

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2019

Samuli Tyvelä

# HOMOGEENISEN FOSFORILAATIOMÄÄRITYS- MENETELMÄN KEHITTÄMINEN TEHOSEULONTAAN

Samuli Tyvelä

# HOMOGEENISEN FOSFORYLAATIOMÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN TEHOSEULONTAAN

Opinnäytetyössä käsitellään translaation jälkeisiin muokkauksiin kuuluvaa fosforylaatiota. Työssä kehitettiin sammutusresonanssienergiansiirtotekniikkaa (QRET) entsyyмиaktiivisuuden määrittämiseen ja inhibiittorien testaamiseen kolmelle PIM-kinaasille. Tässä työssä kinaasit fosforyloivat substraattipeptidin, eli liittivät siihen fosfaattiryhmän, jolloin substraatti ei pystynyt kiinnittymään myöhemmin lisättyyn  $Eu^{+3}$ -merkattuun peptidiin. Eu-peptidien tehtävä on emittoida fluoresenssisignaaleja energian siirtona mittalaitteessa. Substraatin ollessa fosforyloitu se ei pystynyt suojaamaan Eu-peptidiä, jolloin näytteessä olevat sammuttajamolekyylit peittivät tämän emittoimat signaalit. Kun näytteisiin lisättiin inhibiittoria estämään entsyymin toimintaa, peptidi-peptidi -sidos pääsi syntymään ja signaalit olivat korkeat. Menetelmää optimoitaessa inhibiittorit olivat staurosporiini ja DHPCC-9, joiden  $IC_{50}$  arvot laskettiin PIM-1:lle. Uusia inhibiittoreita testattaessa staurosporiini ja DHPCC-9 toimivat kontrolleina.

Opinnäytetyössä tutkittuja PIM-kinaaseja on löydetty suurissa määrin syöpäsoluista kuten leukemiasta. Niiden on todistettu vaikuttavan moneen syövän kasvamisen ja jakaantumisen kannalta tärkeään toimintoon, jonka takia niille selektiivisen lääkeaineen etsiminen on varteenotettava tutkimuskohde. Opinnäytetyössä käytettyä menetelmää optimoitiin tehoseulontaa (HTS) varten, jonka tarkoituksena on suurten lääkeainemäärien testaaminen kohdemolekyylille. Menetelmä onnistuttiin optimoimaan yhdelle PIM-entsyymeistä kohtalaiseen hyvin. Menetelmän kehitystä pitäisi kuitenkin jatkaa, jotta se saataisiin toimimaan kaikille kolmelle samanaikaisesti.

## ASIASANAT:

fosforylaatio, kinaasi, tehoseulontamääritykset, luminisenssimääritykset, lääke-ehdokkaiden etsintä

Samuli Tyvelä

## DEVELOPMENT OF HOMOGENEOUS PHOSPHORYLATION ASSAY FOR HIGH-THROUGHPUT SCREENING

This thesis is about studying phosphorylation, which is a post-translational modification. Quenching resonance energy transfer (QRET) was developed for measuring enzyme activity and to screen potent inhibitors for three PIM kinases. In the thesis kinases were used to phosphorylate substrate peptides by attaching phosphates to them, which prevented the substrates from binding to  $\text{Eu}^{+3}$ -labeled peptides. The Eu-labeled peptides emit fluorescence signals by energy transfer. In this setting quenching molecules in the samples blocked the labeled peptides' emitted signals because the phosphorylated substrates could not form peptide-peptide bonds. When the substrates are able to bind with the Eu-peptides they keep the quenchers far enough for observable signals to be emitted. Inhibitors were added to the samples to block the enzymes from phosphorylating, which allowed the peptides to bind and high signals were measured. In the assay optimization staurosporine and DHPCC-9 were used as inhibitors. They were used as controls when testing potential new inhibitors for PIM kinases and their  $\text{IC}_{50}$  values were calculated for PIM-1 during the optimization.

PIM kinases studied in this thesis have been found in large concentrations from for example leukemia tumor cells. They have been shown to play major roles in some of the cancer's essential functions such as its cell cycle regulation and proliferation, which makes it a relevant target for drug discovery. The assay optimized in this thesis was developed for high-throughput screening (HTS) as it is a common method in the industry for testing large quantities of potential molecules. The assay was optimized moderately well for one of the PIM enzymes, PIM-1. The development of the assay should be continued to make it suitable for all three PIM kinases simultaneously.

### KEYWORDS:

phosphorylation, kinase, high-throughput screening assays, luminescent measurements, drug discovery

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET JA TERMIT</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 TEORIA</b>	<b>8</b>
2.1 HTS	8
2.2 QRET	9
2.2.1 Periaate	10
2.2.2 Optimoinnin tavoitteet	11
2.3 PIM-entsyymit	11
2.3.1 Rakenne	12
2.3.2 Esiintyminen	13
2.3.3 Toiminta	13
<b>3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>14</b>
3.1 Käytetyt laitteet	14
3.2 Peptidien sitoutumistesti	15
3.3 Käytettävien entsyymien testaus	16
3.4 Sammuttajan ja Eu-peptidin optimointi	16
3.5 Entsyymien konsentraation määrittäminen	17
3.6 Staurosporiinin annos-vastesuhteen määrittäminen	17
3.7 Inhibiittorien testaus	18
3.8 ATP konsentraatioiden testaus	19
<b>4 TULOKSET</b>	<b>20</b>
4.1 Peptidien sitoutumistesti	20
4.2 Käytettävien entsyymien testaus	20
4.3 Sammuttajan konsentraatio	23
4.4 Entsyymien konsentraation määrittäminen	24
4.5 Staurosporiinin annos-vastesuhteen määrittäminen	25
4.6 Inhibiittorien testaus	25
4.7 ATP konsentraatioiden testaus	27
<b>5 PÄÄTELMÄT</b>	<b>28</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>29</b>

# KUVAT

Kuva 1 Lääkeaineen kehitys. (Tong-Ochoa, 2019)	9
Kuva 2 QRET menetelmä.	10
Kuva 3 PIM-1 vaikutus (Muokattu lähteestä Bachmann & Möröy, 2005.).	11
Kuva 4 PIM-1 rakenne (Qian, ym. 2004).	12
Kuva 5 Aikaerotteisen luminesenssin mittauksen periaate.	14
Kuva 6 Työn vaiheet.	15
Kuva 7 PIM-entsyymeille laskettu IC50-arvo Staurosporiinin ja DHPCC-9:n kanssa (Turun yliopisto 2017).	17
Kuva 8 Substraatin ja Eu-merkityn peptidin sitoutumistesti.	20
Kuva 9 PIM-1 erän aktiivisuuden testaus.	21
Kuva 10 PIM-2 erän testaus.	22
Kuva 11 PIM-3 erän testaus.	23
Kuva 12 Sammuttajan konsentraatiot.	23
Kuva 13 PIM-1 konsentraation määrittäminen.	24
Kuva 14 Staurosporiinin annos-vaste PIM-1.	25
Kuva 15 Häirintätesti, eniten häirintää aiheuttanut inhibiittori.	26
Kuva 16 ATP:n konsentraatiot.	27

## KÄYTETYT LYHENTEET JA TERMIT

ADP	Adenosiinidifosfaatti
Apoptoosi	Ohjattu solukuolema
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
DHPCC-9	PIM -selektiivinen inhibiittori
Eu	Europium
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> , fluoresenssiresonanssienergiansiirto
HEPES	Puskuriliuos
Hit	Tehoseulonnassa käytettävä termi lupaavan molekyylin löytymiselle
HTS	Tehoseulonta
IL	Interleukiini
Lantanoidi	Alkuaineryhmä johon europium kuuluu
Ligandi	Biomolekyyliin sitoutuva yhdiste
Luminofori	Valoa emittoiva yhdiste
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natrium-ortovanadaatti
P8g	Substraattipeptidi
Pep28	Eu-leimattu peptidi
PIM	<i>Proviral Integrations of Moroney virus</i>
PKA-puskuriliuos	Työssä käytetty puskuriliuos
pMO5	Fosforyloitu peptidi
Q14	Sammuttaja-molekyyli
QRET	<i>Quencher resonance energy transfer</i> , sammutusresonanssienergiansiirtotekniikka
S/B	<i>Signal to background ratio</i> , signaalin ja taustan suhde
Staurosporiini	Kinaasi-inhibiittori
TRL	<i>Time-resolved luminescence</i> , aikaerotteinen luminesenssi

# 1 JOHDANTO

PIM-entsyymit vaikuttavat solujen lisääntymiseen, selviytymiseen ja erilaistumiseen. Ihmisissä niitä löydetään normaaleista soluista ja syöpäsoluista. PIM-entsyymit ovat seriini- ja treoniini-kinaaseja jotka aktivoituvat autofosforyloitumalla. Niiden rakenteet ovat hyvin homologisia toisiinsa nähden ja niiden esiintyminen ja toiminta ovat myös hyvin samankaltaisia. Muihin kinaaseihin verrattuna niiden rakenne on kuitenkin hyvin erilainen ja niillä onkin vain alle 30 % sekvenssin samankaltaisuus muiden kinaasien kanssa. (Qian, ym. 2004; Santio, ym. 2010.)

Tässä työssä QRET-menetelmää (quenching resonance energy transfer) optimoitiin PIM-entsyymeille. Menetelmä kohdistettiin kolmelle PIM kinaasille, jotta niille voitaisiin löytää ja testata uusia tehokkaita inhibiittoreita, samalla mahdollistaen HTS:n eli tehoseulonnan. Menetelmää optimoitiin käyttäen 384-kuoppalevyjä. Kokeet suoritettiin pipetoimalla PIM-kinaasi mikrotiiterilevyille jossa oli sekoitus substraattipeptidiä, ATP:ta ja puskuria/inhibiittoria. Lopuksi lisättiin  $\text{Eu}^{+3}$  kelaatilla merkattua peptidiä. Mitatut signaalit kertoivat inhibiittorien tehokkuudesta entsyymien estämisessä. Tässä menetelmäformaattissa kinaasi kykeni fosforyloimaan substraatin huolimatta peptidi-peptidi liitoksista  $\text{Eu}^{+3}$  merkattun peptidin kanssa. Työssä käytettiin leusiinivetoketju peptidejä ja ne erotettiin PIM-entsyymien toimesta tehokkaasti.

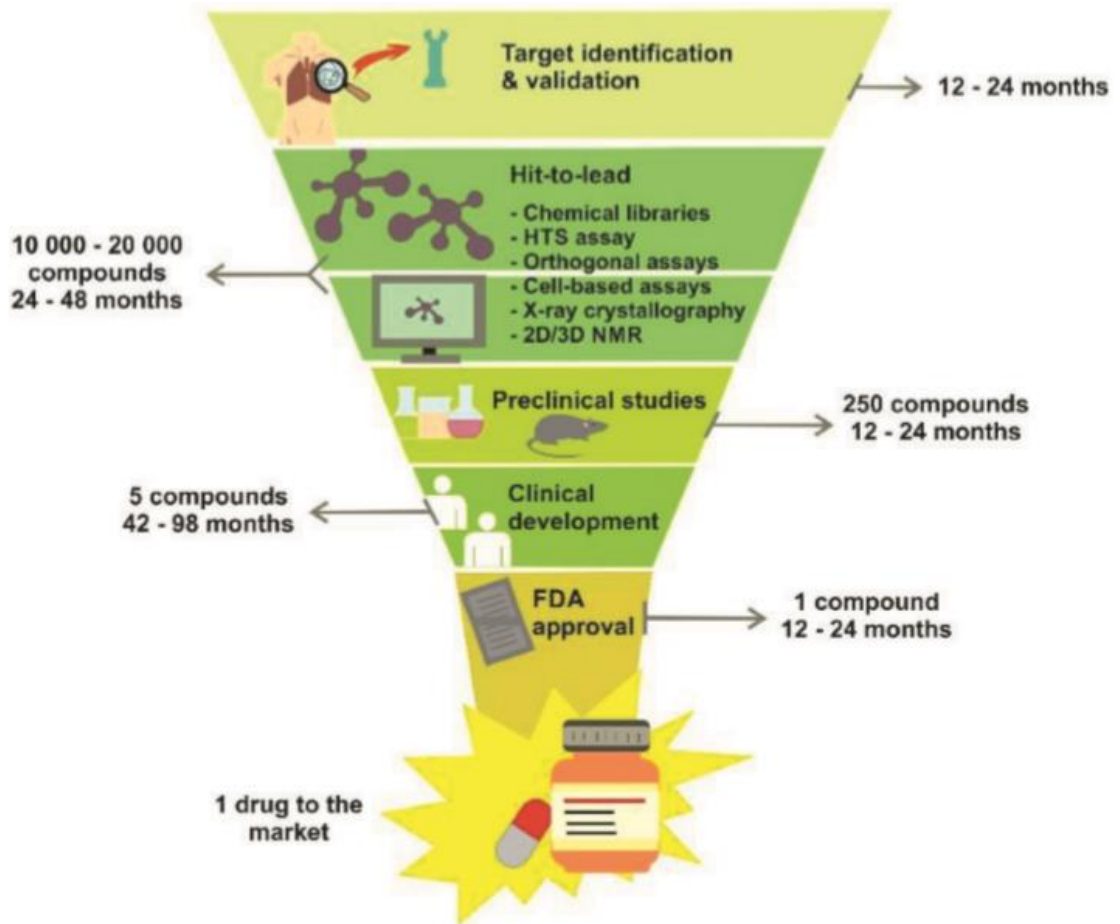
Projekti kehitettiin Turun yliopiston materiaalikemian, analyttisen kemian ja biologian laitosten sekä Helsingin yliopiston farmaseuttisen kemian ja teknologian laitoksen välillä. Työssä käytetyt entsyymit saatiin Turun yliopiston biologian laitokselta ja testatut yhdisteet Helsingin yliopistolta.

## 2 TEORIA

### 2.1 HTS

Tehoseulonta on lääkeaineiden löytämisessä käytettävä lähestymistapa, joka on kasvatanut suosiotaan vuosituhannen alusta lähtien. Tehoseulonta eli HTS on yksi välivaiheista prosessissa, jossa edetään kohteen valitsemisesta potentiaalisen lääkeaineen testaamiseen (Kuva 1). Tehoseulonnan vaatimukset ovat suuri määrä käytettävissä olevia yhdisteitä sekä niiden nopean testaamisen mahdollistava laitteisto. Laajemmat tietokannat sekä robotiikkaa hyödyntävä laitteisto mahdollistavat kattavamman ja tehokkaamman testaamisen. Näytteiden kokonaistilavuuksia käytettävissä menetelmissä on pyritty pienentämään, koska se pienentää tehoseulonnan hintaa. Tehoseulontaan on käytetty kauan 96-levyjä, joissa näytteen tilavuus on voinut olla 250 µl. Yritykset ovatkin siirtymässä pienempiin tilavuuksiin kasvattaen kuoppalevyjen näytteiden määrää, eli tavoitteena on käyttää 384- tai 1536-levyjä joissa näytetilavuudet ovat 1-10 µl. Testattavien näytteiden määrä voi nousta useaan sataan tuhanteen viikossa, joten pienikin yksittäisen näytteen hinnan lasku kumuloituu varteenotettavaksi säästökseksi yritykselle. Lääkkeen kehitys on yritykselle monen vuoden projekti, lääkeaineen löytämisestä valmiiseen lääkkeeseen (Kuva 1). HTS ei ole tässä prosessissa läheskään aikaa vievin vaihe, joten sen nopeuden tehostaminen ei ole lopullisen hinnan kannalta niin tärkeää. HTS-menetelmien kehityksessä yksittäisten testattavien näytteiden hintojen laskeminen onkin pääasiallinen tavoite ja testauksen nopeutta pidetään toissijaisena hyötynä. Tehoseulonta ajetaan yleensä ensin yhdellä konsentraatiolla käyttäen kaksoisnäytteitä tai yhtä näytettä per testattava yhdiste. Jos seulonnassa saadaan 'osuma' (Hit), niin siirrytään tarkempaan testaukseen. Opinnäytetyö tehtiin Turussa, jossa on paljon alan osaamista ja alalla toimivia yrityksiä. (Mishra, ym. 2008; Tong-Ochoa, 2019.)





Kuva 1 Lääkeaineen kehitys. (Tong-Ochoa, 2019)

## 2.2 QRET

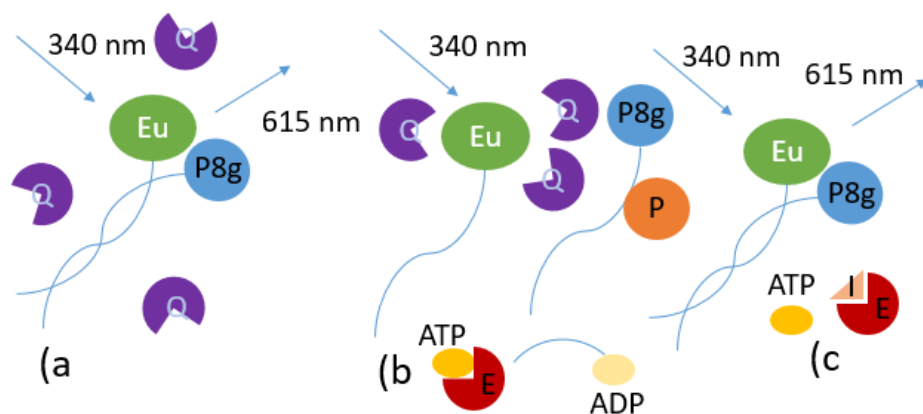
QRET eli sammutusresonanssienergiansiirtotekniikka on homogeeninen menetelmä aikaerotteisten luminesenssisignaalien mittaamiseksi (TRL eli *Time-resolved luminescence*). Se on nopeampi menetelmä kuin muut tehoseulontaan soveltuvat tekniikat ja myös kustannustehokkaampi (Kopra & Härmä, 2015). Se soveltuu puhdistettujen proteiinien lisäksi membraanien ja kokonaisten solujen testaamiseen. QRET soveltuu muiden menetelmien kuten esimerkiksi fluoresenssin resonanssienergian siirron (FRET) kanssa yhdessä käytettäväksi.

### 2.2.1 Periaate

QRET perustuu lantanoidikelaatilla leimatus ligandin sitoutumiseen kohdemolekyylin kanssa. Kun leimattu ligandi ei ole liittynyt kohdemolekyyliin, se vaimennetaan sammuttajalla ja luminesenssisignaali on matala. Kun lantanoidimolekyylillä merkattu ligandi sitoutuu kohdemolekyylin kanssa, sammuttaja ei pääse yhdistelmän lähelle. Kelaatin ja sammuttajan ollessa kauempana toisistaan niiden välinen energian siirto on pienempi jolloin kelaatin TRL-signaali on korkeampi. Ligandina voidaan käyttää mitä tahansa pientä molekyyliä joka pystyy sitoutumaan kohteeseen kuitenkin suojaamatta itsestään lantanoidia. Sammuttaja voi olla mikä tahansa luminofori jonka adsorbtiivisuus peittää käytetyn kelaatin spektrin ja joka pääsee tarpeeksi lähelle ligandia. (Kopra & Härmä, 2015.)

Tässä työssä menetelmää käytettiin PIM-entsyymien aktiivisuuden tutkimiseen inhibiittorien kanssa. Kuvan 2 kohdassa a) joukkoon ei ole vielä lisätty entsyymiä tai ATP:ta, vaan substraatti ja Eu-peptidi ovat sitoutuneet keskenään. Substraattipeptidi eli p8g pitää sammuttajan (Q) niin kaukana lantanoidista, että näytteestä voidaan mitata luminesenssisignaali. Kohdassa b) joukkoon on lisätty ATP:ta ja PIM-entsyymejä. Entsyymi (E) fosforyloi substraattipeptidin siirtämällä fosfaatin ATP:ltä, jolloin peptidi-peptidi sidos estyy. Sammuttajat pääsevät lähemmäs Eu:ta estämään sen fluoresenssia ja mitataan matala signaali. Kuvan viimeisessä kohdassa c) havainnollistetaan kuinka inhiboimalla eli estämällä entsyymin toiminta saadaan mitattua korkeita luminesenssisignaaleita mittauskunassa.

Menetelmää optimoitaessa käytetty substraattipeptidi oli p8g ja lantanoidi Europium. Sammuttaja oli Q14 ja inhibiittorit Staurosporine tai DHPCC-9.



Kuva 2 QRET menetelmä.

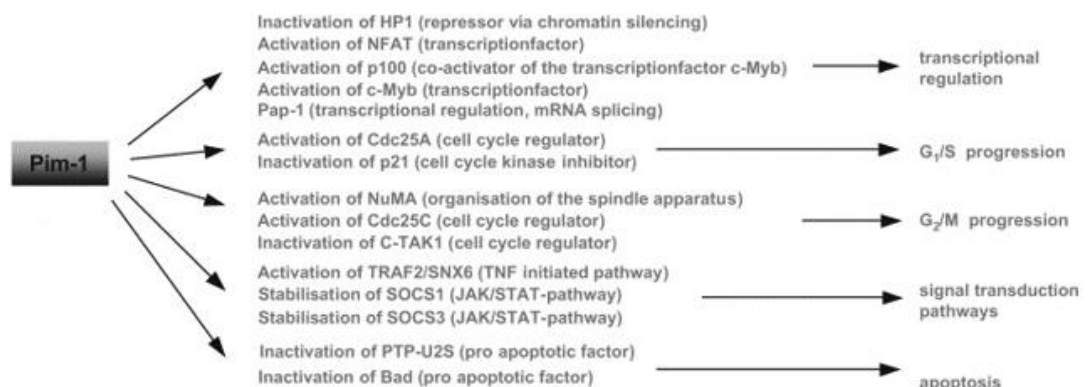
## 2.2.2 Optimoinnin tavoitteet

Tässä työssä menetelmää optimoitiin pyrkien saamaan mahdollisimman luotettavia tuloksia pienillä konsentraatioilla, koska tehoseulonnassa pienikin reagenssin määrän lasku yksittäisessä näytteessä voi kumuloitua suureksi säästökseksi. Optimointiin kuului riittävän aktiivisten entsyymierien löytäminen ja niiden konsentraatioiden testaaminen sopivan määrän selvittämiseksi, sammuttajan konsentraation muuttaminen taustasignaalin perusteella sopivaksi ja käytettyjen inhibiittorien annos-vastesuhteen testaaminen.

Menetelmää optimoitaessa käytettiin PIM-entsyymeille toimivaksi todettuja inhibiittoreita Staurosporiinia ja DHPCC-9 (Kopra, ym. 2019; Santio, ym. 2010). Menetelmää kehitettiin mustalle 384-kuoppalevyille. Määrittymisen kokonaistilavuus oli 10 - 50 µl ja rinnakkaisia määrittymiä kolme.

## 2.3 PIM-entsyymit

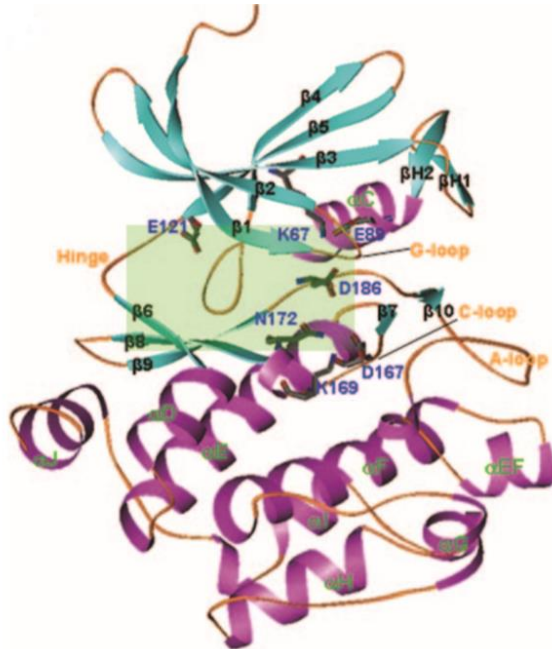
PIM-perheen entsyymit ovat seriini- ja treoniini-kinaaseja. Niille toimivien inhibiittorien löytäminen voi olla hyödyllistä syövän parantamisen kannalta, koska niitä esiintyy syöpäsoluissa kuten eturauhasen syövässä ja veritautien kasvaimissa (Brault, ym. 2010). PIM-kinaaseilla on monimuotoinen rooli syövän kehityksessä sillä ne osallistuvat solun kasvamiseen, jakaantumiseen ja apoptoosiin. Kuva 3 havainnollistaa PIM-1 kinaasin vaikutusta eri proteiinien aktivointiin tai inaktivointiin ja niitä seuraaviin tapahtumiin solussa. G<sub>1</sub>/S ja G<sub>2</sub>/M tarkoittavat solusyklin edistymistä. (Bachmann & Möröy, 2005).



Kuva 3 PIM-1 vaikutus (Muokattu lähteestä Bachmann & Möröy, 2005.).

### 2.3.1 Rakenne

Kaikilla kolmella PIM-entsyymiperheen entsyymillä on yli 80 % sekvenssin samankaltaisuus toisiinsa nähden, mutta vain alle 30% samankaltaisuus muihin kinaaseihin (Qian, ym. 2004). Niiden kohdesekvenssi on RXRHXS mutta tässä työssä käytettiin substraattia, jonka PIM-selektiivinen sekvenssi oli QLRRR-SAN, koska se oli optimoitu aikaisemmin tälle menetelmälle (Peng, ym. 2007). PIM-entsyymit ovat rakenteeltaan tyypillisen kinaasin kaltaisia. Niiden rakenne on jakaantunut kahteen liuskaan joiden välillä on taitoskohta. Toinen liuska on tyypipää ja toinen C-terminaali, joista tyypipääty koostuu beeta-levyistä ja hiilipääty alfa kierteistä. Taitoskohdassa (hinge region) on ATP:n sitova tasku (kuva 4 varjostettu alue). Tämä taitoskohta on ainutlaatuinen PIM-entsyymeille tarkoittaen niiden sitoutuvan ATP:n kanssa erilaisella tavalla kuin kinaasit yleensä. Tämä uniikki ominaisuus voi olla mahdollisuus selektiivisten inhibiittorien löytämiseksi. PIM-entsyymien välillä on rakenteellisia eroja katalysoivien alueiden välillä. PIM-2 entsyymien katalysoiva alue on PIM-1:n kanssa 61% samankaltainen ja PIM-3 kanssa 66 %. Tästä voidaankin päätellä, että saattaa olla mahdollista löytää myös eri PIM-entsyymeille spesifisiä inhibiittoreita. (Bullock, ym. 2005.)



Kuva 4 PIM-1 rakenne (Qian, ym. 2004).

### 2.3.2 Esiintyminen

PIM-entsyymeitä löydettiin ensimmäisen kerran hiiren leukemiaviruksesta. Ihmisessä niitä tavataan imusolmukkeista ja verta muodostavista järjestelmistä eli luuytimeistä sekä eturauhasen, kiveksen ja suun epiteelisoluista (Bachmann & Möröy, 2005). Niiden on todettu olevan mukana varhaisessa vaiheessa veritautien synnyssä, kuten leukemiassa sekä eturauhasen karsinoomassa (Shah, ym. 2008.; Wang, ym. 2001). PIM-entsyymejä on löydetty pääosin solun sytoplasmasta ja sen toimintaa säätelevät sytokiinit, kasvutekijät, hormonit sekä solun verettömyys tai hapettomuus. Sen toimintaan voivat vaikuttaa myös epstein-barr virus tai *helicobacter pylori* -infektiot (Shah, ym. 2008).

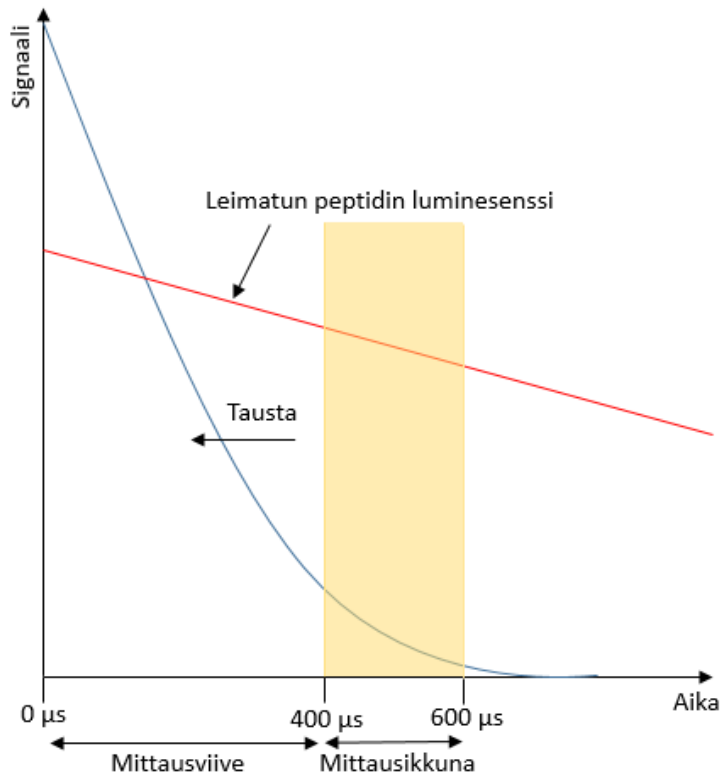
### 2.3.3 Toiminta

PIM-kinaasit toimivat monissa solun biologisista tapahtumista, kuten solun selviytymisessä, muuntautumisessa, lisääntymisessä ja apoptoosissa. Itsestään siirtogeenisenä PIM-kinaasit ovat heikosti syöpää aiheuttavia, mutta vaikuttaessaan *c-Myc* transkriptiotekijän kanssa niistä tulee vahvasti vaikuttavia onkogeneenejä. *c-Myc* on transkriptiotekijä, joka vaikuttaa solun kasvuun ja jakautumiseen. PIM-1 esiintyy muita PIM-entsyymeitä useammin verta muodostavissa soluissa ja sen transkription aloittaa usea interleukiini, kuten IL-2, IL-3 ja IL-6. PIM-1 kinaasi toimii solun sisäisessä sytokiinien aikaansaamassa signaalien välityksessä kontrolloimalla eri transkriptiotekijöitä. (Asati, ym. 2019.; Aho, ym. 2004.) Mitogeenien tai sytokiinien suuri määrä solussa lisää PIM-1:n solun jakaantumista aiheuttavaa vaikutusta, kun taas sytokiinien laskenut määrä aiheuttaa kasvun hidastumista. PIM-1 voidaan erottaa muista PIM-entsyymeistä esimerkiksi sen aktiivisuudesta pahanlaatuisia ja normaaleja verta muodostavia soluja kohtaan. (Asati, ym. 2019.) Kaikki PIM-entsyymit vaikuttavat kasvainsolujen apoptoosin estymiseen fosforyloimalla apoptoosia edistäviä proteiineja (kuva 3) (Macdonald, ym. 2006).

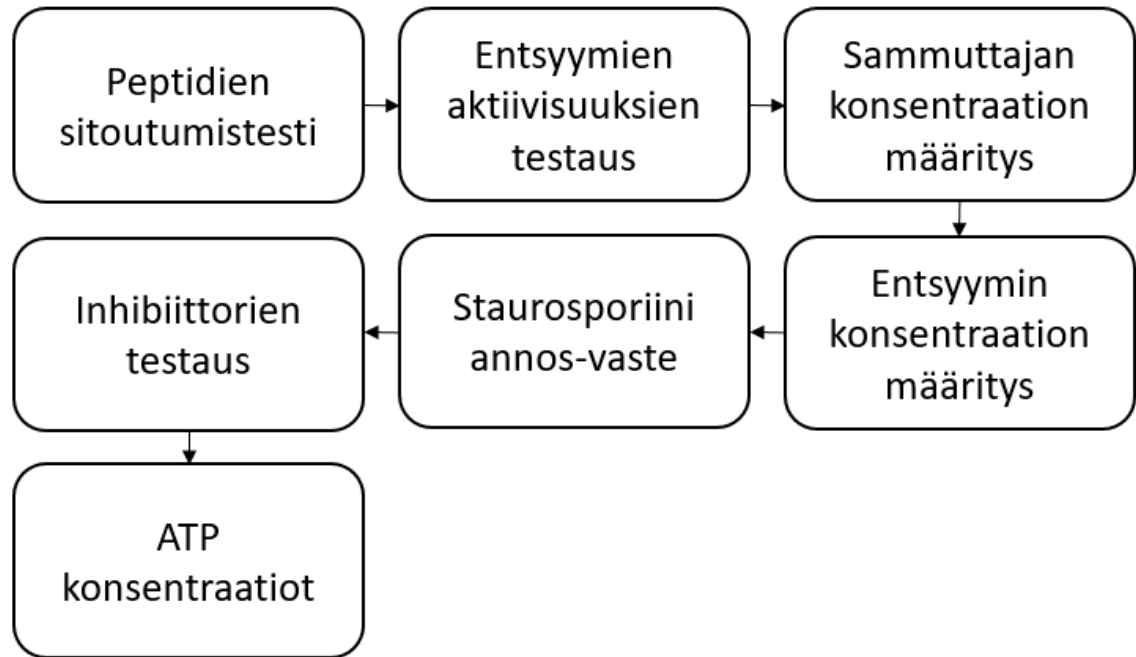
## 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 3.1 Käytetyt laitteet

Työn kaikki signaalien mittaukset tehtiin käyttämällä joko Victor 1420 kuoppalevyn lukijaa (PerkinElmer) tai Labrox Oy:n vastaavaa mittalaitetta. Mittauksissa käytettiin 615 nm emissioaallonpituutta ja 340 nm eksitaatioaallonpituutta, 400  $\mu$ s mittausviivettä ja mittaus tapahtui 400 – 600  $\mu$ s viiveen jälkeen. Mittauksessa käytettiin viivettä, koska näytteen taustasignaali ei enää vaikuta mittaustuloksiin sen jälkeen (Kuva 5). Kaikissa testeissä käytettiin PerkinElmerin mustia 384-kuoppalevyjä (OptiPlate-384F). Testeissä käytettiin PKA-puskuriliuosta: 10 mM HEPES (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 0.01% Triton, 5 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Rinnakkaisia näytteitä tehtiin aina kolme, jotta mahdolliset satunnaiset virheet voitiin erottaa. Rinnakkaisnäytteiden perusteella laskettiin niiden keskiarvo, CV% eli virhejakauma ja S/B eli signaalin suhde taustasignaaliin. Kaikissa testeissä käytettiin substraattina peptidiä P8g, koska sillä on PIM-entsyymien kohdesekvenssin kaltainen alue QLRRR-SAN.



Kuva 5 Aikaerotteisen luminesenssin mittauksen periaate.



Kuva 6 Työn vaiheet.

Yllä olevassa kaaviossa (kuva 6) on esitetty työn eri vaiheet. Menetelmä optimoitiin vaihe kerrallaan ja inhibiittorien testauksessa käytettiin menetelmälle parhaimmaksi todettuja pitoisuuksia. Inhibiittorien testauksen perusteella todettiin siis menetelmän toimivuus. Eri ATP:n konsentraatioita testattiin, mutta sen muuttaminen ei parantanut tuloksia.

### 3.2 Peptidien sitoutumistesti

Käytettävien substraattipeptidi- ja Eu-peptidierien sitoutumiskyky toisiinsa testattiin 10 nM substraatin ja Eu-peptidin konsentraatioilla. Testattava substraatti oli p8g ja Eu-leimattu peptidi pep28. Tämän substraatin tiedettiin pystyneen sitoutumaan käytettävään Eu-leimattuun peptidiin joten muita substraatteja ei testattu. Tavoiteltu S/B oli yli kolme, koska tällöin peptidien voidaan todeta sitoutuvan toisiinsa. Tausta saatiin käyttämällä substraattina fosforyloitua peptidiä pMO5 joka ei suojaa Eu-merkattua peptidiä sammuttajalta. Sammuttajaa testattiin 1,5  $\mu\text{M}$  ja 2,5,  $\mu\text{M}$  konsentraatioilla. Näytteet tehtiin 10  $\mu\text{l}$  kokonaistilavuuteen pipetoimalla 7  $\mu\text{l}$  puskuria ja 1  $\mu\text{l}$  substraattia sekä Eu-peptidiä kuoppalevyille. Näytteitä inkuboitiin 5 min kuoppalevyn ravistelijassa, jonka jälkeen mitattiin signaalit. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin 1  $\mu\text{l}$  sammuttajaa ja niitä inkuboitiin 8 min ja 20 min, mitaten kummankin ajan jälkeen signaalit.

### 3.3 Käytettävien entsyymien testaus

Entsyymien aktiivisuuksia testattiin käyttämällä sammuttajan konsentraationa 1,8 - 3,6  $\mu\text{M}$  ja entsyymien konsentraationa 0,5 – 5 nM. Entsyymeistä kahta uutta PIM-2 erää testattiin. Käytettyjen PIM-1 ja PIM-3 erien aktiivisuudesta oli aikaisempaakin näyttöä. Tarkoituksena oli testata entsyymierien toimivuus ennen kuin menetelmää alettiin optimoimaan. Näytteiden tilavuus fosforylaation tapahtuessa oli 10  $\mu\text{l}$  ja signaalien mittauksessa 50  $\mu\text{l}$ . Rinnakkaisnäytteitä varten substraatti, ATP, inhibiittori/puskuri ja entsyymin pipetoitiin samaan eppendorf-putkeen josta pipetoitiin 10  $\mu\text{l}$  kuoppalevyille kolmeen eri kuoppaan. Konsentraatiot eppendorf-putkiin laskettiin niin, että yksittäiseen kuoppaan tuli 10 nM substraattia, 50  $\mu\text{M}$  ATP:ta, 2  $\mu\text{M}$  inhibiittoria ja 0,5 - 5 nM entsyymiä. Entsyymit otettiin pois kylmästä vasta juuri ennen pipetointia. Näytteitä inkuboitiin kuoppalevyn ravistelijassa 30 min jonka aikana entsyymien oletettiin ehtivän fosforyloida substraattit taustanäytteissä. Inkuboinnin jälkeen näytteisiin lisättiin 10 nM Eu-peptidiä 20  $\mu\text{l}$  tilavuudessa per kuoppa, sekoitettiin 5 min ravistelijassa ja mitattiin signaalit. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin 20  $\mu\text{l}$  sammuttajaa. TRL-signaaleja seurattiin 12 – 50 min sammuttajan lisäämisen jälkeen.

### 3.4 Sammuttajan ja Eu-peptidin optimointi

Sammuttajan konsentraatiota testattiin menetelmällä käyttäen vanhaa PIM-1 erää, koska siitä oli eniten tietoa aikaisemmista testeistä. Sammuttajan konsentraatiota määrittäessä tärkeänä pidettiin taustasignaalien saamista sopivan matalaksi, eli noin sataan yksikköön Labroxin mittalaitteella mitattuna. Eri sammuttajia ei testattu, vaan aikaisemmin toimivaksi todettua Q14:ta käytettiin kaikissa määrityksissä. Testatut konsentraatiot sammuttajalle olivat 0,65 - 2,8  $\mu\text{M}$ . Eu-peptidin konsentraatiot olivat 2 - 10 nM ja entsyymien konsentraatiot 1 - 2 nM. Substraatin, ATP:n ja inhibiittorin konsentraatiot olivat samat kuin aikaisemmissä määrityksissä. Fosforylaatio tapahtui tilavuudessa 8  $\mu\text{l}$  ja mittaukset tehtiin 10  $\mu\text{l}$  lopputilavuudessa, josta 1  $\mu\text{l}$  oli Eu-peptidiä ja 2  $\mu\text{l}$  sammuttajaa. Optimointi aloitettiin tässä tilavuudessa, koska suuret määrät sammuttajaa ja Eu-peptidiä voivat häiritä tuloksia. Tästä syystä myös entsyymien konsentraatiota laskettiin joissain näytteissä.

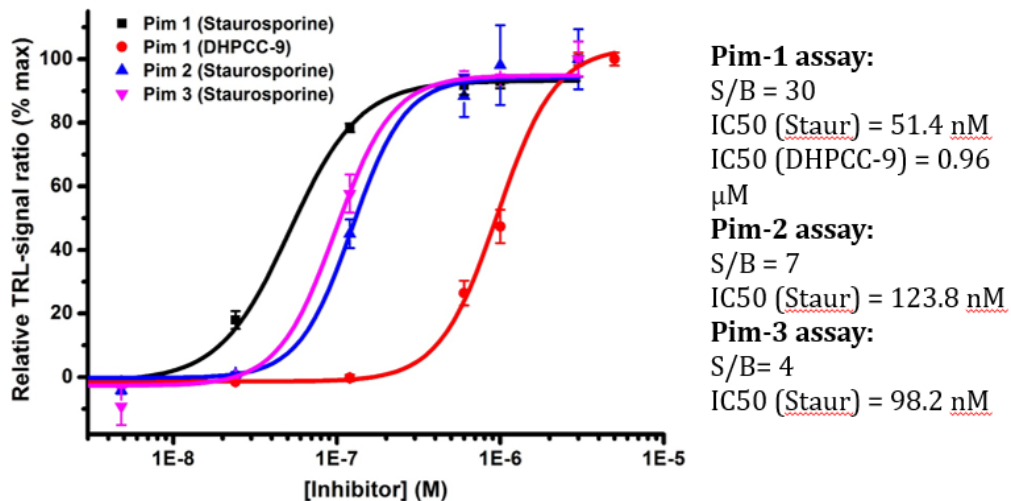


### 3.5 Entsyymien konsentraation määrittäminen

PIM-1 entsyymien konsentraatiota optimoitiin käyttäen 2  $\mu\text{M}$  konsentraatiota inhibiittorille eli Staurosporiinille ja aikaisemmin testattua 1,8  $\mu\text{M}$  sammuttajan konsentraatiota, joka nostettiin testin aikana 2,62  $\mu\text{M}$ . Käytetyt entsyymien konsentraatiot olivat 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 3 nM ja 5 nM. Eu-peptidin ja substraatin konsentraatiot olivat 10 nM. Menetelmää optimoitiin käyttäen PIM-1 erää jonka toimivuus testattiin aikaisemmin, koska se on ollut lupaavin kohde aikaisemmissa testeissä ja sen hyvä aktiivisuus on todettu. Reaktioita seurattiin 30 min, jonka jälkeen näytteisiin lisättiin hieman lisää sammuttajaa. Tämän jälkeen näytteitä seurattiin vielä 25 min.

### 3.6 Staurosporiinin annos-vastesuhteen määrittäminen

Staurosporiini on *Streptomyces staurosporeus* bakteerista eristetty alkaloidi, jolla on matala  $\text{IC}_{50}$  -arvo monen yleisen entsyymien kanssa, kuten PKA, PKG ja CAMKII. Staurosporiinin ja DHPCC-9:n  $\text{IC}_{50}$  oli määritetty aikaisemmin kaikille kolmelle PIM-entsyymille (Kuva 7).  $\text{IC}_{50}$  -arvo tarkoittaa inhibiittorin konsentraatiota, jossa inhibiittori estää 50 % reaktiosta.



#### Assay conditions:

Peptide substrate (10nM), Pim-1 (1nM)/Pim-2 (10 nM)/Pim-3 (1 nM), ATP (50  $\mu\text{M}$ ) and varying concentration of inhibitors. Detection component:  $\text{Eu}^{3+}$ -peptide (10nM) and Quench III (3.3  $\mu\text{M}$ ).

Kuva 7 PIM-entsyymeille laskettu  $\text{IC}_{50}$ -arvo Staurosporiinin ja DHPCC-9:n kanssa (Turun yliopisto 2017).

Staurosporiinin IC50 määritettiin PIM-1:lle tässä työssä käyttäen menetelmälle aikaisemmin määritettyjä sammuttajan ja entsyymien konsentraatioita. Entsyymien konsentraatio näytteissä oli 2 nM ja sammuttajan konsentraatio 1,8 µM, substraatin ja Eu-peptidin konsentraatiot 10 nM. Näytteiden lopputilavuus kuopissa oli 10 µl. Inhibiittoria pipetoitiin ensin kuoppiin 2 µl. Peptidit ja ATP sekoitettiin keskenään ja sekoitusta lisättiin kuoppiin 3 µl, jonka jälkeen kuoppalevyä pidettiin levysekoittajassa 5 min. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin 3 µl entsyymiä ja inkuboitua jatkettiin levyravistelijassa 30 min. Sammuttaja lisättiin tämän jälkeen 2 µl tilavuudessa. Näytteitä seurattiin 35 min sammuttajan lisäyksen jälkeen.

### 3.7 Inhibiittorien testaus

Menetelmää käytettiin testaamaan 30 eri inhibiittoria PIM-1 ja PIM-3 entsyymeille. Testattavat inhibiittorit saatiin Helsingin yliopistolta. Testejä tehtiin kaksi kertaa, ensimmäisessä molemmille entsyymeille ja toisessa vain PIM-3:lle. Näytteitä inkuboitui ensimmäisessä testissä entsyymien lisäyksen jälkeen 30 min huoneenlämmössä ja toisessa testissä huoneenlämmössä sekä 37 °C. PIM-1:n konsentraatio oli 2 nM ja PIM-3:n 5 nM. Inhibiittoreita testattiin 0,5 - 5 µM konsentraatioilla ensimmäisessä ja 0,5 - 50 µM konsentraatioilla toisessa testissä. Tausta saatiin 2 µM staurosporiinilla inhiboidusta näytteestä. Molempien testien ohessa selvitettiin myös peptidi-peptidi sidoksen häirintää, jota inhibiittorit saattoivat aiheuttaa. Ensimmäisessä häirintätestissä kaikki inhibiittorit testattiin 5 µM konsentraatiolla ja toisessa vain häirintää aiheuttaneet 5 – 50 µM konsentraatiolla. Näissä testeissä ei tapahtunut fosforylaatiota joten niissä ei ollut entsyymiä ja tausta mitattiin käyttämällä substraattina valmiiksi fosforyloitua peptidiä pMO5:ä. Reaktioita seurattiin entsyymiä käytettäessä 30 - 40 min ja häirintätestissä 20 - 30 min. Käytetyt substraatin, fosforyloidun peptidin ja Eu-peptidin konsentraatiot olivat 10 nM, ATP:n konsentraatio 50 µM ja sammuttajan konsentraatiot 1,8 µM ja 2 µM.

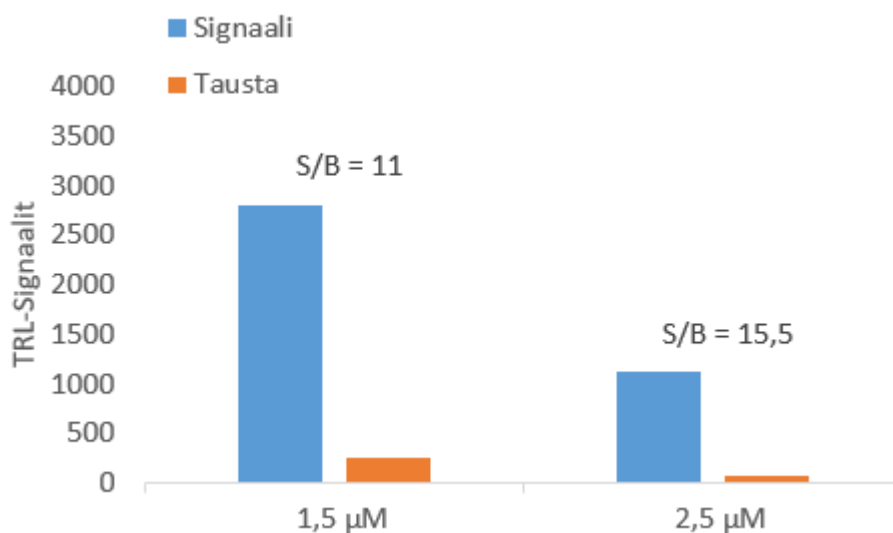
### 3.8 ATP konsentraatioiden testaus

Testissä käytetyt ATP:n konsentraatiot olivat 0,08  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  ja 50  $\mu\text{M}$ . Aikaisemmin kaikissa määrityksissä oli käytetty vain 50  $\mu\text{M}$  konsentraatiota, eli tässä testissä ainoastaan matalampaa ATP:n konsentraatiota testattiin aikaisempaan verrattuna. Laskettuja pitoisuuksia testattiin 2 nM PIM-1:n ja 5 nM PIM-3:n kanssa, substraattipeptidin ja Eu-peptidin konsentraatioilla 10 nM ja sammuttajan 1,8  $\mu\text{M}$ . Inhibiittorina käytettiin Staurosporiinia konsentraatiolla 2  $\mu\text{M}$ . Reaktiota seurattiin 40 min. ATP:n tarkoitus menetelmässä on olla fosfaatin lähteenä kinaasien fosforyloidessa substraattipeptidiä. ATP:n sijasta menetelmässä voidaan käyttää myös muita molekyyliä fosfaatin lähteenä, kuten esimerkiksi GTP:tä. Tämän työn kaikissa määrityksissä on kuitenkin käytetty pelkkää ATP:ta.

## 4 TULOKSET

### 4.1 Peptidien sitoutumistesti

Käytetyt sammuttajan konsentraatiot olivat 1,5  $\mu\text{M}$  ja 2,5  $\mu\text{M}$ , joilla saatiin kummallakin yli 10 S/B 20 min sammuttajan lisäämisen jälkeen. Näiden tulosten perusteella peptidien todettiin pystyvän sitoutumaan toisiinsa. Sopivalla sammuttajan konsentraatiolla sitoutumaton Eu-merkitty peptidi antoi matalan signaalin, mutta sitoutunutta peptidiparia ei himmennetty liikaa. Hyvänä taustasignaalitasona pidettiin noin sataa yksikköä. Tulosten perusteella optimaalinen sammuttajan konsentraatio on tässä testissä käytettyjen konsentraatioiden välissä.



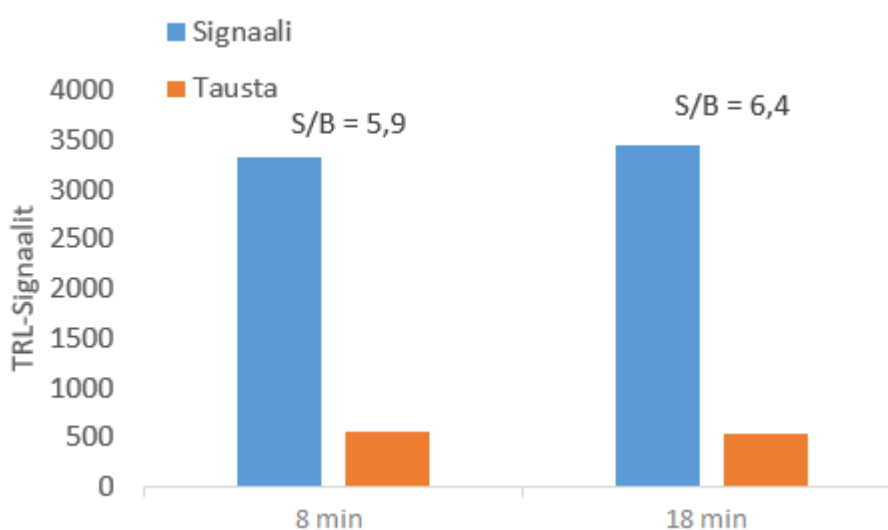
Kuva 8 Substraatin ja Eu-merkityn peptidin sitoutumistesti.

### 4.2 Käytettävien entsyymien testaus

Aikaisemmin testaamaton PIM-2 erä antoi korkeat signaalit, mutta S/B arvot olivat lähellä yhtä eli entsyymi ei fosforyloinut substraattipeptidejä. 12 min signaalien seuraamisen jälkeen näytteisiin lisättiin 5  $\mu\text{l}$  sammuttajaa näin nostaan sammuttajan konsentraatio noin neljään, mutta tämä ei parantanut tuloksia joten uuden entsyymierän pääteltiin olevan inaktivoitunut tai menetelmän viallinen. Tätä PIM-2 erää testattiin vielä 5 nM konsentraatiolla lisäten joukkoon inhibiittoria  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  eli natrium-ortovanadaattia 10  $\mu\text{M}$ , koska sen oletettiin mahdollisesti auttavan entsyymien toimintaa. Tulokset olivat kuitenkin tässäkin

testissä huonot, eli S/B oli lähellä yhtä. Seuraavaksi testattiin aikaisemmin toimivaksi todettua PIM-1 erää 2 nM konsentraatiolla menetelmän toimivuuden toteamiseksi. Tässä testissä S/B arvot olivat noin 6 (kuva 9). Koska menetelmässä ei ollut muutettu muuta kuin entsyymiä, ongelmien voitiin todeta johtuvan PIM-2 -entsyymistä eikä menetelmästä.

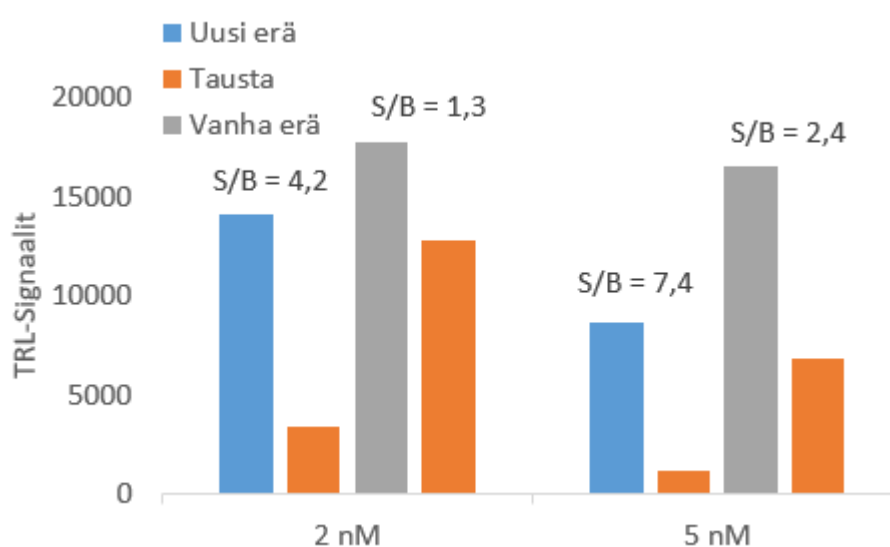
PIM-1 entsyymien toimivuutta ei katsottu tarpeelliseksi testata tätä enempää. Menetelmää optimoitaessa käytettiin jatkossa tätä PIM-1 erää.



Kuva 9 PIM-1 erän aktiivisuuden testaus.

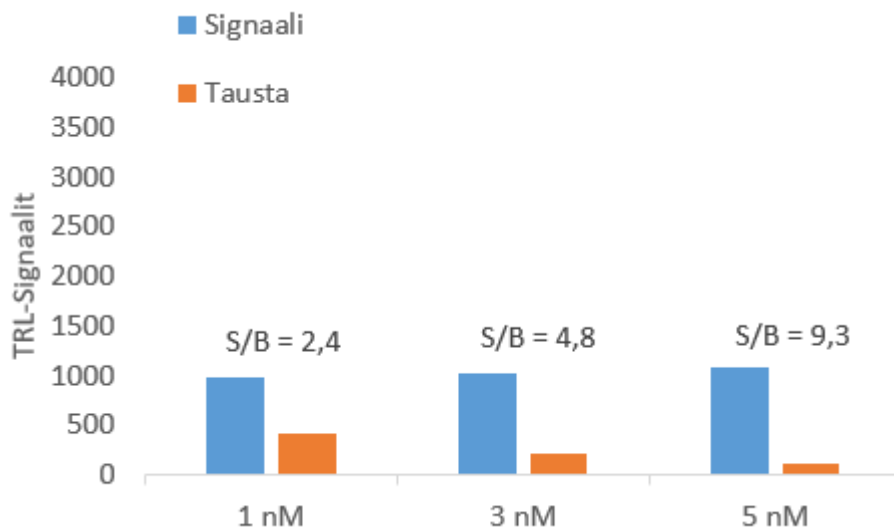
Toista PIM-2 erää testattiin pitoisuuksilla 2 nM ja 5 nM rinnakkain aikaisemmin testatun, huonosti toimineen PIM-2 erän kanssa. Tämä ensimmäistä kertaa testattu erä antoi yli 7 S/B:n 5 nM entsyymikonsentraatiolla ja 4:n 2 nM kanssa, jonka perusteella entsyymien todettiin pystyvän fosforyloimaan substraattia (kuva 10). Tässä testissä ei tavoiteltu mahdollisimman korkeaa signaali-tausta -suhdetta, koska tavoitteena oli ainoastaan entsyymien aktiivisuuden toteaminen. Tätä tarkoitusta varten riittävä S/B on aikaisemmin mainittu 3, joten saadut tulokset riittivät hyvin. Testaus suoritettiin Victor -mittauslaitteella, jonka takia signaalit ovat korkeat niin taustassa kuin näytteessäkin. Harmaalla kuvattu PIM-2 erä pystyi signaalitasojen perusteella fosforyloimaan, joten se ei ollut täysin inaktivoitunut. Kuvassa tausta saatiin jättämällä inhibiittori (Staurosporiini) pois näytteestä, jolloin entsyymien toiminta ei estynyt. Sinisellä ja harmaalla on kuvattu näytteiden signaaleita, joissa fosforylaatiota ei pitäisi olla tapahtunut. Uusi erä fosforyloi substraattia kui-

tenkin jo 2 nM:n konsentraatiolla, kuten kuvasta voidaan huomata. 5 nM:n konsentraatiolla sen signaalit olivat vielä matalammat, koska 2  $\mu$ M inhibiittoria oli liian pieni määrä suhteessa entsyymiin eikä se pystynyt inhiboimaan eli estämään kaikkia entsyymeitä. Substraatin fosforylaatiota tapahtui siis inhibiittorista huolimatta ja sammuttajamolekyylit pääsivät estämään Eu-peptidien lähettämiä fluoresenssisignaaleita. Harmaalla kuvatus erän taustasignaalit olivat 5 nM konsentraatiollakin melkein yhtä korkeat kuin uudemman erän inhiboidut signaalit, eli vaikka entsyymin toimintaa ei estetty, se toimi vain hieman paremmin kuin estetty uusi erä. Tulosten perusteella sinisellä kuvatus PIM-2 erän todettiin olevan toimiva.



Kuva 10 PIM-2 erän testaus.

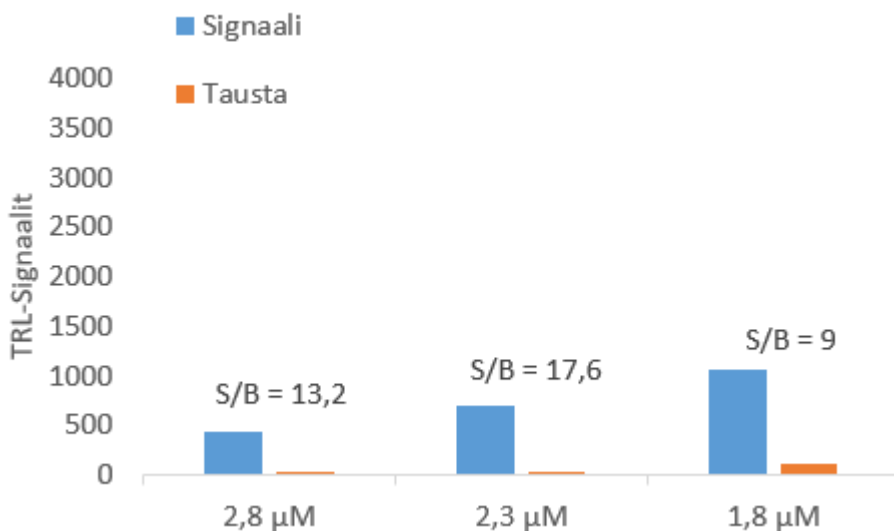
PIM-3 erän tiedettiin toimivan aikaisempien töiden perusteella, joten sen konsentraatiota laskettiin jo ensimmäisessä testauksessa. Entsyymien konsentraatiot olivat 5 nM, 3 nM ja 1 nM. (Kuva 11) Samalla menetelmää testattiin lisäämällä Eu-peptidi substraatin kanssa samaan seokseen ennen entsyymiä. Näin selvitettiin pystyykö PIM-3 fosforyloimaan substraatin peptidi-peptidi -liitoksesta huolimatta. Kummassakin formaatissa S/B oli lähes sama, eli fosforylaatio tapahtui peptidien lisäyksen järjestyksestä huolimatta. Kolmesta testatusta konsentraatiosta 5 nM toimi parhaiten ja tätä konsentraatiota päätettiin käyttää jatkossa PIM-3 entsyymin kanssa.



Kuva 11 PIM-3 erän testaus.

#### 4.3 Sammuttajan konsentraatio

Kuten kuva havainnollistaa (kuva 12), liika sammuttaminen ei vaikuta taustasignaaleihin kun ne ovat jo lähellä nollaa, mutta saattaa laskea sitoutuneiden peptidiparien lähettämiä fluoresenssisignaaleita. Näistä konsentraatioista 1,8  $\mu\text{M}$  toimi parhaiten tässä formaatissa käyttäen sammuttajan tilavuutena 2  $\mu\text{l}$  seoksesta jonka kokonaistilavuus oli 10  $\mu\text{l}$ .

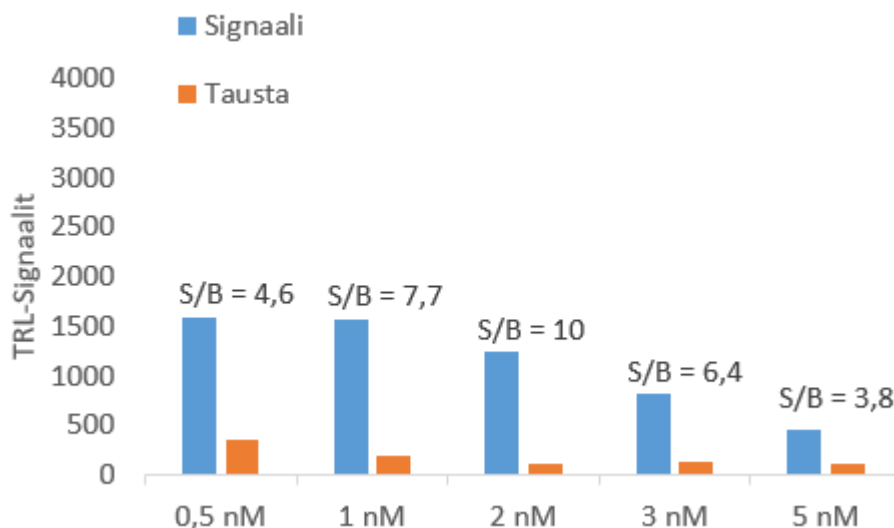


Kuva 12 Sammuttajan konsentraatiot.

Sammuttajan ja Eu-peptidin optimointia testattiin laskemalla kummankin konsentraatiota. Niitä säätämällä ei kuitenkaan saatu parempia tuloksia verrattuna aikaisempiin määriin, joten 10 nM Eu-peptidin konsentraatioon ja 1,8  $\mu$ M sammuttajan konsentraatioon palattiin. Pienemmillä Eu-peptidin ja sammuttajan konsentraatioilla menetelmä on herkempi muutoksille, koska esimerkiksi entsyymi voi tällöin aiheuttaa häiriöitä signaaliin. Tämän huomioon ottaen tulokset olivat liian merkityksettömät.

#### 4.4 Entsyymien konsentraation määrittäminen

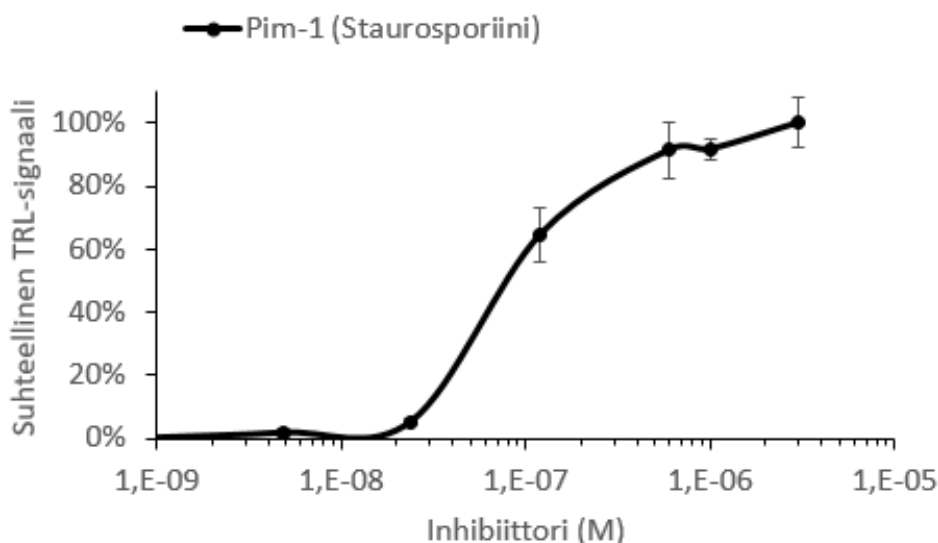
Kuvassa (kuva 13) on havainnollistettu testiä. Korkeilla PIM-1:n konsentraatioilla fosforylaatiota tapahtui inhibiittorista huolimatta. 2 nM konsentraatiolla entsyymi fosforyloi substraattia inhibiittorista huolimatta, mutta se oli silti testatuista konsentraatioista tehokain antaen parhaimman signaali-tausta -suhteen. Näytteissä, joissa oli pienempiä määriä entsyymiä, ei tapahtunut peptidiparin häirintää mutta entsyymin määrä ei riittänyt fosforyloimaan substraattia riittävästi. Tämän testin tarkoitus oli löytää mahdollisimman matala konsentraatio PIM-1 entsyymille jossa entsyymi inhiboidaan, mutta jossa taustasignaali on myös matala. Näin ollen 2 nM todettiin olevan paras konsentraatio PIM-1:lle tässä menetelmässä.



Kuva 13 PIM-1 konsentraation määrittäminen.



#### 4.5 Staurosporiinin annos-vastesuhteen määrittäminen



Kuva 14 Staurosporiinin annos-vaste PIM-1.

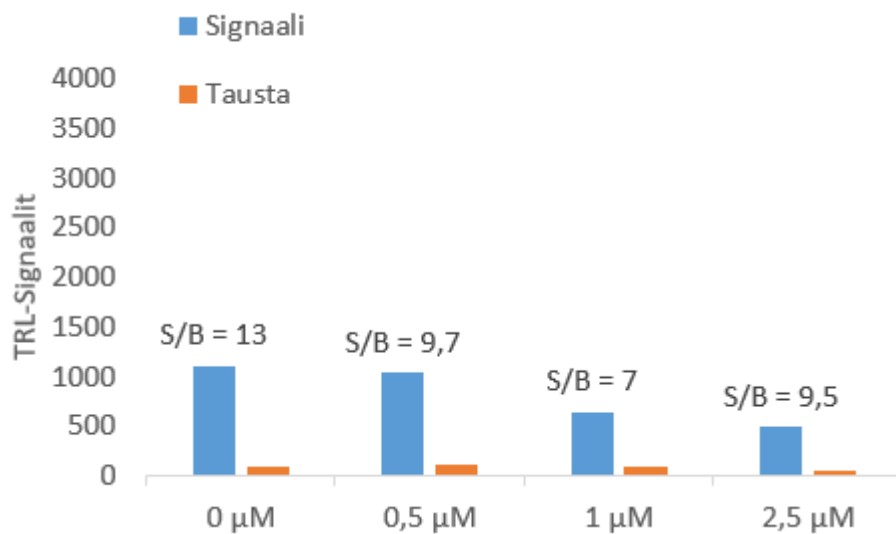
Inhibiittorin konsentraatiot olivat 0,960 nM, 4,8 nM, 24 nM, 120 nM, 600 nM, 1  $\mu$ M ja 3  $\mu$ M. IC<sub>50</sub> arvoksi saatiin 53 nM, aikaisemmin saadun arvon ollessa 51,4 nM. Rinnakkaisia näytteitä jokaiselle konsentraatiolle oli kahdeksan. Kuvassa (kuva 14) virhe on suhteellinen keskihajonta rinnakkaisnäytteiden välillä. Staurosporiinin annos-vaste määritettiin tässä työssä ainoastaan PIM-1:lle, jotta saatiin selville voiko aikaisemmin muille PIM-entsyymeille määritettyjä IC<sub>50</sub> -arvoja käyttää.

#### 4.6 Inhibiittorien testaus

Inhibiittorit olivat PIM-3:lle suunniteltuja, mutta myös PIM-1 testattiin koska PIM-entsyymien kohdesekvenssi on samankaltainen ja menetelmää oli optimoitu PIM-1:lle. Testatuista inhibiittoreista vain yksi vaikutti pystyvän inhiboimaan PIM-1:n, jonka takia ainoastaan PIM-3 jatkotestattiin. Tähän jatkotestiin valittiin 14 potentiaalista inhibiittoria. Konsentraatiot olivat suurimmalle osalle inhibiittoreista 5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ja 50  $\mu$ M, mutta neljälle 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ja 2,5  $\mu$ M. Näiden neljän inhibiittorin konsentraatioita laskettiin, koska ne vaikuttivat häiritsevän peptidi-peptidi -sidosta ensimmäisessä häirintätestissä. Jatkotestissä huoneenlämmössä sekä 37 °C inkuboiduissa näytteissä kaksi inhibiittoria antoivat parhaimmat tulokset 5 - 50  $\mu$ M konsentraatioilla, eli korkeimmat signaalit sekä S/B -arvot.

Tuloksia verrattiin DHPCC-9:n signaaleihin samoilla konsentraatioilla eivätkä ne olleet hyviä. S/B oli matala eli parhaimmillaan noin 4 ja signaalitasot olivat myös matalat. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin saada tietoa siitä, millaisella molekyylillä voi olla potentiaalia PIM-3:n inhiboimiseksi. Menetelmää tulisi myös optimoida lisää PIM-3:lle tulosten parantamiseksi.

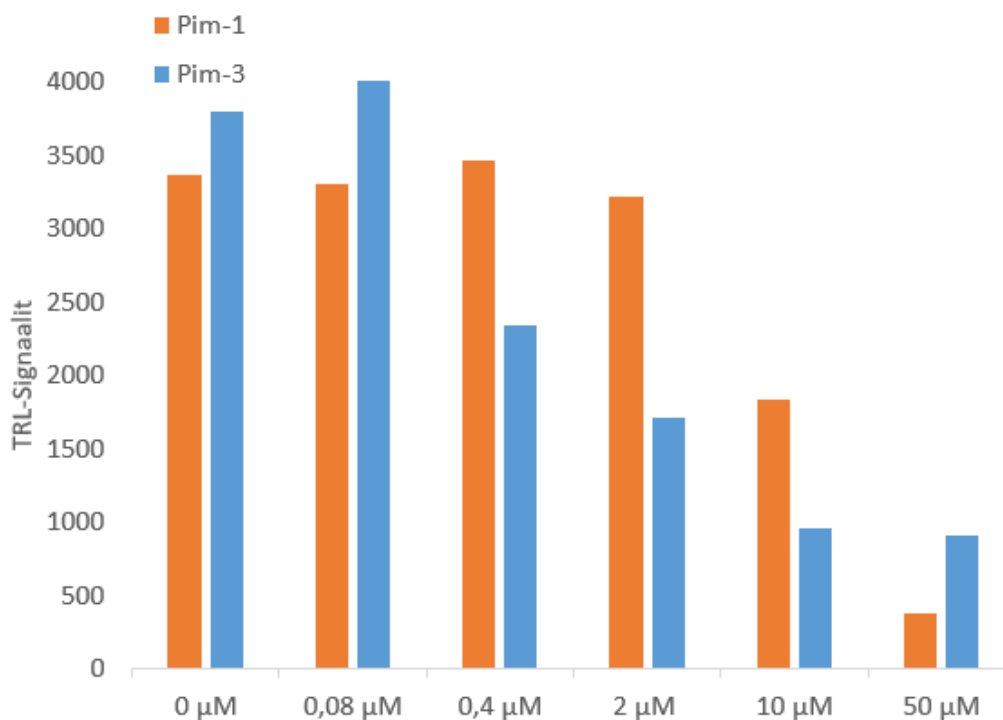
Häirintätestit tehtiin, jotta saataisiin selville inhibiittorien mahdollinen vuorovaikutus jompaankumpaan peptidiin. Näytteitä, joissa oli testattavia inhibiittoreita, verrattiin näytteisiin joissa ei ollut mitään peptidien välistä sidosta häiritsevää molekyylä. Inhibiittorien häirintä näkyi osassa näytteistä ennen sammuttajan lisäystä alentuneina signaalitasoina, koska ne sammuttajan tavoin häiritsivät Eu-peptidin emittoimia signaaleita. Neljästä alennetulla konsentraatiolla testatusta inhibiittorista yksi häiritsi signaaleita alimmallakin 0,5 µM:n konsentraatiolla, joka on esitetty kuvassa 15. Inhibiittorien häirinnän perusteella voidaan tehdä päätelmiä siitä, että millainen molekyylin pitäisi olla, jotta se ei aiheuttaisi häirintää mittauksissa entsyymien kanssa.



Kuva 15 Häirintätesti, eniten häirintää aiheuttanut inhibiittori.

#### 4.7 ATP konsentraatioiden testaus

Kuvassa (kuva 16) on näytetty ainoastaan inhiboimattomien näytteiden signaalit. Siinä ei ole näytetty sitoutuneiden peptidiparien signaaleita, koska kaikissa inhiboiduissa näytteissä oli 2  $\mu\text{M}$  staurosporiinia joka riitti estämään entsyymien toiminnan huolimatta ATP:n määrästä. PIM-1:n määrä oli 2 nM ja tästä johtuen se ei vielä fosforyloinut substraattia pienemmissä ATP:n konsentraatioissa, toisin kuin PIM-3 jota oli 5 nM. Täysin sammutetun signaalin määrä saatiin selvitettyä käyttämällä fosfaattiin sitoutunutta peptidiä pMO5 ja Eu-peptidiä, jolloin signaalit sammutettiin entsyymistä huolimatta. Sen perusteella 50  $\mu\text{M}$  konsentraatiossa PIM-1:n aktiivisuus riitti fosforyloimaan kaikki substraatit, joten suurempi ATP:n määrä ei olisi hyödyttänyt. PIM-3 ei myöskään fosforyloinut enempää enää 10  $\mu\text{M}$  ATP konsentraation jälkeen.



Kuva 16 ATP:n konsentraatit.

## 5 PÄÄTELMÄT

Tässä opinnäytetyössä kehitettiin homogeenistä entsyymiaktiivisuuden määrittymenettelmää tehoseulontaan. Kehitettävä menetelmä oli sammutus-resonanssi-energiansiirto ja kohde-entsyymit olivat kolme PIM-kinaasia. Työn tavoitteena oli selvittää, pystyykö menetelmää optimoimaan ainakin yhdelle kolmesta entsyymistä niin, että sitä voitaisiin käyttää tehoseulontaan ja potentiaalisten inhibiittorien testaamiseen entsyymeille.

Työssä käytettiin p8g substraattia, jolla menetelmän optimointi onnistui PIM-1:lle parhaiten. Tämän kanssa käytettävä konsentraatio oli 40 % muiden työssä käytettyjen kinaasien konsentraatioista. Menetelmällä saatiin käyttökelpoisia tuloksia 10 µl näytetilavuudella, joten sillä on potentiaalia jatko-optimointiin tehoseulontaa varten. Tässä työssä haasteena oli entsyymien vaihteleva aktiivisuus eri kinaaseja käytettäessä. Menetelmää voitaisiin jatkossa optimoida kahdelle muulle PIM-kinaasille käyttämällä eri substraattia tai pyrkiä löytämään kaikille kolmelle mahdollisimman tasavertaisesti toimiva kohdesekvenssi.

Inhibiittorien testauksessa käytettiin kuitenkin PIM-3:a, koska testattavat inhibiittorit toimivat sen kanssa paremmin. Tulokset olivat silti melko huonot johtuen menetelmän optimoinnista, koska korkein signaalin ja taustan suhde oli vain noin 4 ja myös signaalitasot olivat matalat. Vaikka PIM-entsyymeillä tiedetään olevan toisiinsa nähden hyvin samankaltainen rakenne ja toiminta, eivät inhibiittorit toimineet lähes ollenkaan PIM-1:n kanssa. Kinaaseille sopivan inhibiittorin tutkimisen lisäksi menetelmää käytettiin testattavien inhibiittorien signaaleille aiheutetun häirinnän testaamiseen.

## LÄHTEET

- Aho, T.L.T.; Sandholm, J.; Peltola, K.J.; Mankonen, H.P.; Lilly, M. & Koskinen, P.J. 2004. PIM-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser<sup>112</sup> gatekeeper site. *FEBS Letters*, 571, 43-49.
- Asati, V.; Mahapatra, D.K. & Sanjay, K.B. 2019. PIM kinase inhibitors: Structural and pharmacological perspectives, 172, 95-108.
- Bachmann, M. & Möröy, T. 2005. The serine/threonine kinase PIM-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 726-730.
- Brault, L.; Gasser, C.; Bracher, F.; Knapp, S. & Schwaller, J. 2010. PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica*, 95, 1004-1015.
- Bullock, A.N.; Debreczeni, J.; Amos, A.L.; Knapp, S. & Turk, B.E. 2005. Structure and substrate specificity of the PIM-1 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 41675-41682.
- Kopra, K. & Härmä, H. 2015. Quenching resonance energy transfer (QRET): a single-label technique for inhibitor screening and interaction studies. *New Biotechnology*, 32, 575-580.
- Kopra, K.; Tong-Ochoa, N.; Laine, M.; Eskonen, V.; Koskinen, P.J. & Härmä, H. 2019. Homogeneous peptide-break assay for luminescent detection of enzymatic protein post-translational modification activity utilizing charged peptides. *Analytica Chimica Acta*, Volume 1055, 126-132.
- Macdonald, A.; Campbell, D.G.; Toth, R.; McLauchlan, H.; Hastie, C.J. & Arthur, J.S.C. 2006. PIM kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-X<sub>L</sub>. *BMC Cell Biology*, 7, 1.
- Mishra, K.P.; Ganju, L.; Sairam, M.; Banerjee, P.K. & Sawhney, R.C. 2008. A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62, 94-98.
- Peng, C.; Knebel, A.; Morrice, N.A.; Li, X.; Barringer, K.; Li, J.; Jakes, S.; Werneburg, B. & Wang, L. 2007. PIM kinase substrate identification and specificity. *The Journal of Biochemistry*, 141, 353-362.
- Qian, K.C.; Wang, L.; Hickey, E.R.; Studts, J.; Barringer, K.; Peng, C.; Kronkatis, A.; Li, J.; White, A.; Mische, S. & Farmer, B. 2004. Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human PIM-1 kinase. *Journal of Biological chemistry*, 280, 6130-6137.
- Santio, N.M.; Vahakoski, R.L.; Rainio, E.M.; Sandholm, J.A.; Virtanen, S.S.; Prudhomme, M.; Anizon, F.; Moreau, P. & Koskinen, P.J. 2010. PIM-selective inhibitor DHPCC-9 reveals PIM kinases as potent stimulators of cancer cell migration and invasion. *Molecular cancer*, 9, 279.
- Shah, N.; Pang, B.; Yeoh, K.G.; Thorn, S.; Chen, C.S.; Lilly, M.B. & Salto-Tellez, M. 2008. Potential roles for the PIM1 kinase in human cancer – A molecular and therapeutic appraisal. *European Journal of Cancer*, Volume 44, 2144-2151.
- Tong-Ochoa, N. 2019. The peptide break technology: A novel approach for protein post-translational modification assays in drug discovery. *Turun yliopiston julkaisuja – Annales Universitatis Turkuensis. Sarja – ser. A1 osa – tom. 600. Väitöskirja. Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta. Kemian laitos. Turku: Turun yliopisto. Viitattu 15.7.2019.*

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

Wang, Z.; Bhattacharya, N.; Weaver, M.; Petersen, K.; Meyer, M.; Gapter, L. & Magnuson, N.S. 2001. PIM-1: A serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Journal of Veterinary Science*, 2, 167-179.

<https://turkubusinessregion.com/karkialat/healthturku/> Viitattu 24.7.2019.