia muutoksia sairaiden potilaiden aivojen eri alueilla, joilla tauti on ehtinyt edetä. Nämä ovat tyypillisiä merkkejä, joihin kiinnitetään huomiota ensimmäiseksi, ja käyttäytymisessä esiintyvät muutokset ovat myös huomiota herättäviä merkkejä taudista (kuva 9).

AD:n aiheuttajaa ei ole pystytty määrittämään, sillä A β :n synnyttämälle toksisuuden mekanismeille ei ole löydetty pätevää selitystä lukuisista tutkimuksista huolimatta. Ne ovat kuitenkin osoittaneet, että A β :ta kertyy synapseissa ja mitokondrioissa, missä on myös todettu taudin varhaisvaiheessa toimintahäiriöitä. (Yang ym. 2014, 460–472.) A β on myös vuorovaikutuksessa erilaisten mitokondrioiden kanssa, joka aiheuttaa oksidatiivista stressiä, energian epätasapainoa ja solutoksisuutta (Hroch ym. 2016, 3675–3678). Kun mitokondrio vaurioituu, se aiheuttaa tällöin mitokondrioiden kuljetuksen heikkene mistä, fission/fuusion epätasapainoa ja epätavallista dynamiikkaa. Lisäksi mitokondrioiden toiminta, paikannus ja muoto ovat merkittäviä aivotointojen ja kognition kannalta. Synaptisten mitokondrioiden puutetta esiintyy yleensä AD:n varhaisvaiheessa. (Yang ym. 2014, 460–472.)



Kuva 9. Alzheimerin taudin eteneminen (mukaillen El-Sappagh ym. 2020, 197–215.)

HSD17 β 10-proteiinin määrä aivoissa voidaan selvittää aivo-selkäydinnesteestä (*cerebrospinal fluid*, CSF). Tutkimustulokset ovat osoittaneet, että CSF:ssä HSD17 β 10-proteiinin pitoisuus pienenee, kun ikää tulee lisää. AD-potilailla pitoisuus on kuitenkin 5,7 kertaisesti suurempi kuin vastaavilla ikään sovitetuilla verrokkeilla, ja tämä on havaittu myös AD-hiirimallissa. HSD17 β 10 osallistuu Alzheimerin tautiin niiden patogeenisissä (Rauschenberger ym. 2010, 51–62). HSD17 β 10-proteiinin yliekspressio aiheuttaa mitokondrioille matriisikondensaation ja johtaa osittaiseen kristallirakenteen hajoamiseen. (Yang ym. 2014, 460–472.)

Entsyymitoiminnan muutoksen aiheuttama A β -ABAD-vuorovaikutus on osoitettu aikaisemmin mahdollistavan stressiä mitokondrioissa, joka johti sytotoksisiin vaikutuksiin. Lisäksi HSD17 β 10-proteiini on esiintynyt vuorovaikutuksessa nanomolaarisilla pitoisuuksilla suoraan A β :n kanssa. Oksidatiivisen stressin ja mitokondrioiden toimintahäiriöiden

edistymistä tapahtuu silloin, kuin A β ja ABAD ovat vuorovaikutuksessa keskenään, mikä johtaa solukuolemaan. (Hroch ym. 2016, 3675–3678).

5 MENETELMÄT

Entsyymiaktiivisuustestin kehityksellä halutaan luoda HSD17 β 10-entsyymille oma menetelmä, joka on toimiva ja luotettava. Menetelmän periaatteena on pystyä seulomaan HSD17 β 10-entsyymien inhibiittoreita, ja se pohjautuu reaktioseoksen inkubointiin, jossa seos sisältää puskurin, HSD17 β 10-entsyymien, radioleimatun substraatin (³H), kofaktorin ja joissain määrityksissä myös leimaamattoman substraatin ja inhibiittorin. Inkubointiajan päätyttyä lähtöaine erotetaan lopputuotteesta Waters Aquity UPLC H-Class System -erotuslaitteistolla. Määritys toistetaan myös fluoresenssianalyysinä. Poikkeuksena UPLC-analyysiin, fluoresenssianalyysissä reaktioseos sisältää ainoastaan leimaamattoman substraatin ilman radioleimattua substraattia. Fluoresenssianalyysissä käytetään Tecan Spark[®]-monimoodimikrolevylukijaa, joka antaa mitattavien aineiden fluoresenssingnaalin. Signaali muutetaan konversioksi standardisuoraan suhteuttamalla.

5.1 Analyysilaitteisto

Analyysilaitteistoon kuului Waters Aquity UPLC H-Class System -erotuslaitteisto ja Tecan Spark[®] -monimoodimikrolevylukija. UPLC-laitteistossa hyödynnettiin XBridge VanGuard C18 3,5 μ m, 3,9 x 5 mm esikolonnia ja XBridge C18 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm kolonnia erotuksessa. Detektorina toimi Bertold FlowStar² -leimalaskindetektori. UPLC-analyysilaitteistoon asetettiin määrityksille ajo-olosuhteet, jotka pysyivät muuttumattomina jokaisessa UPLC-analyysissä (taulukko 2). Ajoliuoksena käytettiin asetoniiriiliä ja 0,1 % muurahaishappoliuosta (CH₂O₂ + H₂O) 42/58 suhteessa. Detektorissa käytettiin Ecoscint[™] A -tuikeluosta mahdollistamaan signaali.

Taulukko 2. UPLC-analyysien ajo-olosuhteet.

Ajo-olosuhde	Määritetty arvo
Ajoaika	3 min/näyte
Injektio-tilavuus	40 μ l
Injesointien määrä	1 injesointi/näyte
Ajoliuoksen virtausnopeus	1,2 ml/min
Tuikeluoksen virtausnopeus	0,8 ml/min
Kolonnin esilämmitys	+35 °C

Tecan Spark[®] -monimoodimikrolevylukija koostui suodattimista, Tecan QuadX Monochromators[™] -monikromaattorijärjestelmästä ja SparkControl-ohjelmistosta. Mittausolosuhteet pysyivät muuttumattomina jokaisessa fluoresenssianalyysissä ja ne on kuvattu taulukossa 3. Emissio- ja eksitaatioaallonpituudet perustuvat tuotemolekyylin fluoresenssiominaisuuksiin. Jokaisesta fluoresenssianalyysin tuloksesta on poistettu 0-pisteen antamat taustat.

Taulukko 3. Monimoodimikrolevylukijalla tehtyjen määritysten mittausolosuhteet.

Mittattava määre	Määritetty arvo (ID 7008)		Määritetty arvo (ID 7010)	
Emissioaallonpituus	370 nm		370 nm	
Eksitaatioaallonpituus	470 nm		510 nm	
Gain	Tris-HCl- puskuri	KH ₂ PO ₄ - puskuri	Tris-HCl- puskuri	KH ₂ PO ₄ - puskuri
	100	106	143	148

Määryksissä käytettyjen reagenssien, 96-kuoppalevyjen ja laitteiden tiedot ovat liitteissä 1 ja 2, ja levytyypit pysyivät muuttumattomina jokaisessa määryksessä. UPLC-määryksissä näytteet suodatettiin suodatuslevyn avulla ennen ajoa ABM + Waters[®] + Wika[®] -suodatuslaitteistolla ajolevylle. Määryksissä käytettiin HSD17β10-proteiinia, jonka on tuottanut GenScript *E.coli* -bakteerissa. Proteiini saatiin solulysaatin supernatantista ja puhdistus toteutettiin yksivaiheisella Ni-kolonnilla. HSD17β10-proteiinin sertifikaatti on liitteessä 3.

5.1.1 Waters Aquity UPLC H-Class System ja UPLC-analyysi

Ultrakorkean suorituskyvyn nestekromatografiaa (ultra-high-performance liquid chromatography, UPLC) hyödynnetään erilaisten seosten ja niissä olevien komponenttien tunnistuksessa. Kromatografian periaatteena on kahden faasin välillä tapahtuva erottuminen analyysien vuorovaikutusten avulla. (Vähätalo 2018, 37–38).

UPLC-analyysissä liuotin virtaa korkealla paineella (jopa yli 1300 bar) laitteiston läpi pumppusysteemin avulla, jossa kaasujen poisto ja liuotinsuhteiden muutokset tapahtuvat. Aluksi injektori syöttää määritetyn määrän näytettä (taulukko 2) suoraan liuotinvirtaukseen, jonka jälkeen se saavuttaa esikolonnin, jossa epäpuhtaudet poistuvat.

Kolonnissa tapahtuu näytteiden erottuminen, jotka havaitaan detektorin avulla, ja lopputuloksena tietokone luo analyysistä kromatogrammit, jotka kuvaavat yhdisteiden retentioajat kolonnissa. Kromatogrammeissa mahdollisesti esiintyvät piikit ja niiden pinta-alat tai korkeudet antavat kvantitatiivisia tietoja, ja yhdisteiden tunnistaminen tapahtuu retentioaikojen ja detektorin tietojen pohjalta. (Vähätalo 2018, 37–38.)

Waters Aquity UPLC H-Class System -erotuslaitteisto yhdessä Bertold FlowStar² -leimälaskindetektorin kanssa mahdollistavat entsyymien katalysoimien reaktioiden läntöaineiden ja tuotteiden konversion mittaamisen, kun kyseessä on radioleimattu substraatti ja tuote. Tritiumleimatun (³H) substraatin etuna on, että detektori havaitsee konversion ainoastaan, jos lähtöaineeseen on lisätty radioaktiivinen leima. Radioaktiivinen leima antaa suhteellisen konversion.

5.1.2 Tecan Spark[®] ja fluoresenssimittaus

Fluoresenssiksi kutsutaan sitä atomien ja molekyylien ominaisuutta, jossa atomit ja molekyylit absorboivat määritetyllä aallonpituudella niihin kohdistuneita fotoneja (eksitaatiovalo), ja lyhyen ajan kuluttua ne hyödyntävät pidempää aallonpituutta, jotta ne pystyvät säteilyn avulla saavuttamaan matalaenergiset fotonit (emittointi). Fluoresenssiin kuuluva emissio on mahdollista ainoastaan tietyissä aallonpitoisuuksissa ja se on suurempi kuin eksitaatioaallonpituus. Autofluoresoiviksi molekyyleiksi luokitellaan luonnollisesti yksin fluoresoivat molekyylit. (Lähteenmäki 2010, 10–11.)

Tecan Spark[®] -monimoodimikrolevylukijalla mittaus tapahtuu automatisoidun Z-tarkennuksen avulla, jolloin jokaisen määritetyn kuopan tarkennus tapahtuu ylä- ja alaosaan. Mittauksessa hyödynnetään myös kaivoskannausta ja SparkControl-ohjelmistotyökalua. Mittauksessa jokaiselle kuopalle määritetään omat laskukaavat ja jokaisen kuopan konversioprosentti määräytyy laskukaavan mukaisesti automatisoidusti laskettuna, ja standardit ovat vertailuna pipetoiduille näytteille.

5.2 HSD17β10-entsyymien testaus

HSD17β10-entsyymiä testattiin aluksi, jotta saatiin näkemys sen toimivuudesta. Testaukseen sisältyi eri substraattit ja kofaktorit, yksi proteiinipitoisuus ja kolme eri aikapistettä. Testaaminen aloitettiin erilaisista radioleimatuista substraateista ja kofaktoreista

(taulukko 4). Reaktioseoksia valmistettiin kahdeksan, joista jokaiseen lisättiin eri radioleimattu substraatti ja kofaktori. Proteiinikonsentraatioksi valittiin 10 µg/ml ja pitoisuus pidettiin samana jokaisessa reaktioseoksessa. Kontrollinäytteitä (1 % DMSO) pipetoitiin 96-kuoppalevylle 2 µl kolmena rinnakkaisnäytteenä ja reaktioihin pipetoitiin 200 µl reaktioseosta. Aikapisteet olivat 2, 4 ja 24 tuntia ja aikataulutus otettiin huomioon reaktioseoksia tehdessä. Jokaiselle aikapisteelle tehtiin omat rinnakkaisnäytteet, ja inkubointi suoritettiin lämpökaapissa (+37 °C). Aikapisteiden päättyessä pipetoitiin reaktioihin 22 µl 10 % trikloorietikkahappoa (TCA), joka lopetti reaktion. TCA:n lopullinen konsentraatio reaktiossa oli 1 %. Tämän jälkeen suodatettiin näytteet ajolevylle ja suoritettiin ajo UPLC-laitteella kappaleen 5.1 mukaisesti.

Taulukko 4. HSD17β10-entsyymin testausmäärittelyn reaktio-olosuhteet.

Tris-HCl-puskuri pH 7,5			
Reaktioseos	Radioleimattu substraatti (7,5 nM)	Kofaktori (0,5 nM)	Proteiini (10 µg/ml)
1	³ H-E2	NAD ⁺	HSD17β10
2	³ H -E2	NADP ⁺	HSD17β10
3	³ H -E1	NADH	HSD17β10
4	³ H -E1	NADPH	HSD17β10
5	³ H -T	NAD ⁺	HSD17β10
6	³ H -T	NADP ⁺	HSD17β10
7	³ H -A4	NADH	HSD17β10
8	³ H -A4	NADPH	HSD17β10

5.3 HSD17β10-entsyymiaktiivisuuden optimointi radioleimatulla substraatilla

Menetelmäkehitys aloitettiin testaamalla reaktiopuskurin pH-arvon, proteiinikonsentraation, inkubointilämpötilan, substraattipitoisuuden ja kofaktoripitoisuuden vaikutus reaktioon.

Aluksi tehtiin puskurivertailutesti, jossa vertailtiin kahden eri puskurin pH-arvojen vaikutusta reaktioon. Puskurien pH-arvot olivat pH 5,5; 6,5; 7,5 ja 8,5, ja valmistetut puskurit

olivat Tris-HCl (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 % glyseroli, 1 mM DTT + proteaasi-inhibiittoritabletti) ja KH_2PO_4 (20 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA) -puskuri. Molemmat puskurit jaettiin neljään eri säilöpulloon, jossa säädettiin jokaiselle puskurille haluttu pH-arvo säätöliuosten avulla. Jaetut Tris-HCl -puskuriliuokset säädettiin pH-mittarin avulla 1 N HCl -liuoksella ja jaetut KH_2PO_4 -puskuriliuokset säädettiin 2 M KOH -liuoksella.

Jokaista puskuriliuosta hyödynnettiin reaktioseoksissa, ja jokaiseen reaktioseokseen lisättiin sama määrä kofaktoria, substraattia ja proteiinia. Kofaktorina käytettiin 0,5 mM NAD^+ , radioleimattuna substraattina 7,5 nM $^3\text{H-E2}$ ja proteiinikonsentraatio oli 10 $\mu\text{g/ml}$. Työn suoritus, lopetus, suodatus ja ajo toistuivat samalla tavalla kuten kappaleessa 5.2 ja aikapiste oli kaksi tuntia.

5.3.1 HSD17 β 10-entsyymiaktiivisuuden testaus fluoresenssireaktiossa

Määrittäessä käytettiin kahta eri substraattia (ID 7008 ja ID 7010), ja hyödynnettiin molempia puskureita (Tris-HCl ja KH_2PO_4 -puskuri) pH-arvoilla 7,5 ja 8,5. Loput määrittäksen parametrit ovat taulukossa 5. Molemmille substraateille valmistettiin niitä vastaavat standardit, jotka valmistettiin tuotteista, koska ne fluoresoivat. Substraatti + tuote -parit olivat ID 7008 (substraatti) ja ID 7009 (tuote) ja ID 7010 ja ID 7011.

Standardien laimennokset valmistettiin laimennostaulukon mukaisesti laimennoslevylle (taulukko 6). Ensin laimennokset pipetoitiin laimennoslevylle, josta ne siirrettiin reaktiolevylle (Black OptiPlate) 2 μl /kuoppa, kolmena rinnakkaisnäytteenä. DMSO (1 %) toimi kontrollinäytteenä konversiolle, ja standardeita ja nollanäytteitä hyödynnettiin taustafluoresenssin poistossa. Standardien ja nollanäytteiden reaktioseokset eivät sisältäneet proteiinia, mutta muuten reaktioseokset olivat samat kuin näytteillä, ja reaktioseoksen pH-arvo oli 7,5. Inkubointi suoritettiin lämpökaapissa (+37 °C) ja aikapisteet olivat 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min ja 1440 min (24 h), ja jokaisen aikapisteen kohdalla suoritettiin fluoresenssimittaus kappaleen 5.1 mukaisesti. Määrittäys tehtiin kahdessa osassa, jolloin aluksi tehtiin molemmilla pusku-reilla ja molemmilla pH-arvoilla substraatin ID 7008 kanssa, jonka jälkeen määritettiin substraatti ID 7010.

Taulukko 5. Fluoresenssireaktiomäärityksen reaktio-olosuhteet.

Reaktiopuskurit: Tris-HCl ja KH ₂ PO ₄				
Testi	Reaktiopuskurin pH-arvo	Substraatti (1 µM)	Kofaktori (0,5 nM)	Proteiini (10 µg/ml)
1	8,5	ID 7008	NAD ⁺ ja NADP ⁺	HSD17β10
2	8,5	ID 7010	NAD ⁺ ja NADP ⁺	HSD17β10
3	7,5	ID 7008	NAD ⁺ ja NADP ⁺	HSD17β10
4	7,5	ID 7010	NAD ⁺ ja NADP ⁺	HSD17β10

Taulukko 6. Standardien laimennokset.

Testiaineen pipetointimäärä	DMSO (µl)	Näytteen konsentraatio laimennoslevyllä (M)	Lopullinen konsentraatio testilevyllä (M)
5 µl 1 · 10 ⁻² M	45	1 · 10 ⁻³	(ei reaktiolevylle)
10 µl 1 · 10 ⁻³ M	90	1 · 10 ⁻⁴	1 · 10 ⁻⁶
60 µl 1 · 10 ⁻⁴ M	20	7,5 · 10 ⁻⁵	7,5 · 10 ⁻⁷
40 µl 7,5 · 10 ⁻⁵ M	20	5 · 10 ⁻⁵	5 · 10 ⁻⁷
25 µl 5 · 10 ⁻⁵ M	25	2,5 · 10 ⁻⁵	2,5 · 10 ⁻⁷
20 µl 2,5 · 10 ⁻⁵ M	30	1 · 10 ⁻⁵	1 · 10 ⁻⁷
5 µl 1 · 10 ⁻⁵ M	45	1 · 10 ⁻⁶	1 · 10 ⁻⁸

5.3.2 Proteiinikonsentraation ja inkubointilämpötilan optimointi radioleimatulla substraatilla

Entsymin aktiivisuusmittauksen optimointia jatkettiin proteiinikonsentraation ja inkubointilämpötilan määrittämisellä eli molemmat olosuhteet määritettiin saman määrittämisen avulla. Määritettävät proteiinikonsentraatiot olivat 1 µg/ml, 5 µg/ml ja 10 µg/ml, jolloin

reaktioseoksia valmistettiin kolme. Kofaktori oli 0,5 mM NAD⁺, radioleimattu substraatti oli 7,5 nM ³H-E2 ja inkubointilämpötilat olivat +37 °C ja huoneenlämpötila (RT). Molemmille inkubointiolosuhteille valmistettiin sama reaktioseos, vaikka pipetointi tapahtui kahdelle eri kuoppalevyille. Kontrolliaineena toimi DMSO (1 %), jota pipetoitiin 2 µl/kuoppa kolmena rinnakkaisnäytteenä, ja reaktioihin pipetoitiin 200 µl reaktioseosta. Molemmat reaktiolevyt tehtiin samoilla parametreillä, ja aikapisteet olivat 30 min, 60 min ja 120 min, mitkä otettiin huomioon reaktioseoksia valmistaessa. Reaktiot lopetettiin, suodatettiin ja ajettiin UPLC-laitteella kappaleen 5.2 mukaisesti.

5.3.3 Substraattipitoisuuden optimointi radioleimatulla substraatilla

Substraattipitoisuuden optimointimäärityksessä käytettiin 7,5 nM radioleimattua substraattia (³H-E2), joka oli jokaisessa substraattipitoisuudessa vakio, ja loput substraattipitoisuudesta oli leimaamatonta estradiolia (E2) (taulukko 7). Proteiinkonsentraatio oli 5 µg/ml ja kofaktorin (NAD⁺) pitoisuus oli 0,5 nM. Reaktiopuskurina toimi Tris-HCl pH-arvolla 8,5, ja kontrolliaineena toimi DMSO (1 %), jota pipetoitiin kolme rinnakkaisnäytettä. Näytteitä pipetoitiin reaktiolevylle 2 µl/kuoppa, ja reaktioihin pipetoitiin reaktioseosta 200 µl. Näytteet inkuboitiin (+ 37 °C) 75 minuuttia, ja reaktioiden lopetus, suodatus ja näytteiden ajo UPLC-laitteella tehtiin kappaleen 5.2 mukaisesti.

Taulukko 7. Substraattipitoisuusmäärityksessä käytetyt substraattipitoisuudet.

Substraattipitoisuus (nM)	³ H-E2 (nM)	E2 (nM)
7,5	7,5	0
100	7,5	92,5
1 000	7,5	992,5
10 000	7,5	9992,5
20 000	7,5	19992,5
50 000	7,5	49992,5

5.3.4 Kofaktoripitoisuuden optimointi radioleimatulla substraatilla

Viimeiseksi entyymien aktiivisuusmittauksen optimoinnissa määritettiin kofaktoripitoisuus, jossa kofaktorina oli NAD⁺. Kofaktoripitoisuudet olivat 100 nM, 1 μM, 10 μM ja 500 μM ja substraattipitoisuus oli 1 μM, joka sisälsi 7,5 nM radioleimattua substraattia (³H-E2) ja 992,5 nM leimaamatonta substraattia (E2). Muut reaktio-olosuhteet pysyivät samana kuin substraattipitoisuusmäärityksessä kappaleessa 5.3.3, ja määrityksen suoritus toistui myös samalla tavalla. Inkubointiaika oli 90 minuuttia, jonka jälkeen reaktioiden lopetus, suodatus ja näytteiden ajo UPLC-laitteella suoritettiin kappaleen 5.2 mukaisesti.

5.3.5 HSD17β10-entsyymireaktion kinetiikkamääritys radioleimatulla substraatilla

Entsyymireaktion kinetiikkamäärityksessä määritettiin entsyymireaktiolle edistymiskäyräanalyysi (Progress curve). Substraattipitoisuudet olivat 7,5 nM, 100 nM ja 1 μM, ja ne sisälsivät 7,5 nM (³H-E2) ja loput pitoisuudesta oli leimaamatonta estradiolia (E2). Muut olosuhteet pysyivät määrityksen 5.3.3 mukaisina, ja määritys myös suoritettiin sen mukaisesti. Aikapisteet olivat 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min ja 1440 min (24 h), ja reaktiot lopetettiin, suodatettiin ja ajettiin UPLC-laitteella kappaleen 5.2 mukaisesti.

5.4 HSD17β10-entsyymiaktiivisuuden inhiboinnin testaus fluoresenssireaktiossa

Entsyymiaktiivisuuden inhibointimäärityksessä käytettiin kirjallisuudesta löytyvää inhibiittoria, joka oli bentsotiatsol-6-sulfonyyli, ID 7333 (Aitken ym. 2019, 1–23). Inhibitiopitoisuudet olivat 10 μM, 1 μM ja 100 nM. Substraattina käytettiin 1 μM ID 7008, jonka tuotteena toimi ID 7009. Inhibiittorin laimennokset valmistettiin laimennoslevylle taulukon 8 mukaisesti, ja standardin, ID 7009, laimennokset tehtiin taulukon 6 mukaisesti. Proteiinitkonsentraatiot olivat 1 μg/ml, 5 μg/ml ja 10 μg/ml, muut reaktio-olosuhteet pysyivät samana kuin aikaisemmassa määrityksessä 5.3.1, ja määritys tehtiin fluoresenssimäärityksenä kappaleen 5.1 mukaisesti. Aikapisteet olivat 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min ja 120 min, ja mittaukset suoritettiin fluoresenssimittauksina kappaleen 5.1 mukaisesti jokaisen aikapisteen kohdalla.

Taulukko 8. Inhibiittorilaimennokset.

Testiaineen pipetointimäärä	DMSO (μ)	Testiaineen konsentraatio laimennoslevyllä (M)	Lopullinen konsentraatio reaktiolevyllä
$5 \mu 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	45	$1 \cdot 10^{-3}$	10 μM
$5 \mu 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	45	$1 \cdot 10^{-4}$	1 μM
$5 \mu 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	45	$1 \cdot 10^{-5}$	100 nM

5.4.1 Inhibiittorien seulonta radioleimatulla substraatilla ja fluoresenssireaktiolla

Inhibiointia testattiin eri inhibiittoreilla kahdessa erillisessä mittauksessa (taulukko 9) sekä UPLC- että fluoresenssianalyysinä. Inhibiittorilaimennokset valmistettiin 10 μM ja 1 μM pitoisuuksiin (taulukko 8), mutta muut reaktio-olosuhteet pysyivät aiemman fluoresenssianalyysin 5.4 mukaisina. Fluoresenssianalyysin ensimmäisen inhibiittoriryhmän aikapisteet olivat 30 min, 45 min ja 60 min ja UPLC-analyysissä aikapiste oli 75 min. UPLC-analyysin reaktio-olosuhteet pysyivät kappaleen 5.3.5 mukaisina. Fluoresenssianalyysin toisen inhibiittoriryhmän aikapisteet olivat 45 min ja 60 min ja UPLC-analyysissä aikapiste pysyi samana kuin ensimmäisen inhibiittoriryhmän kohdalla.

Taulukko 9. Inhibiittorien seulontamäärityksissä käytetyt ID-numerot.

Inhibiittoriaineet (ryhmä 1)	Inhibiittoriaineet (ryhmä 2)
ID 7333	ID 350
HM-2001	ID 1836
ID 1758	ID 2227
ID 3637	ID 3028
ID 4875	ID 4782
ID 4940	ID 4884
ID 5090	ID 4980
ID 5429	
ID 6468	
ID 7483	

5.5 HSD17β10-entsymin uusi seulontamenetelmä

Uusi seulontamenetelmä kehitettiin entsyymien optimointimäärittelysten avulla. UPLC-analyysin seulontamenetelmän reaktio-olosuhteisiin kuuluu 7,5 nM radioleimattu substraatti (³H-E2), 1 μM leimaamaton substraatti (E2) ja Tris-HCl -puskuri (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 % glyseroli, 1 mM DTT + proteaasi-inhibiittoritabletti), jonka pH-arvo on säädetty arvoon 8,5, ja inkubointi suoritetaan lämpökaapissa (+37 °C) 75 minuutin ajan. Proteiinkonsentraatioksi optimoitiin 5 μg/ml. Fluoresenssianalyyseissä substraattina toimii ID 7008 ja tuotteena ID 7009. Inkubointiaika on 45 minuuttia, mutta muuten reaktio-olosuhteet pysyvät samoina kuin UPLC-analyyseissä.

5.6 Tulosten käsittely

Kaikki tulosten pohjalta laaditut kuvaajat piirrettiin GraftPad-sovelluksella kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvon (*average*, kaava 5) ja keskihajonnan (*standard deviation*, kaava 6) pohjalta, ja kuvaajissa näkyy kolmen rinnakkaisnäytteen keskihajonta. Tuloksissa esiintyvät inhibitioprosentit laskettiin

kaava 7 mukaisesti.

Kaava 5. Keskiarvon laskukaava.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Kaava 6. Keskihajonnan laskukaava.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Keskiarvon (\bar{x}) ja keskihajonnan (s) laskukaavoissa x_i tarkoittaa yksittäistä arvoa, \bar{x} arvojen aritmeettistä keskiarvoa ja n arvojen lukumäärää.

Kaava 7. Inhibitioprosentin laskukaava (Porkka 2016).

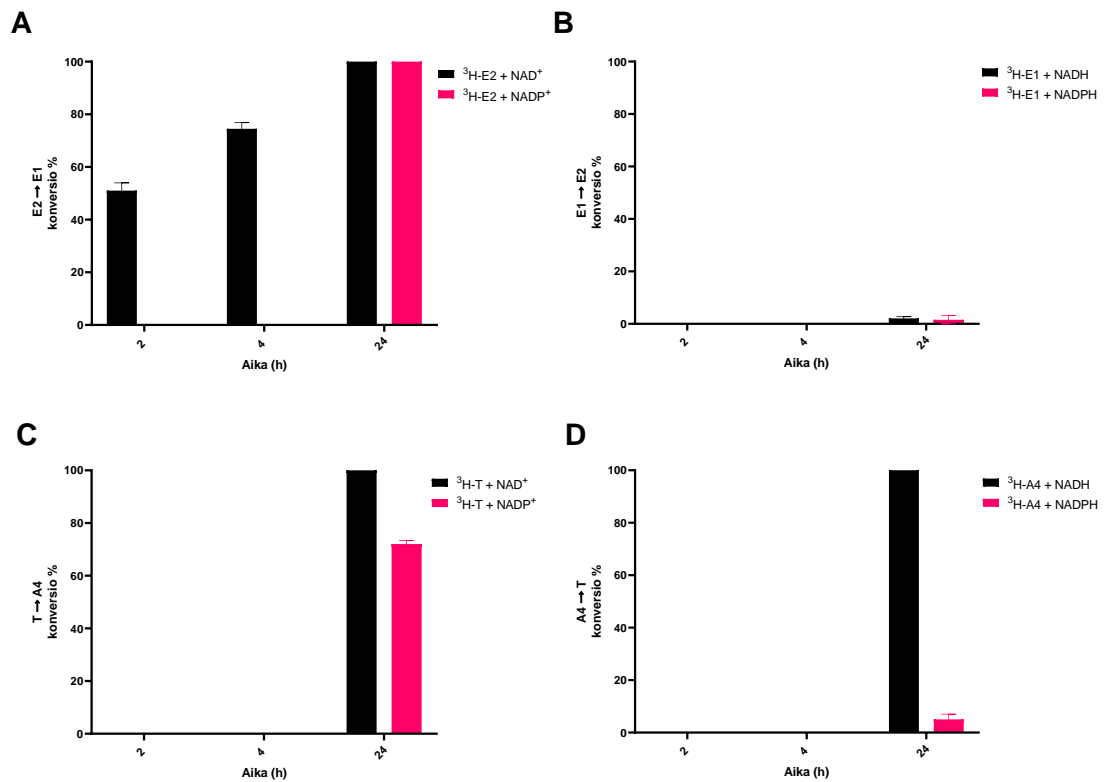
$$\frac{\text{DMSO} - \text{kontrollin konversio \%} - \text{inhibiittorin konversio \%} \cdot 100}{\text{DMSO} - \text{kontrollin konversio \%}}$$

6 TULOKSET

Tulokset sisältävät opinnäytetyön kokeellisten menetelmien tulokset: entsyymin testauksen, entsyymin optimoitavien parametrien määritykset, fluoresenssireaktion, reaktion kineettisen määrityksen ja edellisten määritysten mittaustulosten pohjalta luodun menetelmän avulla tehdyt inhibiittoreiden seulontamääritykset.

6.1 HSD17 β 10-entsyymin testaus

Aluksi määritettiin HSD17 β 10-proteiinin kanssa parhaiten toimiva steroidisubstraatti ja kofaktori radioleiman avulla (kuva 10). Kahden tunnin aikapisteen kohdalla ($^3\text{H-E2} + \text{NAD}^+$) konversio on 51,02 % (kuva 10, A), ja muilla radioleimatuilla substraateilla konversio on 0,0 % kahden ja neljän tunnin aikapisteissä (kuva 10, A–D). Näiden muiden radioleimattujen substraattien konversioprosentin nousu havaitaan vasta 24 h aikapisteessä (taulukko 10). Tulosten pohjalta päätettiin valita seuraaviin testeihin radioleimatuksi substraatiksi $^3\text{H-E2}$ ja kofaktoriksi NAD^+ .



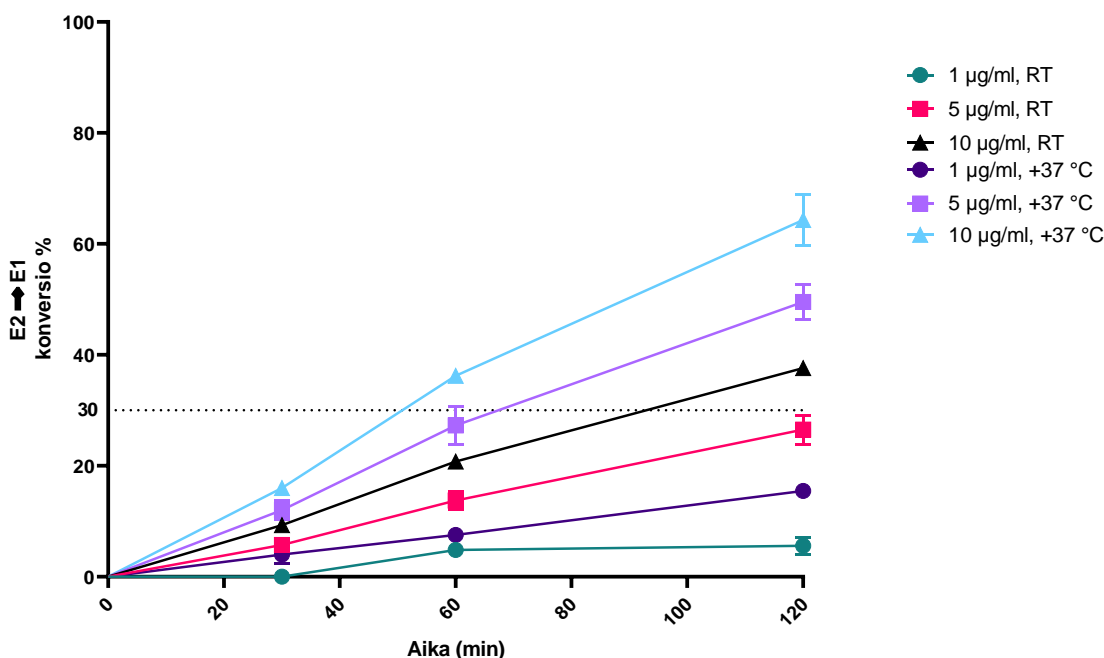
Kuva 10. **HSD17β10-entsyymi ajan funktiona.** Toimivin radioleimattu substraatti + kofaktori oli $^3\text{H-E2} + \text{NAD}^+$. A-kuvaajassa $^3\text{H-E2} + \text{NAD}^+$ vs $^3\text{H-E2} + \text{NADP}^+$, B-kuvaajassa $^3\text{H-E1} + \text{NADH}$ vs $^3\text{H-E1} + \text{NADPH}$, C-kuvaajassa $^3\text{H-T} + \text{NAD}^+$ vs $^3\text{H-T} + \text{NADP}^+$ ja D-kuvaajassa $^3\text{H-A4} + \text{NADH}$ vs $^3\text{H-A4} + \text{NADPH}$. Määrittys tehtiin UPLC-määrittäksenä. Kuvaajassa esiintyvillä väreillä on eroteltu kofaktorit toisistaan.

Taulukko 10. Radioleimattujen substraattien ja kofaktorien konversioprosentit 24 h aikapisteessä.

Radioleimattu substraatti + kofaktori	24 h aikapisteeseen konversioprosentti (%)
$^3\text{H-E2} + \text{NAD}^+$	100,00
$^3\text{H-E2} + \text{NADP}^+$	100,00
$^3\text{H-E1} + \text{NADH}$	2,06
$^3\text{H-E1} + \text{NADPH}$	1,55
$^3\text{H-T} + \text{NAD}^+$	100,00
$^3\text{H-T} + \text{NADP}^+$	72,01
$^3\text{H-A4} + \text{NADH}$	100,00
$^3\text{H-A4} + \text{NADPH}$	5,02

6.2 Proteiinikonsentraation ja inkubointilämpötilan vaikutus HSD17 β 10-entsyymin toimintaan

Proteiinipitoisuus ja inkubointilämpötila määritettiin UPLC-analyysillä (kuva 11). Proteiinipitoisuudella 5 $\mu\text{g/ml}$ konversioprosentti on 27,26 % 60 minuutin kohdalla, kun inkubointilämpötila on +37 °C (kuva 11), kun taas proteiinipitoisuudella 1 $\mu\text{g/ml}$ konversioprosentti on noussut vasta 15,45 %:iin 120 minuutin aikapisteen kohdalla inkubointilämpötilan ollessa +37 °C (kuva 11). Inkubointi huoneenlämmössä (RT) vaikutti reaktion etenemiseen selkeästi hitaammin, kuin inkubointi lämpökaapissa (+37 °C) (taulukko 11), joten valittiin seuraavaan määrittelyyn proteiinikonsentraatioksi 5 $\mu\text{g/ml}$ ja inkubointi lämpökaapissa (+37 °C).



Kuva 11. **Proteiinikonsentraation ja inkubointilämpötilan vaikutukset HSD17 β 10-entsyymin reaktioon ajan funktiona.** Jatkomäärittelyyn valittiin proteiinikonsentraatioksi 5 $\mu\text{g/ml}$ ja inkubointi lämpökaapissa (+37 °C), koska se oli lähimpänä lineaarista aluetta. Proteiinikonsentraatiot olivat 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ ja 10 $\mu\text{g/ml}$, ja inkubointiolosuhteet olivat huoneenlämpötila (RT) ja lämpökaappi (+37 °C). Määrittely tehtiin UPLC-määrittelymenetelmällä. Lineaarinen alue on kuvattu katkoviivalla konversioprosentin ollessa 30 %. Kuvassa esiintyvät symbolit kuvaavat samaa proteiinikonsentraatiota ja väreillä on eroteltu proteiinikonsentraatiot + inkubointilämpötilat toisistaan.

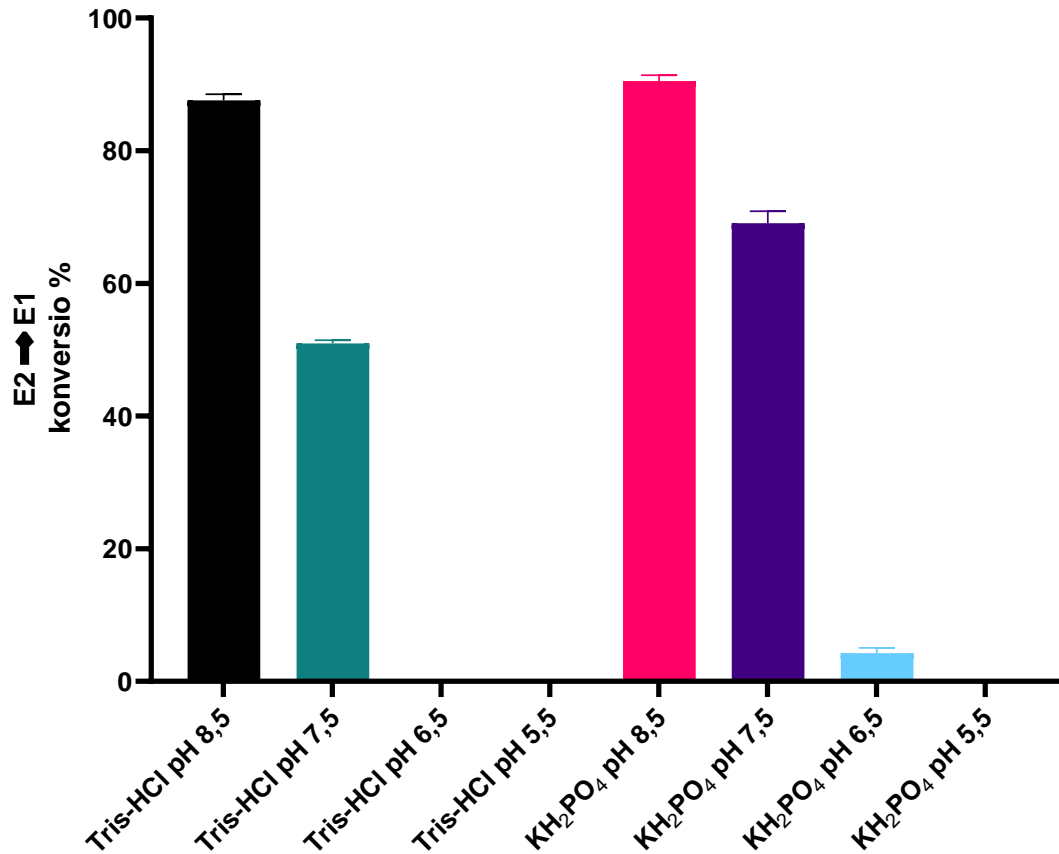
Taulukko 11. Proteiinikonversion ja inkubointilämpötilan konversioprosentit eri aikapisteissä.

Konversioprosentti aikapisteessä (%)				
Inkubointi-lämpötila	Proteiini-konsentraatio (µg/ml)	30 min	60 min	120 min
+37 °C	1	3,99	7,54	15,45
	5	12,02	27,26	49,55
	10	16,01	36,29	62,29
RT	1	0,00	4,83	5,62
	5	5,75	13,74	26,52
	10	9,31	20,76	37,61

6.3 Eri puskurien vaikutus HSD17β10-entsyymin toimintaan

Entsyymireaktiolle määritettiin sopiva puskuri UPLC-analyysillä (kuva 12). Määrittämisessä oli mukana puskurit Tris-HCl ja KH_2PO_4 pH-arvoilla 5,5; 6,5; 7,5 ja 8,5. Tris-HCl -puskurin (pH 8,5) konversioprosentti oli 87,60 % ja KH_2PO_4 -puskurin (pH 8,5) 90,52 % kahden tunnin aikapisteen kohdalla (kuva 12), ja siksi seuraavaan määrittämiseen jatkoivat molemmat puskurit Tris-HCl ja KH_2PO_4 . pH-arvoksi valittiin 8,5 molemmille puskureille, koska reaktio eteni parhaiten tässä pH-arvossa (

taulukko 12).

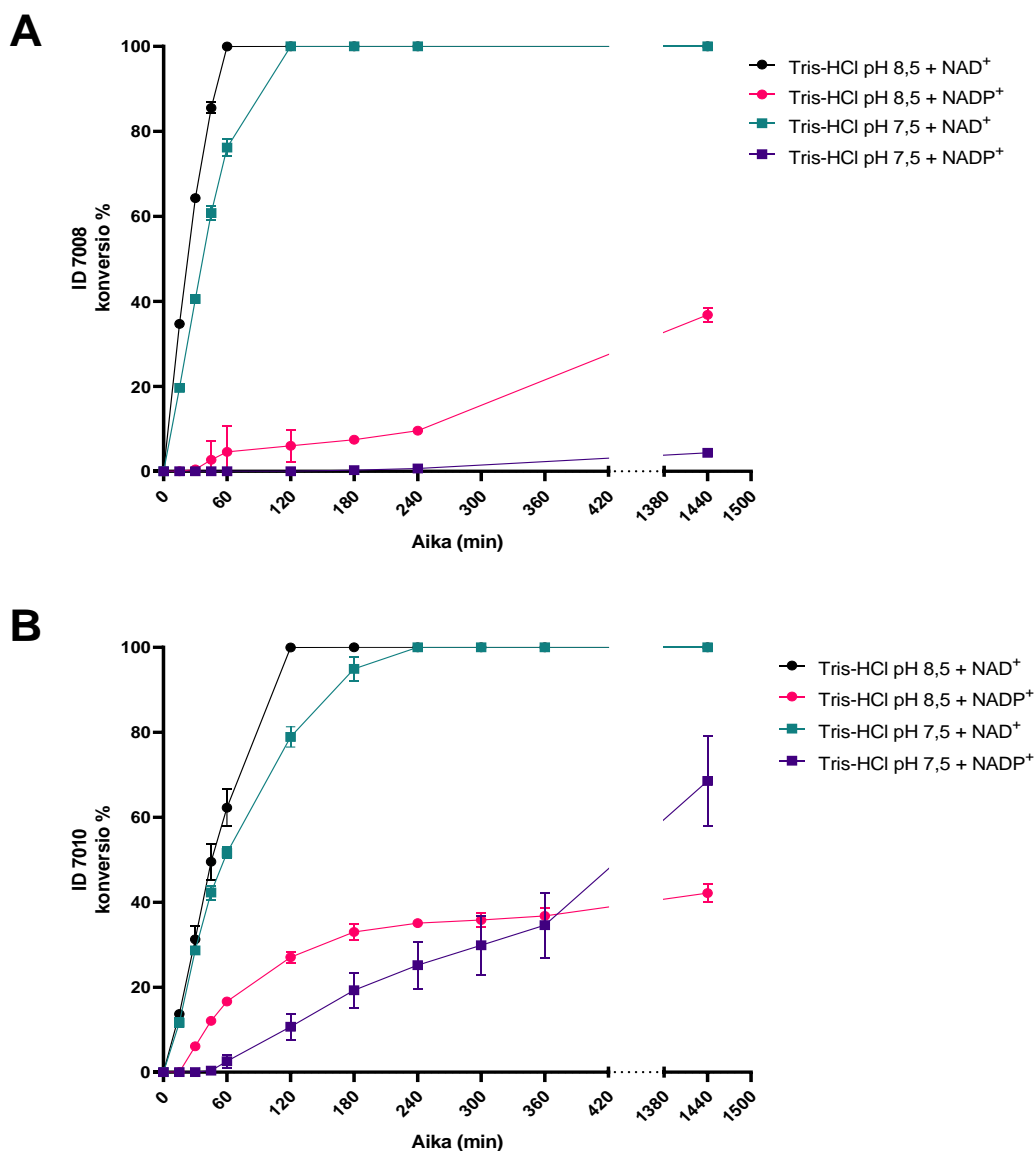


Kuva 12. Puskurivertailun, Tris-HCl vs KH₂PO₄, ja niiden eri pH-arvojen, 5,5; 6,5; 7,5 ja 8,5, vaikutukset HSD17β10-entsyymin reaktioon ajan funktiona. Parhaan konversion tuottivat Tris-HCl ja KH₂PO₄ pH-arvolla 8,5, minkä pohjalta ne valittiin jatkomäärityksiin. Määritys tehtiin kahden tunnin inkubointiajalla UPLC-määrityksenä. Kuvaajissa esiintyvät värit erottavat eri puskurit ja niiden pH-arvot toisistaan.

Taulukko 12. Tris-HCl ja KH_2PO_4 -puskurin ja niiden eri pH-arvojen konversioprosentit kahden tunnin aikapisteessä.

Puskuri	pH-arvo	Konversioprosentti kahden tunnin aikapisteessä (%)
Tris-HCl	8,5	87,60
	7,5	50,94
	6,5	0,00
	5,5	0,00
KH_2PO_4	8,5	90,52
	7,5	69,05
	6,5	4,27
	5,5	0,00

Määritettiin myös fluoresenssimenetelmään sopiva puskuri ja sen pH-arvo kahdella eri substraatilla, jotka olivat ID 7008 (kuva 13, A) ja ID 7010 (kuva 13, B), ja kofaktoreilla NAD^+ ja NADP^+ . Määrityksessä käytettiin Tris-HCl ja KH_2PO_4 -puskuria, pH-arvoilla 7,5 ja 8,5. Tulosten pohjalta kofaktoriksi seuraaviin määrityksiin jatkoivat molemmat puskurit ja ensisijaisesti kofaktori NAD^+ , ja puskurin pH-arvoksi valittiin pH 8,5, koska reaktio eteni nopeammin emäksisemmässä pH-arvossa.

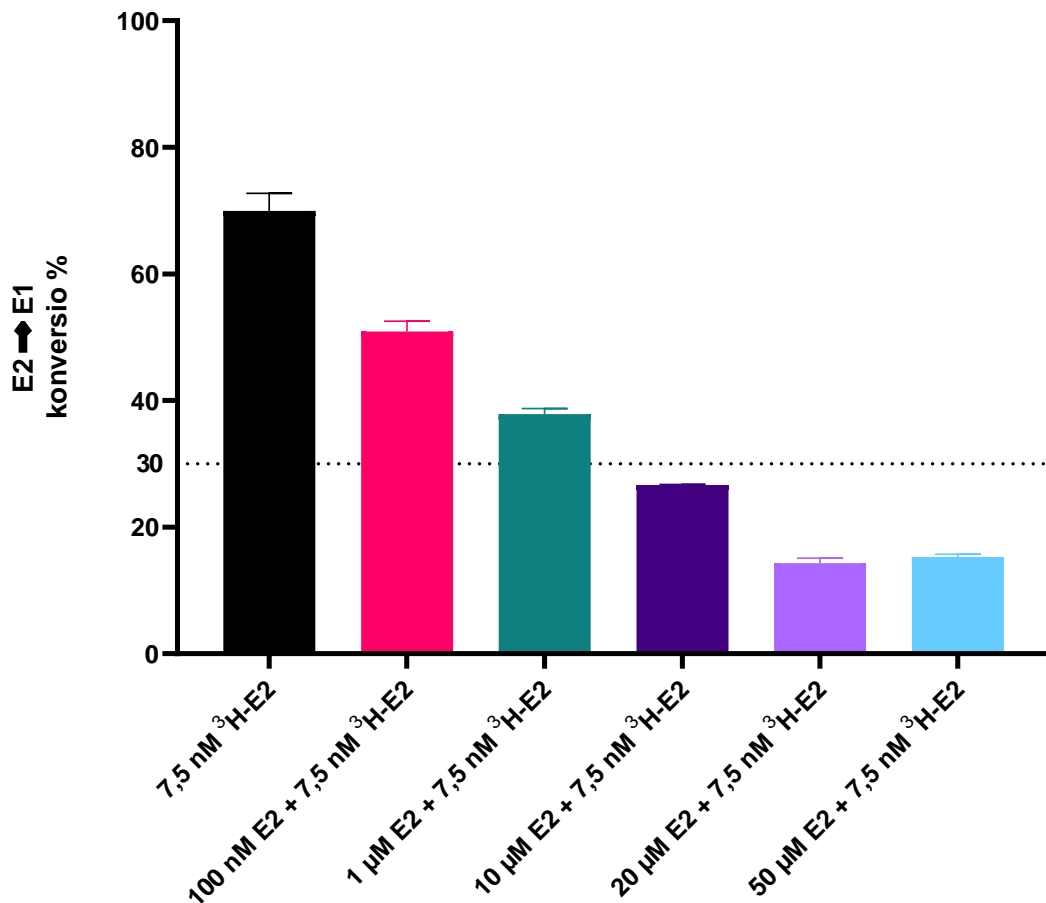


Kuva 13. Eri puskurien vaikutukset HSD17 β 10-entsyymin reaktioon ajan funktiona fluoresenssimäärityksenä substraateilla ID 7008 ja ID 7010. Parhaan konversion antoivat Tris-HCl ja KH₂PO₄ pH-arvolla 8,5 ja kofaktori NAD⁺, minkä vuoksi ne valittiin jatkomäärityksiin. Määrityksessä vertailussa olivat puskurit Tris-HCl ja KH₂PO₄ pH-arvoilla 7,5 ja 8,5 ja kofaktorit NAD⁺ ja NADP⁺. A-kuvaajassa substraattina käytettiin ID 7008 ja B-kuvaajassa käytettiin ID 7010. Kuvaajissa esiintyvät symbolit esittävät puskurien eri pH-arvoja. Eri virit erottavat puskuri + kofaktori -yhdistelmät toisistaan.

6.4 Substraatin vaikutus HSD17 β 10-entsyymin reaktioon

Entsyyminreaktiolle määritettiin optimaalinen substraattipitoisuus UPLC-analyysinä (kuva 14). Määrityksessä käytetyt substraattipitoisuudet olivat 7,5 nM (³H-E2), 7,5 nM (³H-E2)

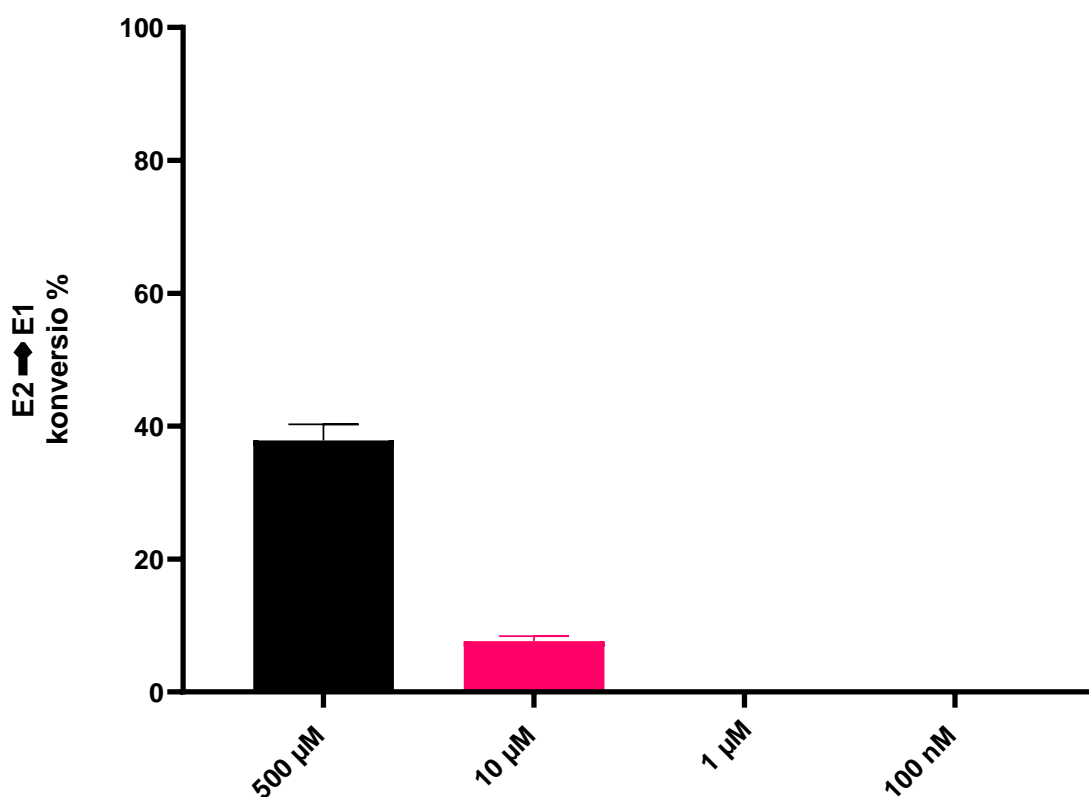
+ 100 nM (E2), 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 1 μM (E2), 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 10 μM (E2), 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 20 μM (E2), 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 50 μM (E2). Substraattipitoisuudella 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) konversioprosentti oli 69,96 %, 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 100 nM (E2) 50,91 % ja 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 1 μM (E2) 37,85 % 75 minuutissa (kuva 14). Tuloksissa oli eroja, joten päädyttiin käyttämään 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 1 μM (E2), koska konversioprosentin oletettiin olevan lähimpänä lineaarista aluetta 75 minuutissa.



Kuva 14. **Substraattipitoisuuden vaikutus HSD17 β 10-entsyymin reaktioon eri substraattipitoisuuksilla.** Jatkomäärittelyyn valittiin 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 1 μM (E2), koska se oli lähimpänä lineaarista aluetta. Määrittely tehtiin 75 minuutin UPLC-määrittelyksenä. Lineaarinen alue on kuvattu katkoviivalla konversion ollessa 30 %. Kuvaajassa esiintyvät värit erottavat eri substraattipitoisuudet toisistaan.

6.5 Kofaktoripitoisuuden vaikutus HSD17 β 10-entsyymin reaktioon

Entsyyminreaktiolle määritettiin optimaalinen kofaktoripitoisuus UPLC-analyysillä (kuva 15). Määrityksessä käytetyt kofaktoripitoisuudet olivat 500 μ M, 10 μ M, 1 μ M ja 100 nM. Pitoisuudella 500 μ M konversioprosentti oli 37,86 % 90 minuutissa (kuva 15), kun taas muilla pitoisuuksilla ei ollut tarpeeksi konversiota 90 minuutin inkuboinnilla (taulukko 13). Tulosten pohjalta valittiin seuraavaan määritykseen kofaktoripitoisuudeksi 500 μ M.



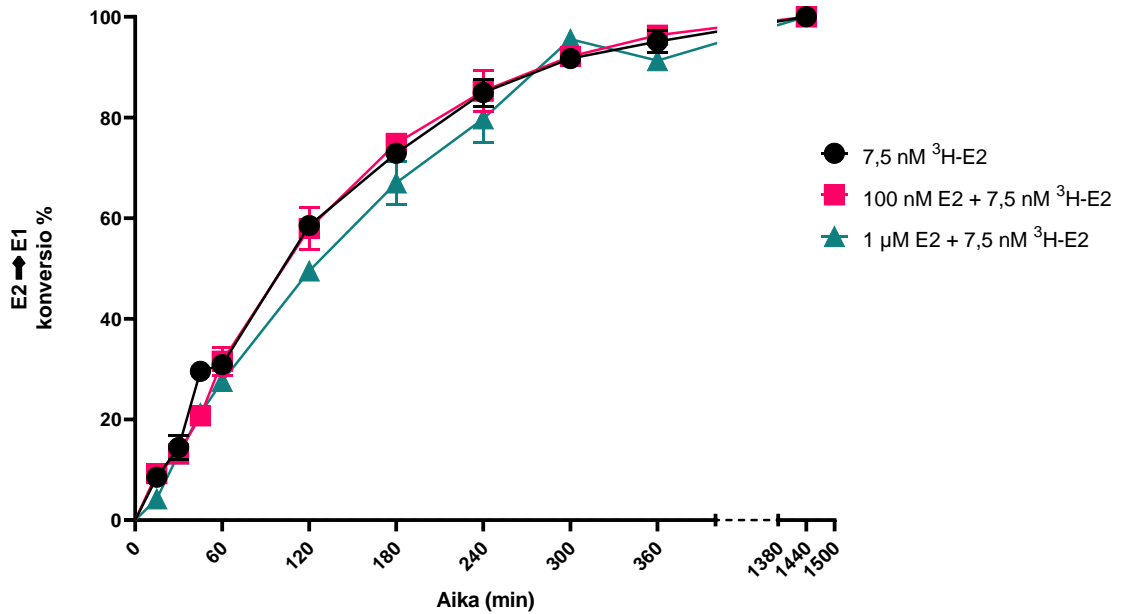
Kuva 15. **Kofaktoripitoisuuden vaikutus HSD17 β 10-entsyymin reaktioon eri kofaktoripitoisuuksilla.** Toimivin kofaktoripitoisuus oli 500 μ M, ja siksi se valittiin jatkomäärityksiin. Määritys tehtiin 90 minuutin inkuboinnilla UPLC-määrityksenä. Määrityksessä käytetyt kofaktoripitoisuudet olivat 500 μ M, 10 μ M, 1 μ M ja 100 nM. Kuvaajassa esiintyvät värit erottavat eri kofaktoripitoisuudet toisistaan.

Taulukko 13. Eri kofaktoripitoisuuksien konversioprosentit 90 minuutin aikapisteessä.

Kofaktoripitoisuus	Konversioprosentti 90 minuutin aikapisteessä (%)
500 μM	37,86
10 μM	7,67
1 μM	0,00
100 nM	0,00

6.6 HSD17 β 10-entsyymin edistymiskäyräanalyysi

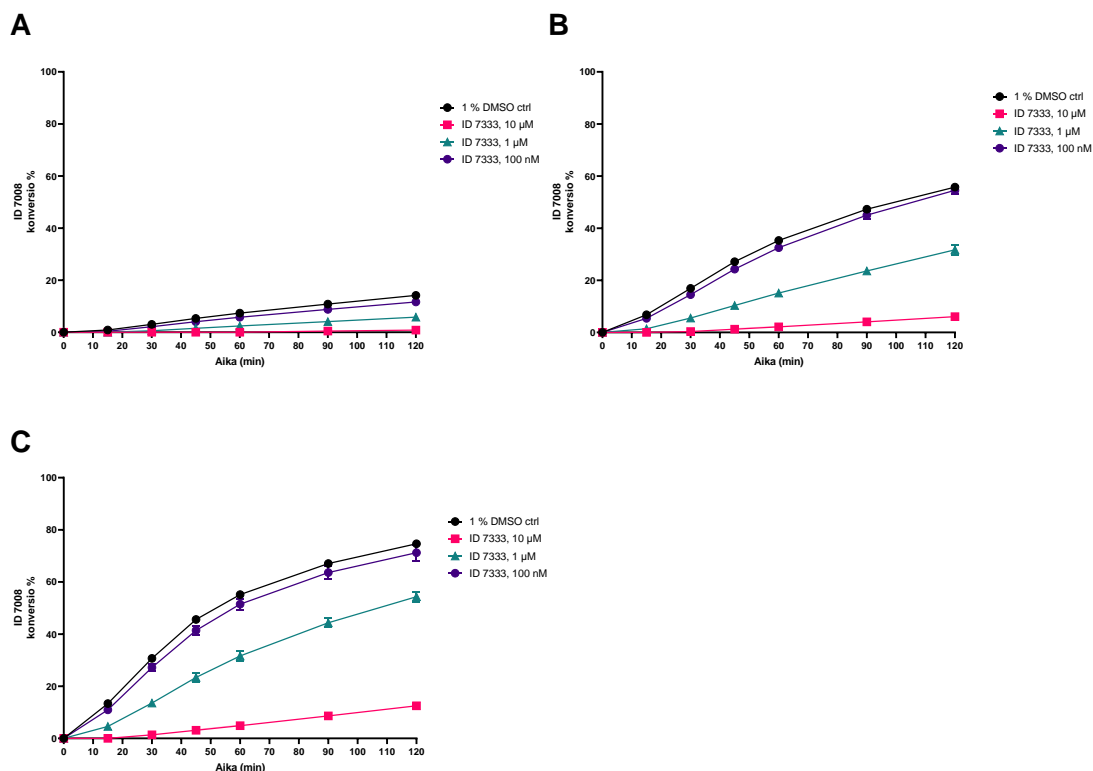
Entsyyminreaktiolle tehtiin kinetiikkamääritys, josta piirrettiin edistymiskäyräanalyysi (kuva 16). Tuloksista pystytään päättämään, että reaktio tapahtui alkuvaiheessa lineaarisella alueella, jonka jälkeen reaktion eteneminen hidastui. Substraattipitoisuudella ei ollut vaikutusta. Substraattipitoisuuden ollessa 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 1 μM (E2) reaktio etenee lineaarisesti 300 minuutin aikapisteen kohdalle, kun taas substraattipitoisuuksilla 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 100 nM (E2) ja 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) reaktiot etenevät lineaarisesti 120 minuutin aikapisteen kohdalle. Konversioprosentti oli substraattipitoisuudella 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) 30,88 %, 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 100 nM (E2) 31,57 % ja 7,5 nM ($^3\text{H-E2}$) + 1 μM (E2) 27,6 % 60 minuutissa.



Kuva 16. **HSD17β10-entsyymin edistymiskäyräanalyysi ajan funktiona.** Konversioiden nousu tapahtui reaktioiden alkuvaiheessa lineaarisella alueella ja substraattipitoisuudella ei ollut vaikutusta. Määritys tehtiin fluoresenssimäärityksenä. Kuvaajassa esiintyvät symbolit ja eri värit erottavat eri substraattipitoisuudet toisistaan.

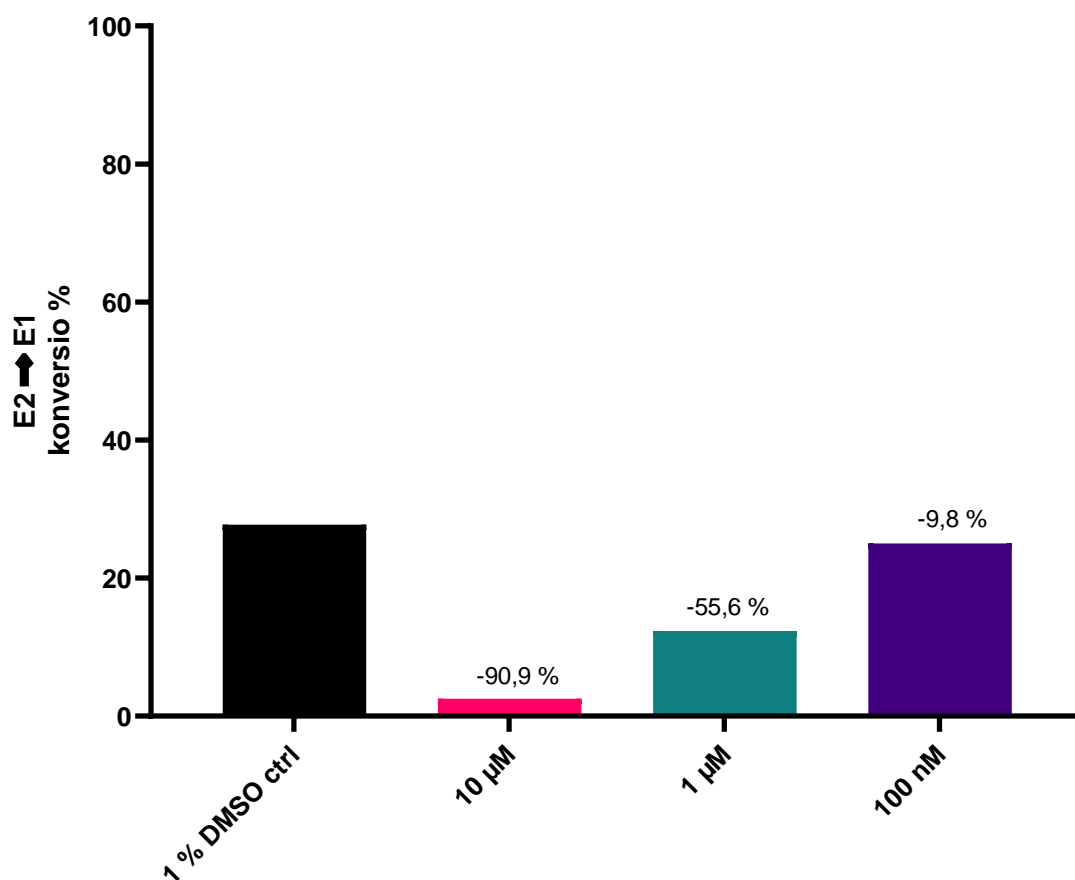
6.6.1 HSD17β10-entsyymin inhibiointikoe

Ensimmäinen inhibiittorimääritys tehtiin fluoresenssianalyysinä yhdellä inhibiittorilla, ID 7333, pitoisuuksilla 10 μM, 1 μM ja 100 nM ja kolmella proteiinikonsentraatiolla, jotka olivat 1 μg/ml (kuva 17, A), 5 μg/ml (kuva 17, B) ja 10 μg/ml (kuva 17, C). Inhibiittoripitoisuudella 100 nM inhibiittorin teho ei riittänyt estämään reaktiota tapahtumasta. Määrityksen pohjalta valittiin seuraaviin määrityksiin proteiinikonsentraatioksi 5 μg/ml ja inhibiittoripitoisuuksiksi 10 μM ja 1 μM.



Kuva 17. HSD17β10-entsyymin inhibitiomääritys ID 7333 -inhibiittorilla ajan funktiona kolmella eri proteiini- ja inhibitiopitoisuudella fluoresenssimäärityksenä. Jatkomäärityksiin valittiin proteiinipitoisuudeksi 5 μg/ml, koska se oli lähimpänä lineaarista aluetta (konversio 30 %), ja toimivuuden perusteella valittiin inhibitiopitoisuuksiksi 10 μM ja 1 μM. Määrityksen proteiinipitoisuudet olivat A-kuvaajassa 1 μg/ml, B-kuvaajassa 5 μg/ml ja C-kuvaajassa 10 μg/ml, ja inhibitiopitoisuudet olivat 10 μM, 1 μM ja 100 nM. Kuvaajissa esiintyvät symbolit ja värit erottavat negatiivisen kontrollin ja eri inhibitiopitoisuudet toisistaan.

Vastaavasti tehtiin inhibiittorimääritys UPLC-analyysinä samoilla olosuhteilla kuin ensimmäisessä inhibiittoritestissä (kuva 18), johon proteiinipitoisuudeksi valittiin 5 μg/ml aieman määrityksen pohjalta (kuva 17). Tuloksista pääteltiin, että inhibiittori (ID 7333) inhiboi parhaiten 10 μM pitoisuudella (inhibitio -90,90 %) (kuva 18). Pitoisuudella 1 μM inhibitio laskee noin puoleen (inhibitio -55,60 %) negatiivisesta kontrollista (1 % DMSO).

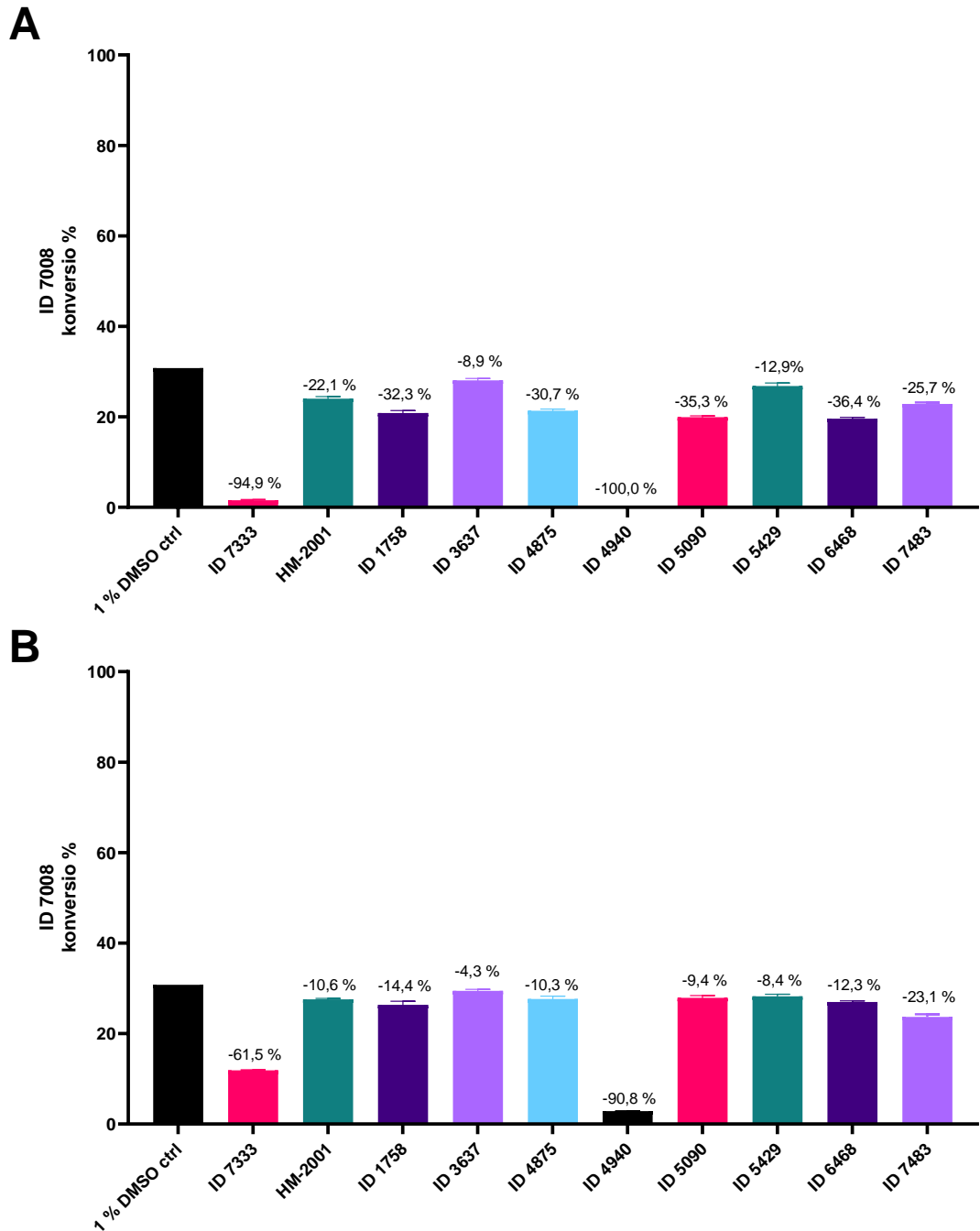


Kuva 18. **HSD17β10-entsyymin inhibitiomääritys ID 7333-inhibiittorilla ajan funktiona.** Toimivin inhibiittoripitoisuus ID 7333-inhibiittorilla oli 10 µM, mutta myös 1 µM pitoisuudella havaitaan inhibitiota. Määritys tehtiin 75 minuutin inkuboinnilla UPLC-määrityksenä. Määrityksen proteiinipitoisuus oli 5 µg/ml ja inhibitiopitoisuudet olivat 10 µM, 1 µM ja 100 nM. Kuvaajassa esiintyvät värit erottavat negatiivisen kontrollin ja eri inhibiitipitoisuudet toisistaan.

6.6.2 HSD17β10-entsyymin inhibiittoreiden seulonta

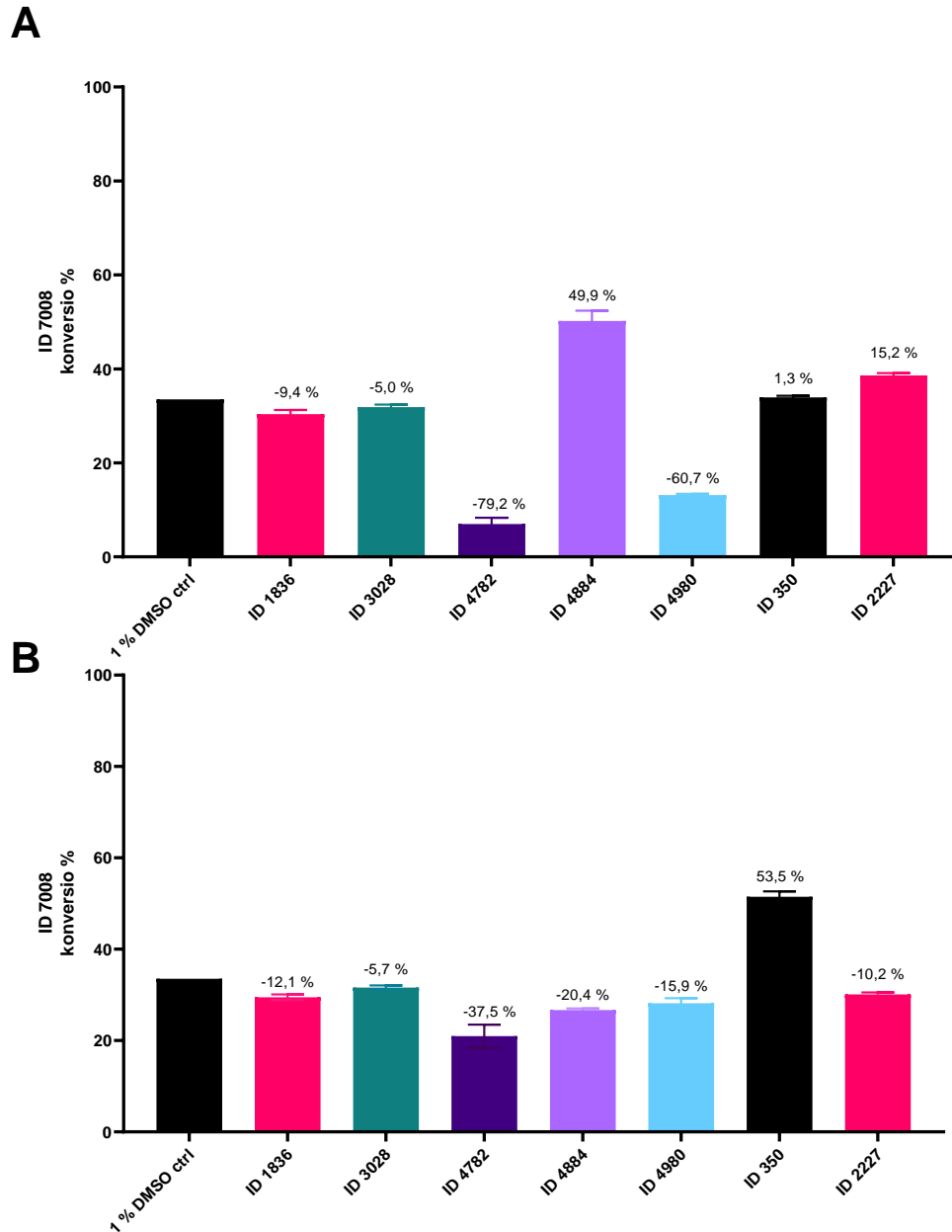
Inhibiittoreille tehtiin kaksi seulontamääritystä fluoresenssianalyysinä (inhibiittoriryhmä 1, kuva 19 ja inhibiittoriryhmä 2, kuva 20). Aiempien määritysten pohjalta valittiin proteiinkonsentraatioksi 5 µg/ml ja inhibiittoripitoisuuksiksi 10 µM ja 1 µM, ja inkubointiaika oli 45 minuuttia. Kaksi inhibiittoria havaittiin toimiviksi, joista ID 4090 oli inhiboitunut kokonaan (inhibitio -100 %) 10 µM pitoisuudella ja ID 7333 inhibitio pysyy samanlaisena edelliseen testiin verrattuna (inhibitio 94,9 %) (kuva 19). Inhibiittoriryhmä 2:n tuloksista (kuva 20) pääteltiin, että 10 µM pitoisuudella ID 4980 (inhibitio -60,7 %) ja ID 4782 (inhibitio -79,2 %) (kuva 20, A) ovat toimivia inhibiittoreita. Kun näiden inhibiittoreiden 10 µM

pitoisuudella tehdyn määrittelyn tuloksia verrattiin 1 μM pitoisuudella tehdyn määrittelyn tuloksiin, huomattiin, että 1 μM pitoisuudella ID 4980 (inhibitio -15,9 %) ja ID 4782 (inhibitio -37,5 %) (kuva 20, B) on huomattavasti huonompi.



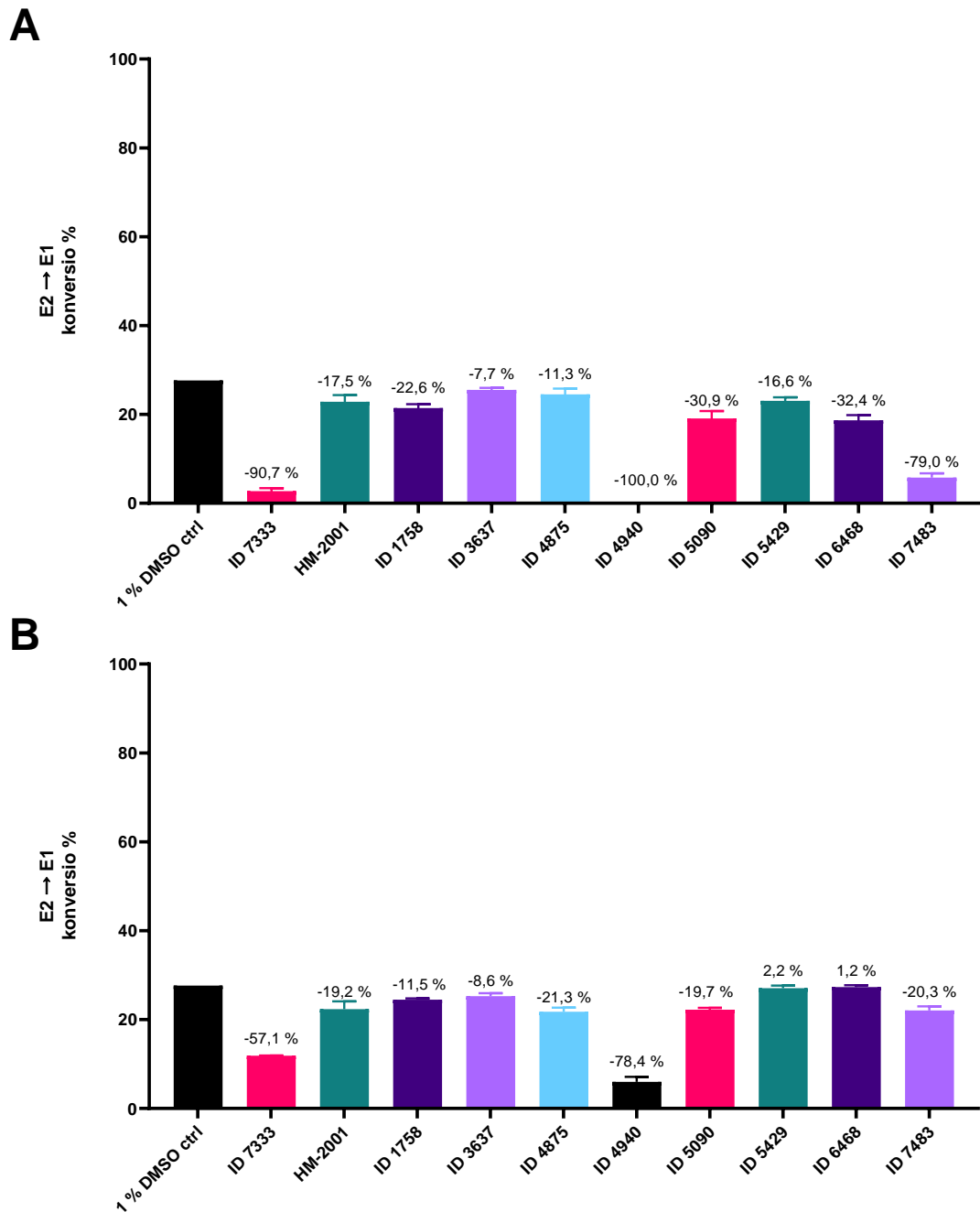
Kuva 19. Inhibiittoriryhmä 1: HSD17 β 10-entsyymin inhibiittoreiden seulonta kahdella inhibiittoripitoisuudella. Toimivat inhibiittorit olivat 10 μM ja 1 μM pitoisuuksilla

ID 7333 ja ID 4940. Määritys tehtiin 45 minuutin inkuboinnilla fluoresenssimäärityksenä. A-kuvaajassa 10 μM inhibiittoripitoisuus ja B-kuvaajassa 1 μM inhibiittoripitoisuus. Kuvaajissa esiintyvät värit erottavat negatiivisen kontrollin ja eri inhibiittorit toisistaan.

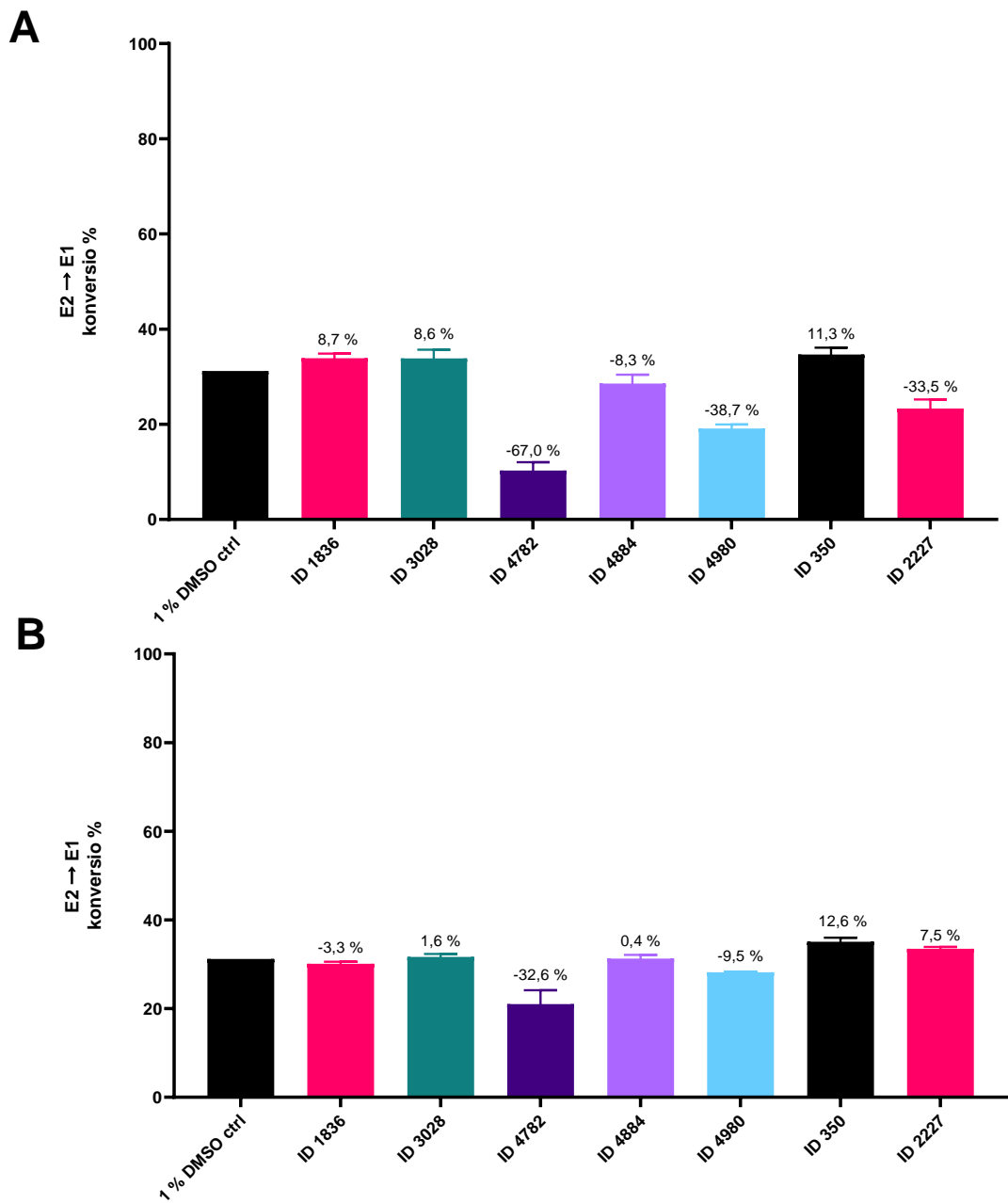


Kuva 20. **Inhibiittoriryhmä 2: HSD17 β 10-entsyymin inhibiittorien seulonta kahdella inhibiittoripitoisuudella.** Toimivat inhibiittorit olivat 10 μM pitoisuudella ID 4782 ja ID 4980, kun taas 1 μM pitoisuudella ei ollut toimivia inhibiittoreita. Määritys tehtiin 45 minuutin inkuboinnilla fluoresenssimäärityksenä. A-kuvaajassa 10 μM inhibiittoripitoisuus ja B-kuvaajassa 1 μM inhibiittoripitoisuus. Kuvaajissa esiintyvät värit erottavat negatiivisen kontrollin ja eri inhibiittorit toisistaan.

Vastaavat inhibiittorimääritykset tehtiin myös UPLC-analyysinä 75 minuutin inkubointiajalla (kuva 21 ja kuva 22). Inhibiittoriryhmä 1:n tuloksista (kuva 21) huomattiin, että ne olivat verrattavissa aiempiin fluoresenssianalyysin tuloksiin (kuva 19 ja kuva 20), ja parhaimmiksi inhibiittoreiksi nousivat ID 4090 (inhibitio -100 %) ja ID 7333 (inhibitio -90,7 %) 10 µM pitoisuudella (kuva 21, A). Toimivaksi inhibiittoriksi todettiin myös ID 7483 10 µM pitoisuudella (inhibitio -79,0 %) (kuva 21, A). ID 7333 (inhibitio -57,1 %) ja ID 4940 (inhibitio -78,4 %) toimivat myös 1 µM pitoisuudella (kuva 21, B). Inhibiittoriryhmä 2:n tuloksista (kuva 22) pääteltiin, että ID 4782 inhiboi toimivasti 10 µM pitoisuudella (kuva 22, A). Pitoisuudella 1 µM yksikään inhibiittoreista ei toimi toivotulla tavalla, ja inhibitio on huono (kuva 22, B).



Kuva 21. **Inhibiittoriryhmä 1: HSD17β10-entsyymin inhibiittoreiden seulonta kahdella inhibiittoripitoisuudella.** Toimivia inhibiittoreita olivat 10 µM pitoisuudella ID 7333, ID 4940 ja ID 7483, ja 1 µM pitoisuudella toimivimmiksi inhibiittoreiksi osoittautui ID 7333 ja ID 4940. Määritys tehtiin 75 minuutin inkuboinnilla UPLC-määrityksenä. A-kuvaajassa 10 µM inhibiittoripitoisuus ja B-kuvaajassa 1 µM inhibiittoripitoisuus. Kuvaajissa esiintyvät värit erottavat negatiivisen kontrollin ja eri inhibiittorit toisistaan.



Kuva 22. **Inhibiittoriryhmä 2: HSD17β10-entsyymin inhibiittorien seulonta kahdella inhibiittoripitoisuudella.** Toimiva inhibiittori oli 10 µM pitoisuudella ID 4782, ja 1 µM pitoisuudella ei ollut toimivia inhibiittoreita. Määritys tehtiin 75 minuutin inkuboinnilla UPLC-määrityksenä. A-kuvaajassa 10 µM inhibiittoripitoisuus ja B-kuvaajassa 1 µM inhibiittoripitoisuus. Kuvaajissa esiintyvät värit erottavat negatiivisen kontrollin ja eri inhibiittorit toisistaan.

7 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää HSD17 β 10-entsyymille aktiivisuustesti. Menetelmää luodessa tehtiin monia analyysejä ja määriksiä. Niiden avulla pystyttiin määrittämään optimaaliset arvot entsyymien toiminnalle. Kehitettiin uusi menetelmä, jolla pystyttiin seulomaan HSD17 β 10-entsyymien inhibiittoreita.

Puskurivertailumääriyksissä havaittiin, että puskuriliuoksen pH-arvolla on suuri merkitys reaktion etenemiseen. Toimivimmaksi puskuriksi valittiin Tris-HCl -puskuri, sillä se toimi molemmilla analyysilaitteilla. KH₂PO₄ -puskurilla tehdyissä määriyksissä saadut rinnakkaiset arvot poikkesivat enemmän toisistaan, kuin Tris-HCl -puskurilla tehdyissä määriyksissä. pH-arvoksi valittiin 8,5, koska entsyymireaktio toimi tällä pH-arvolla parhaiten. Entsyymien toiminta heikkeni ja jopa loppui, kun pH-arvot laskivat happamuuden puolelle, koska HSD17 β 10-entsyymi ei toimi happamassa olosuhteessa (Li ym. 2021, 412–427).

Kirjallisuuden pohjalta optimaalinen pH-arvo dehydrogenaasireaktiolle on 9,3 ja reduktaasireaktiolle 7,0 (Shafqat ym. 2003, 49–60). Tehdyissä määriyksissä optimaalisin pH-arvo määritettävistä pH-arvoista (5,5; 6,5; 7,5 ja 8,5) oli pH 8,5. Muut reaktio-olosuhteet mahdollisesti vaikuttivat myös reaktion etenemiseen, ja määriyksien emäksisin pH-arvo oli 8,5, joten ei voida olla varmoja, että olisiko reaktio edennyt paremmin vielä emäksisemmässä pH-arvossa. Kirjallisuuteen verraten on yhtenevää, että entsyymireaktio eteni emäksisemmässä pH-arvossa selkeästi paremmin.

Substraatti ID 7010 ei soveltunut fluoresenssimenetelmään Tris-HCl -puskurilla, pH-arvoilla 7,5 ja 8,5 ja kofaktorilla NAD⁺, koska ”taustafluoresenssi” oli 50 % jo 0-kohdassa. Tris-HCl -puskurilla, molemmilla pH-arvoilla, kofaktori NAD⁺ toimi selkeästi paremmin kuin NADP⁺, kun substraattina oli ID 7008. Tämä saattaa johtua siitä, että NAD⁺ eroaa rakenteellisesti NADP⁺:sta. NADP⁺ sisältää ylimääräisen fosfaattiryhmän riboosin 2’-osassa, mikä pitää huolen adeniiniosasta, kun taas NAD⁺ ei sisällä kyseistä fosfaattiryhmää. (Lakna 2017.)

Kirjallisuudesta löytyneisiin tietoihin verraten, entsyymi toimi toivotulla tavalla. Kofaktori NAD⁺ toimi kirjallisuudesta löytyvän tiedon mukaisesti, ja se muuttuu reaktion edetessä NADH:ksi. Kirjallisuuden mukaan optimaalinen olosuhde inkuboinnille on lämpökaapissa (+25 °C), mutta kyseisissä määriyksissä ei ollut käytetty suurempia lämpötiloja. Määriyksistä saatujen tulosten perusteella lämpötilan nostaminen vaikuttaa nopeuttavasti

kemiallisen reaktion aktiivisuuteen, kuten määrittämissä 5.2. Proteiinin aktiivisuus kasvaa huomattavasti lämpökaapissa (+37 °C) verrattuna huoneenlämpötilassa tapahtuvaan inkubointiin (RT), ja tämän takia valittiin menetelmään inkubointiolosuhteeksi lämpökaappi (+37 °C). Mahdollisesti muut reaktio-olosuhteet vaikuttivat siihen, että reaktio eteneminen tapahtui toimivammin lämpimämmässä olosuhteessa (+37 °C), kuin kirjallisuuden mukaisessa lämpötilassa (+25 °C). (Shafqat ym. 2003, 49–60.)

Kirjallisuuden arvoon verraten on otettava huomioon myös muut reaktio-olosuhteet, jotka vaikuttavat reaktion etenemiseen (esimerkiksi proteiinikonsentraatio, substraattipitoisuus ja kofaktoripitoisuus). Mahdollisesti olisi voitu valita suurempi proteiinikonsentraatio, jolloin inkubointiaikaa olisi voitu lyhentää. Tällöin proteiinikonsentraatioksi olisi valittu 10 µg/ml, koska konversioprosentti oli noin 30 % 50 minuutin kohdalla. Proteiinia kuitenkin säästetään ja liiallinen proteiinimäärä määrittämissä saattaa häiritä reaktiota, ja tästä syystä valittiin matalampi pitoisuus. Mahdollisesti liiallinen proteiinin määrä saattaisi vääristää analyysilaitteen antamia tuloksia.

Substraattipitoisuuksista suurimmat pitoisuudet toimivat parhaiten. Menetelmään valittiin 7,5 nM ³H-E2 + 1 µM E2, koska tuloksista havaittiin, että se oli lähimpänä lineaarista aluetta (30 % konversio) 75 minuutin inkuboinnilla. Pienemmät substraattipitoisuudet vaativat pidemmän inkubointiajan ja mahdollisesti myös suuremman proteiinikonsentraation. Kirjallisuudessa on mainittu, että entsyymi toimii 17β-estradiolin kanssa, ja reaktiossa se muuttuu estroniksi (E1) (Vinklarova ym. 2020, 231–243). HSD17β10-entsyymille on mainittu kirjallisuudessa myös muita substraatteja, esimerkiksi 5α-dihydrotestosteroni. Menetelmän kehitykselle olisi hyödyllistä testata myös muiden, kuin tämän opinäytetyön määrittämissä käytettyjen, substraattien toimivuutta, sillä ne voisivat mahdollisesti antaa lisätietoja muun muassa HSD17β10-entsyymien liittymistä Alzheimerin tautiin. (Shafqat ym. 2003, 49–60.)

Tavoitteena oli kehittää menetelmä, jossa pystytään tutkimaan entsyymien toimintaa. Menetelmä voidaan katsoa toimivaksi, koska substraatti (E2) ja kofaktori (NAD⁺) toimivat kirjallisuuden mukaisesti. Inhibiittorimäärittäysten tulokset olivat myös vertailukelpoisia keskenään molemmilla analyyseillä. Kirjallisuuden inhibiittori (bentsotiatsol-6-sulfonyyli) toimi opinäytetyössä toteutetuissa määrittämissä, kuten kirjallisuudessakin todettiin (Aitken ym. 2019, 1–23). Tieteellisten artikkelien julkaisuissa määrittäksiä on tehty erilaisilla reaktio-olosuhteilla, esimerkiksi parametrit vaihtelevat käytetystä puskurista (DSF-puskuri: 150 mM NaCl + 10 mM HEPES, Tris-HCl -puskuri: 100 mM NaCl + 20 mM Tris-HCl), sen pH-arvosta (pH 7,5; 9,3), kofaktoripitoisuuksista (1 mM, 100 µM) ja reaktion

inkubointilämpötilasta (+ 25 °C) eri substraattipitoisuuksiin (1 mM). Yhtenevää on, että tieteellisissä julkaisuissa on käytetty samaa substraattia (E2) ja kofaktoria (NAD⁺). (He ym. 2000, 139–143; Shafqat ym. 2003, 49–60 Oerum ym. 2017, 3294–3302.) HSD17β10-proteiinin aktiivisuus määräytyy proteiinin tuoton ja sen puhdistuksen perusteella, ja ne vaikuttavat määrittämisessä valittuihin parametreihin.

Menetelmällä täytyy tehdä useampia toistoja, jotta pystytään olemaan varmoja, että se on toimiva. Sitä ennen menetelmää ei kannata hyödyntää lääkemolekyylien seulonnassa. Yrityksessä tehtävissä muissa vastaavissa proteiinimäärittämisissä käytetään Tris-HCl -puskuria pH-arvolla 7,5, joten jos halutaan yhdenmukaistaa tämä uusi kehitetty määrittäminen muiden proteiinimäärittämisten kanssa, pitäisi testit toistaa myös samalla puskurin pH-arvolla. Yrityksessä tehtävien proteiinimäärittämisten yhdenmukaistaminen mahdollistaisi määrittämisen tekemisen helpommin, koska puskuria ei tarvitsisi valmistaa kuin yhtä, joka sopii kaikkiin proteiinimäärittämiin. Testiainekirjaston aineita on testattava enemmän tällä opinnäytetyössä kehitetyllä menetelmällä, jotta tuloksia pystytään vertaamaan aikaisempien määrittämisten tuloksiin.

Entsyymien toimintaan vaikuttavien tekijöiden analyysit fluoresenssi- ja UPLC-analyysillä todettiin toimiviksi saatujen tulosten pohjalta. Opinnäytetyölle asetetut tavoitteet toteutuivat, ja kehitettiin uusi HSD17β10-entsyymiaktiivisuustesti osaksi yrityksen lääkeaine-seulontaa.

LÄHTEET

Aitken, L.; Ondrej, B.; McKelvie, R.; Hughes, B.; Hroch, L.; Schmidt, M.; Major, L.; Vinklarova, L.; Kuca, K.; Smith, T.; Musilek, K. & Gunn-Moore, F. 2019. Novel Benzothiazole-Based Ureas as 17 β -HSD10 Inhibitors, A Potential Alzheimer's Disease Treatment, 1–23. *MDPI*. Viitattu 26.5.2021. <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/15/2757/htm>.

Augustyn, A.; Zeidan, A.; Zelazko, A.; Eldridge, A.; McKenna, A.; Tikkanen, A.; Gadzikowski, A.; Schreiber, B.; Duignan, B.; Mahajan, D.; Promeet, D.; Goldstein, E.; Rodriguez, E.; Gregersen, E.; Shukla, G.; Liesangthem, G.; Lotha, G.; Young, G.; Bolzon, H.; Luebering, J.; Wallenfeldt, J.; Hibler, J.; Raffety, J.; Gupta, K.; Rogers, K.; Chmielewski, K.; Manchanda, K.; Heintz, K.; Chaveriat, L.; Dixon, L.; Matthias, M.; Petruzzello, M.; Ray, M.; Metych, M.; Bauer, P.; Riley, P.; Bhathya, P.; Vasich, S.; Hollar, S.; Singh, S. & Gupta, S. 2018. Tritium. *Britannica*. Viitattu 5.5.2021. <https://www.britannica.com/science/tritium>.

Biology Online. 2021. Progress curve. Biology Online. Viitattu 5.5.2021. <https://www.biologyonline.com/dictionary/progress-curve>.

Chang Hwei, C.; Battaglioli, G.; Martin, D.; Hobart, S. & Colón, W. 2003. Distinctive interactions in the holoenzyme formation for two isoforms of glutamate decarboxylase, 63–71. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Viitattu 26.5.2021. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00522-8](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00522-8).

Cornish-Bowden, A. 1979. Basic principles of chemical kinetics. Teoksessa *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 1–15. Elsevier. Viitattu 3.5.2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-408-10617-7.50006-7>.

CSUSM. 2018. Inhibition of Enzyme Activity. *CSUSM*, 1–7. Viitattu 3.5.2021. <http://www.csun.edu/~hcchm001/5enzyme.pdf>.

Duodecim. 2016a. In vivo. *Duodecim Terveyskirjasto*. Viitattu 5.5.2021. <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt01392>.

Duodecim. 2016b. Lääketieteen sanasto > Substraatti. *Duodecim Terveyskirjasto*. Viitattu 5.5.2021. <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03275>.

ECHA. 2021. In vitro -menetelmät. *European Chemicals Agency*. Viitattu 16.5.2021. <https://echa.europa.eu/fi/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/in-vitro-methods>.

Feng, S.; Ngo, H.; Guo, W.; Chang, S.; Nguyen, D.; Cheng, D.; Varjani, S.; Lei, Z. & Liu, Y. 2021. Roles and applications of enzymes for resistant pollutants removal in wastewater treatment. *Bioresource Technology*. Viitattu 18.5.2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125278>.

Forendo Pharma. 2021. Translating intracrinology science into therapeutic solutions. Forendo Pharma. Viitattu 17.4.2021. <https://forendo.com/>.

Apoorva, G.; Kagliwal, L. & Singhal, R. 2013. Biotransformation of Polyphenols for Improved Bioavailability and Processing Stability. Teoksessa *Advances in Food and Nutrition Research*, 69:183–217. Academic Press Inc. Viitattu 18.4.2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410540-9.00004-1>.

Härmä, H. & Juva, K. 2021. Alzheimerin tauti. *Muistiliitto*, 1–11. Viitattu 4.4.2021. https://www.muistiliitto.fi/application/files/1015/1385/4659/Alzheimerin_tauti.pdf.

Hayes, K.; Leong, L.; Henriksen, R.-A.; Bouchard, B.; Ouellette, L.; Church, W & Tracy, P. 1994. α -Thrombin-induced human platelet activation results solely from formation of a specific enzyme-substrate complex. *Journal of Biological Chemistry* 269 (46): 28606–12. Viitattu 23.5.2021. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)61948-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)61948-4).

He, X.; Yang, Y.; Schulz, H. & Yang, S. 2000. Intrinsic alcohol dehydrogenase and hydroxysteroid dehydrogenase activities of human mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 139–43. Viitattu 14.4.2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10600649/>.

Hiltunen, J.; Kastaniotis, A.; Autio, K.; Jiang, G.; Chen, Z. & Glumoff, T. 2019. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases as acyl thioester metabolizing enzymes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd. Viitattu 14.4.2021. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.11.012>.

Hroch, L.; Benek, O.; Guest, P.; Aitken, L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Musil, K. 2016. Design, synthesis and in vitro evaluation of benzothiazole-based ureas as potential ABAD/17 β -HSD10 modulators for Alzheimer's disease treatment. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 26 (15): 3675–78. Viitattu 3.3.2021. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.087>.

Jazbutyte, V.; Kehl, F.; Neyses, L. & Pelzer, T. 2009. Estrogen receptor alpha interacts with 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384 (4): 450–54. Viitattu 3.3.2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.139>.

Kärki, K. 2016. Ketonien stereoselektiivinen pelkistys entsyymeillä. Jyväskylän Yliopisto. Viitattu 10.4.2021. <https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/50041/1/URN%3ANBN%3Afi%3Aju-201606022819.pdf>.

Korman, S. & Yang, S. 2007. HSD17B10 replaces HADH2 as the approved designation for the gene mutated in 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. Academic Press. Viitattu 2.5.2021. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.01.001>.

Lähteenmäki, M. 2010. Saccharomyces cerevisiae -hiivan solunsäisen pH:n määrittäminen fluoresenssimikroskoopilla. *Metropolia Ammattikorkeakoulu*, 10–11. Viitattu 10.5.2021. <https://core.ac.uk/download/pdf/38007808.pdf>.

Laine, M. 2017. Peptide Break - Teknologian karakterisointi Qret-tekniikan avulla. Viitattu 10.5.2021. https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/129264/Laine_Mari.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Lakna. 2017. Difference Between NAD and NADP. *PEDIAA*. Viitattu 22.5.2021. <https://pediia.com/difference-between-nad-and-nadp/>.

Yaohui, L.; Zhang, R & Xu, Y. 2021. Structure-based mechanisms: On the way to apply alcohol dehydrogenases/reductases to organic-aqueous systems. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. Viitattu 15.4.2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.068>.

Lievonen, J. 2017. Plasmasolutaudit (luokittelu). Suomen hematologiyhdistys Ry. Viitattu 18.5.2021. <https://www.hematology.fi/fi/hoito-ohjeet/veritaudit/plasmasolutaudit/plasmasolutaudit>.

Lukacik, P.; Kavanagh, K. & Oppermann, U. 2006. Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. Teoksessa *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248:61–71. Elsevier. Viitattu 15.4.2021. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.007>.

Luo, M.; Mao, J. & Schulz, H. 1995. Short-chain 3-Hydroxy-2-methylacyl-CoA dehydrogenase from rat liver: Purification and characterization of a novel enzyme of isoleucine metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 321 (1): 214–20. Viitattu 15.5.2021. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1388>.

Lustbader, J.W.; Cirilli, M & Wu, H. 2004. Abeta-bound human ABAD structure [also known as 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (Type II HADH), Endoplasmic reticulum-associated amyloid beta-peptide binding protein (ERAB)]. *Worldwide Protein Data Bank*. Viitattu 16.5.2021. https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00001so8.

Manubolu, M.; Goodla, L.; Pathakoti, K. & Malmlöf, K. 2018. Enzymes as direct decontaminating agents-mycotoxins. Teoksessa *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*, 313–30. Elsevier Inc. Viitattu 15.4.2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00016-2>.

Moura-Tamames, S.; Ramos, M. & Fernandes, P. Modelling β -1,3-exoglucanase-saccharide interactions: Structure of the enzyme-substrate complex and enzyme binding to the cell wall. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. Viitattu 15.5.2021. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326309000199>.

Nagel, B.; Dellweg, H. & Gierasch, L. 1992. Glossary for Chemists of Terms used in Biotechnology. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 150. Viitattu 15.4.2021. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac199264010143/html>.

Nikolova, K.; Tenekedjiev, N. & Kolev, K. 2008. Uses and misuses of progress curve analysis in enzyme kinetics. *Versita*. Viitattu 15.4.2021. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11535-008-0035-4/html>.

Obaleye, J.; Ajibola, A.; Bernardus, V.; Hosten, E. & Ozarowski, A. 2020. Synthesis, spectroscopic, structural and antimicrobial studies of a dimeric complex of copper(II) with trichloroacetic acid and metronidazole. *Inorganica Chimica Acta*. Viitattu 15.4.2021. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119404>.

Palmer, T. & Bonner, P. 2011a. Kinetics of Single-Substrate Enzyme-Catalysed Reactions. Teoksessa *Enzymes*, 105–25. Elsevier. Viitattu 14.4.2021. <https://doi.org/10.1533/9780857099921.2.105>.

Palmer, T. & Bonner, P. 2011b. Specificity of Enzyme Action. Teoksessa *Enzymes*, 67–75. Elsevier. Viitattu 14.4.2021. <https://doi.org/10.1533/9780857099921.1.67>.

Park, S.; Yang, J.; Jo, H.; Kang, B.; Oh, S. & Jung, G. 2019. Catalytic RNA, ribozyme, and its applications in synthetic biology. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. Viitattu 15.4.2021. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107452>.

Paul, C.; & Fernández, V. 2016. Biocatalysis and Biotransformation in Ionic Liquids. Teoksessa *Ionic Liquids in Lipid Processing and Analysis: Opportunities and Challenges*, 11–58. Elsevier Inc. Viitattu 15.4.2021. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-047-4.00002-7>.

Porkka, J. 2016. HSD17B1-inhibiittoreiden seulontamenetelmän kehitys. Opinnäytetyö. Bio- ja elintarviketekniikan koulutus. Turku: Turun ammattikorkeakoulu. Viitattu 18.4.2021. https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/109494/Porkka_jasmin.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Rahimi, A.; Madadkar-Sobhani, A.; Touserani, R. & Goliaei, B. 2013. Efficacy of function specific 3D-motifs in enzyme classification according to their EC-numbers. *Journal of Theoretical Biology*, 36–43. Viitattu 18.4.2021. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.07.003>.

Rauschenberger, J.; Schöler, K.; Sass, J.; Sauer, S.; Djuric, Z.; Rumig, C.; Wolf, N.; Okun, J.; Kölker, S.; Schwarz, H.; Fischer, C.; Grziwa, B.; Runz, H.; Nümann, A.; Shafqat, N.; Kavanagh, K.; Hämmerling, G.; Wanders, R.; Shield, J.; Wendel, U.; Stern, D. & Hof, N. 2010. A non-enzymatic function of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 is required for mitochondrial integrity and cell survival. *PubMed*, 51–62. Viitattu 18.4.2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20077426/>.

Reunanen, H.; Oksa, V-V.; Dadu, E.; Välikehto, O.; Lammi, M.; Rilla, K.; Sironen, R.; Kauhanen, M.; Tyrmi, T.; Turunen, M.; Kaijankoski, H.; Hyvönen, P.; Tuukkanen, J.; Ruotsalainen, T.; Ruuska, T.; Puijola, I.; Häviälä, J.; Syväälä, H.; Purmonen, S.; Vainio, M. & Leveelahti, L. 2006a. Koostumus > Proteiinit > Proteiinien tehtäviä > Entsyymit. Solunetti. Viitattu 13.3.2021. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/entsyymit1/2/>.

Reunanen, H.; Oksa, V-V.; Dadu, E.; Välikehto, O.; Lammi, M.; Rilla, K.; Sironen, R.; Kauhanen, M.; Tyrmi, T.; Turunen, M.; Kaijankoski, H.; Hyvönen, P.; Tuukkanen, J.; Ruotsalainen, T.; Ruuska, T.; Puijola, I.; Häviälä, J.; Syväälä, H.; Purmonen, S.; Vainio, M. & Leveelahti, L. 2006b. Sanasto. Solunetti. Viitattu 13.3.2021. <https://www.solunetti.fi/fi/sanasto/k/>.

Reunanen, H.; Oksa, V-V.; Dadu, E.; Välikehto, O.; Lammi, M.; Rilla, K.; Sironen, R.; Kauhanen, M.; Tyrmi, T.; Turunen, M.; Kaijankoski, H.; Hyvönen, P.; Tuukkanen, J.; Ruotsalainen, T.; Ruuska, T.; Puijola, I.; Häviälä, J.; Syväälä, H.; Purmonen, S.; Vainio, M. & Leveelahti, L. 2016. Koostumus > Proteiinit > Proteiinien tehtäviä > Entsyymit > Entsyymi-inhibiittorit. Solunetti. Viitattu 13.3.2021. https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/entsyymiaktiivisuuden_saately/2/.

Rockinger, U.; Müller, C.; Bracher, F.; Funk, M. & Winter, G. 2021. DMSO as new, counterintuitive excipient for freeze-drying human keratinocytes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Viitattu 25.5.2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105746>.

Sarvikas, P.; Suorsa, M.; Rintamäki, E.; Vapaavuori, E.; Aro, E-M. & Tyystjärvi, E. 2017. *Fotosynteesi*. 1. Painos. Books on demand. Viitattu 15.4.2021. https://books.google.fi/books?id=PWB0DwAAQBAJ&pg=PA15&lpg=PA15&dq=entsyymin+toiminnalliset+ryhmät&source=bl&ots=LfsUXPT7so&sig=ACfU3U28bpilX_j9RM4R5PVKdMjn16bekw&hl=fi&sa=X&ved=2ahUKEwj_-D90NDwAhWM_7sIHTXcBMIQ6AEwEnoECBkQAw#v=onepage&q=entsyymin+toiminnalla.

Shafqat, N.; Marschall, C.; Filling, H-U.; Nordling, E.; Wu, X-Q.; Björk, L.; Thyberg, J.; Mårtensson, E.; Salim, S.; Jörnvall, H. & Oppermann, U. 2003. Expanded substrate screenings of human and Drosophila type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3alpha/7alpha/7beta/17beta/20beta/21-H. *Biochemical Journal*, 49–60. Viitattu 20.5.2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1223751/>.

Shlomi, R.; Urbakh M. & Klafaterc, J. 2014. Role of substrate unbinding in Michaelis–Menten enzymatic reactions. *National Center for Biotechnology Information*, 4391–4396. Viitattu 30.5.2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970482/>.

University of Tartu. 2021. LC-MS Method Validation. *University of Tartu*. Viitattu 10.5.2021. https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/33-estimating-linear-range.

von Weymarn, N. 2017. Entsyymit ja niiden tuotanto. VTT Biotechnology. Viitattu 14.4.2021. <http://www.btnk.fi/files/pdf/weymarn.pdf>.

Vähätalo, S. 2018. Metabolomiikka massaspektrometrialla, 37–38. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto. Kemian laitos. Viitattu 10.5.2021. <https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/57494/1/URN:NBN:fi:juu-201804061934.pdf>.

- Vaidya, A. & Annapure, U. 2018. Enzymes in biosensors for food quality assessment. Teoksessa *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*, 659–74. Viitattu 12.4.2021. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00038-4>.
- Villikka, A. 2012. Elintarvike-entsyymien säilyvyyssuranta EFSA-rekisteröintiä varten. Opinnäytetyö. Bio- ja elintarviketekniikan koulutus. Helsinki: Metropolia ammattikorkeakoulu. <https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/48478/Insinööri.pdf?sequence=1>.
- Vinklarova, L.; Schmidt, M.; Benek, O.; Kuca, K.; Gunn-Moore, F & Musilek, K. 2020. Friend or enemy? Review of 17 β -HSD10 and its role in human health or disease. *Journal of Neurochemistry*, 231–43. Viitattu 20.5.2021. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.15027>.
- Wei, X.; Meng, D. & You, C. 2020. In vitro metabolic engineering: current status and recent progress. Teoksessa *Systems and Synthetic Metabolic Engineering*, 183–206. Elsevier. Viitattu 12.4.2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821753-5.00008-3>.
- Yang, S.; He, X.; Isaacs, C.; Dobkin, C.; Miller, D. & Philipp, M. 2014. Roles of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in neurodegenerative disorders. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Viitattu 25.3.2021. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.001>.
- Yang, S.; He, X. & Miller, D. 2007. HSD17B10: A gene involved in cognitive function through metabolism of isoleucine and neuroactive steroids. *Molecular Genetics and Metabolism*. Viitattu 23.3.2021. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.06.001>.
- Yun, K. & Han, T. 2020. Relationship between enzyme concentration and Michaelis constant in enzyme assays. *Biochimie*, 12–20. Viitattu 18.4.2021. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.06.002>.
- Zschocke, J. 2012. HSD10 diase: Clinical consequences of mutations in the HSD17B10 gene. Viitattu 5.5.2021. *PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22127393/>.

Reagenssit

Asetonitrilli, C_2H_3N , (Ultra) Gradient HPLC Grade J.T. Baker, Lot: 2024801801, CAS: 75-05-8

β -nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (NADH), $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$, reduced disodium salt hydrate, SIGMA, Lot: #SLBV8731, N8129-100MG

β -nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti (NADP), $C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$, sodium salt hydrate, SIGMA, Lot: #SLBV4386, N0505-100MG

Dimetyylisulfoksidi (DMSO), C_2H_6OS , Merck KGaA, Lot: K51637131951, 1.02931.1000

Ditiotreitoli (DTT), $C_4H_{10}O_2S_2$, ≥ 98 % (TLC), ≥ 99.0 % (titration), Sigma-Aldrich, Lot: #SLBT1947, CAS: 3483-12-3

Ecoscint™ A, National diagnostics, Lot: 04-19-17

Etanoli (EtOH), C_2H_5OH , 99,5 paino-%, ALTIA Corporation

Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA), $C_{10}H_{16}N_2O_8$, 99.0 – 101.0 %, SIGMA, Lot: #SLBC8362V, CAS: 6381-92-6

Glyseroli, $C_3H_8O_3$, 99.0 – 101.0 %, Sigma-Aldrich, Lot: #STBJ5141, CAS: 56-81-5

Inhibiittoriaine ID 7008, 10 mM, liuotettu: 14.09.2020

Inhibiittoriaine ID 7009, 10 mM, liuotettu: 14.09.2020

Inhibiittoriaine ID 7010, FOR-7387, FO-CODE: 116 ak, 10 mM in DMSO, liuotettu 02.06.2020

Inhibiittoriaine ID 7011, FOR-7388, FO-CODE: 116 keto, 10 mM in DMSO, liuotettu 23.06.2020

Kaliumhydroksidi (KOH), ≥ 85 %, Sigma-Aldrich, Lot: SCBC2010V, CAS: 1310-58-3

Kaliumvetyfosfaatti, KH_2PO_4 , $\geq 99,5$ %, Merck KGaA, Lot: AM0973673614, CAS: 7778-77-0

Metanoli, CH₃OH, (Ultra) Gradient HPLC Grade J.T. Baker, Lot: 2021301866, CAS: 67-56-1

Muurahaishappo, CH₂O₂, ≥ 99 %, VWR Chemicals, Lot: ZE650458, CAS: 64-18-6

Natriumkloridi (NaCl), ≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich, Lot: #STBJ5008, CAS: 7647-14-5

Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (NAD), C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂, free acid, Sigma-Aldrich, Lot: K51804342008, 1.24542.0005

Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti (NADPH), C₂₁H₂₉N₇O₁₇P₃, PanReac Appli-Chem, Lot: 0F008690, A1395.0001

Proteaasi-inhibiittori cocktail tabletit, cOplete™, Roche Diagnostics GmbH, Lot: 44077300, 11836145001

Proteiini HSD17B10, Q99714-1, Lot: U3759FD140-2/P1FD001, 1,49 mg/ml, 90 %

Suolahappo (HCl), fuming 37 %, Merck KGaA, Lot: Z0669417032, 1.00317.1000

Trikloorietikkahappo (TCA), C₂HCl₃O₂, 6.1 N Solution, MP Biomedicals, Lot: S0621, CAT: 196057

Tris(hydroksimetyyli)aminometaani (Tris base), C₄H₁₁NO₃, Fisher Bioreagents, Lot: 178205, CAS: 77-86-1

Vesi, filtered at 0,2 µm, VWR Chemicals, Lot: 201014026, CAS: 7732-185

³H-Androsteenioli, Androst-4-ene-3,17-dione [1,2,6,7-³H(N)], C₁₉H₂₆O₂, PerkinElmer, Lot: 2497566, NET469250UC

³H-Estradioli, [2,4,6,7-³H(N)], C₁₈H₂₄O₂, PerkinElmer, Lot: 2736767 & Lot: 2785749, NET317250UC

³H-Estroni, [6,7-³H(N)], C₁₈H₂₂O₂, American Radiolabeled Chemicals, Lot: 201002, ART 0819

³H-Testosteroni, [1,2,6,7-³H(N)], C₁₉H₂₈O₂, Perkin Elmer, Lot: 2776497, NET370250UC

Laitteet

Esikolonne, BEH C18 XBridge VanGuard Cartridge, 130Å, 3,5 µm, 3,9 x 5 mm

Kolonne, XBridge BEH C18 Column, 130Å, 3,5 µm, 4,6 x 50 mm

Nestetuikepumppu, LB 5037, Bertold Technologies

pH-mittari, SCHOTT Instruments, 56-61 mV/pH, Laitenumero: FPL015

pH-yhdistelmäelektrodi, SI Analytics™, BlueLine

Puolimikrovaaka, Mettler Toledo AT261 DeltaRange® Balance, Laitenumero: FPL009

Radio HPLC Detektori, FlowStar² LB 514, Berthold Technologies, Laitenumero: FPL031, Asennettu: 22.2.2017

Staattisuuden poistoportti, Laitenumero: FPL011

Tecan Spark®, Laitenumero: FPL034, Asennettu: 12.8.2019

UPLC-laite, H-Class System, Waters Acquity, Laitenumero: FPL030, Asennettu: 20.1.2017

Suodatuslaitteisto, Greiffenberber Antriebstechnik GmbH Marktred witz, Typ. 4EKF56CX-4 + Waters®, Milford Massachusetts U.S.A, S/N: 0517 + Wika®

96-kuoppalevyt

Laimennoslevy, Mikroplate, 96 well, PS, U-Bottom, Clear, Greiner Bio-One, Lot: E20103QA)

UPLC-analyysien reaktiolevy, Thermo Scientific Nunc -reaktiolevy, 96 well Conical Btm PP Pit Natural, RNASE/DNase-Free, Thermo Fisher Scientific, Lot: 1301846

Suodatuslevy, Merck Millipore Ltd -suodatuslevy, Lot: R0MB18718

UPLC-ajolevy, 96-kuoppalevy, deep square well, 350 µl, no lid, Waters Oy, CAT: WAT058943

Fluoresenssimäärittysten reaktiolevy, OptiPlate™-96 F, Black, 96-well, Pinch bar design, PerkinElmer, Lot: 8040-20481

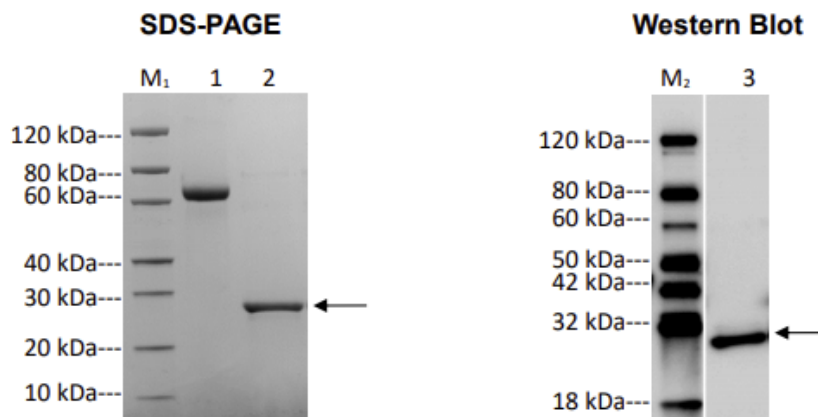
HSD17 β 10-proteiinin sertifikaatti

Certificate of Analysis

Order Number:	U3759FD140-2
Protein Name:	Q99714-1
Shipping Condition:	Dry Ice
Lot Number:	U3759FD140-2/P1FD001

Codon Optimization:	Yes
Expression System & Vector:	<i>E.coli</i> , Expression Vector pET-30a(+)
Expression Optimization:	Yes
Expression Scale:	3 L TB culture
Tag Removal:	No
Purification:	Protein was obtained from supernatant of cell lysate, one-step purification by Ni column

Package:	20.86 mg. 1.00 ml/tube, 14 tubes
Concentration:	1.49 mg/ml, determined by Bradford protein assay with BSA as a standard (ThermoFisher, Cat. No. 23236)
Purity:	90%, estimated by densitometric analysis of the Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel under reducing condition
Sterility:	Sterilized via a 0.22 μ m filter and packaged aseptically
Two cycles of freeze-thaw testing:	No visible precipitation was observed (Referring to appendix Freeze-Thaw Testing)
Storage and Handling:	Store at -80 $^{\circ}$ C. Aliquots should be stored at the same temperature after first use to avoid multiple freeze-thaws
Storage Buffer:	20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.5

SDS-PAGE & Western blot Analysis:**Fig.1 SDS-PAGE and Western blot analysis of Q99714-1**

Lane M₁: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00516

Lane M₂: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00521

Lane 1: BSA (2.00 µg)

Lane 2: Q99714-1 (Reducing condition, 2.00 µg)

Lane 3: Q99714-1 (Reducing condition)

Primary antibody: Mouse-anti-His mAb (GenScript, Cat.No. A00186)