

**Pro gradu -tutkielma**

**AKR1C3-entsyymin tuotto-, puhdistus- ja  
kiteytysolosuhteiden optimointi**

**Anni Keisanen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Biologian opettajankoulutus

12.9.2018

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Biologian opettajankoulutus

Keisanen, A.: AKR1C3-entsyymien tuotto-, puhdistus- ja  
kiteytysolosuhteiden optimointi  
Pro gradu -tutkielma: 49 s., 4 liitettä (4 s.)  
Työn ohjaajat: FT Tatu Haataja ja FT Ulla Pentikäinen  
Tarkastajat: Prof. Jari Yläne ja FT Heikki Takala  
Syyskuu 2018

---

Hakusanat: Entsyymi, Kiteyttäminen, Kumariini, Lämpötilariippuvainen  
fluoresenssispektroskopia, Lääkeaine, Röntgenkristallografia, Yhdistelmä-  
DNA-tekniikka.

Aldo-keto-reduktaasi (AKR) kuuluu oksidoreduktaasin superperheeseen. Ihmisen (*Homo sapiens*) AKR1C3 (aldo-keto reduktaasi C3) säätelee elimistön hormonituotantoa osallistumalla prostaglandiini- ja steroidisynteseihin. Häiriöt AKR1C3-geenin toiminnassa vaikuttavat ratkaisevasti erilaisten sairauksien, kuten hormoniriippuvaisten syöpien syntymiseen. Tällä hetkellä kliiniseen käyttöön ei ole hyväksytty yhtään AKR1C3-entsyymiin kohdennettua lääkeainetta. Tutkimuksen tavoitteena oli optimoida rekombinanttisen AKR1C3-proteiinin tuotto- ja puhdistusolosuhteet sekä tutkia tietokonemallinnuksella suunniteltujen molekyylien sitoutumista AKR1C3-entsyymiin. Tuotto- ja puhdistusmenetelmien optimoinnissa onnistuttiin saamaan 0.5 l tuotolla 11.9 mg 96.5 % puhdasta AKR1C3-proteiinia. Molekyylien sitoutumista AKR1C3-entsyymiin tutkittiin lämpötilariippuvaisella fluoresenssispektroskopiolla. 64 tutkitusta molekyylistä 6 molekyyliä sitoutui AKR1C3-entsyymiin. Molekyylien sitoutumismuodon määrittämiseksi AKR1C3-entsyymi ja ligandi kiteytettiin riippuva pisara - menetelmän sekä liuotuskokeen avulla. Muodostuneista kompleksikiteissä havaittiin diffraktiota röntgenkristallografialla (MASSIF-1, ESRF). Tutkimuksessa löydettiin uusi suunta AKR1C3-kohdennetun lääkkeen kehittämiseen - kumariinijohdannaiset ligandit.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
Department of Biological and Environmental Science  
Teacher Training of Biology

Keisanen, A.: Production, purification and crystallization of AKR1C3-enzyme  
MSc thesis: 49 p., 4 appendices (4 p.)  
Supervisors: PhD Tatu Haataja and PhD Ulla Pentikäinen  
Inspectors: Prof. Jari Yläne and PhD Heikki Takala  
September 2018

---

Key Words: Crystallization, Coumarin, Drug, Enzyme, Recombinant DNA technology, Thermofluor, X-ray crystallography.

Aldo-keto reductase family one member C3 (AKR1C3) is a key steroidogenic enzyme that is overexpressed in hormone-dependent cancers. No AKR1C3-targeted inhibitor has been approved for clinical use. The aim of the study was building AKR1C3-protein production system and optimizing production conditions. The best AKR1C3 protein was produced in TB medium. The AKR1C3 enzyme was purified by affinity chromatography, dialysis and gel filtration. The purified protein was used to study the drug interactions of AKR1C3. Thermofluor method found six ligands that significantly increased melting temperature of the AKR1C3 enzyme. In the study, the AKR1C3 protein was crystallized by using the hanging drop method and soaking. In the X-ray crystallography studies (MASSIF-1, ESRF) complex crystals were detected to diffract. The study found a new direction in AKR1C3-targeted drug development - coumarin derivatives.

# SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	7
1.1 AKR1C3-proteiinin rakenne.....	7
1.2 AKR1C3-entsyymin toiminta.....	8
1.3 AKR1C3 ja hormoniriippuvaiset syövät.....	9
1.4 AKR1C3-inhibiittorit .....	10
2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	12
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	13
3.1 Tuottojärjestelmän rakentaminen.....	13
3.2 Proteiinin tuottaminen .....	15
3.2.1 Tuotto-olosuhteiden optimointi .....	15
3.2.2 Puhdistusolosuhteiden optimointi.....	16
3.3 AKR1C3-entsyymin laskostumisen tutkiminen lämpötilariippuvaisella fluoresenssispektroskopialla .....	19
3.3.1 DMSO:n vaikutus AKR1C3 stabiiliuuteen.....	19
3.3.2 Lääkeainekandidaattien vaikutus AKR1C3-entsyymin sulamislämpötilaan.....	19
3.4 Kiteyttäminen .....	20
3.4.1 AKR1C3-proteiinin kiteytysolosuhteen etsiminen ja optimointi .....	20
3.4.2 Kiteiden tuottaminen.....	21
3.4.3 Kompleksikiteen rakentaminen.....	22
3.5 Röntgenkristallografia.....	22
4 TULOKSET .....	23
4.1 AKR1C3-geenin kloonaus tuottovektoriin .....	23

4.2 Tuotto-olosuhteiden optimointi .....	23
4.3 Puhdistusolosuhde .....	25
4.4 Lämpötilariippuvainen fluoresenssispektroskopia .....	26
4.5 AKR1C3-proteiinin kiteytys .....	30
4.6 Kiteiden diffraktion määrittäminen .....	31
5 TULOSTEN TARKASTELU .....	33
5.1 AKR1C3-geenin kloonautus .....	33
5.2 AKR1C3-proteiinin tuottaminen <i>E. coli</i> -bakteerissa ja puhdistus .....	34
5.3 AKR1C3-entsyymin lääkeainevuorovaikutukset .....	36
5.4 AKR1C3 kiteytyminen ja diffraktio .....	40
6 JOHTOPÄÄTÖKSET .....	43
KIITOKSET .....	44
KIRJALLISUUS .....	45
Liitteet .....	50

## LYHENTEET

<b>AKR1C3</b>	aldo-keto-reduktaasi C3
<b>DMSO</b>	dimetyylisulfoksidi
<b>DTT</b>	ditiotreitoli, ( <i>engl. 1,4-dithiothreitol</i> )
<b>GST</b>	glutathioni-S-transferaasi
<b>LB</b>	Luria-Bertani -kasvatusliuos, ( <i>engl. lysogeny broth</i> )
<b>M9ZB</b>	mineraali-amiini -kasvatusliuos
<b>PBS</b>	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
<b>PCR</b>	polymeraasiketjureaktio, ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
<b>PEG</b>	polyetyleeniglykoli
<b>SDS-PAGE</b>	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidielektroforeesi, ( <i>engl. sodiumdodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>TB</b>	kasvatusliuos, ( <i>engl. terrific broth</i> )
<b>TEV</b>	( <i>engl. Tobacco etch virus</i> )
<b>T<sub>m</sub></b>	sulamislämpötila, ( <i>engl. melting temperature</i> )

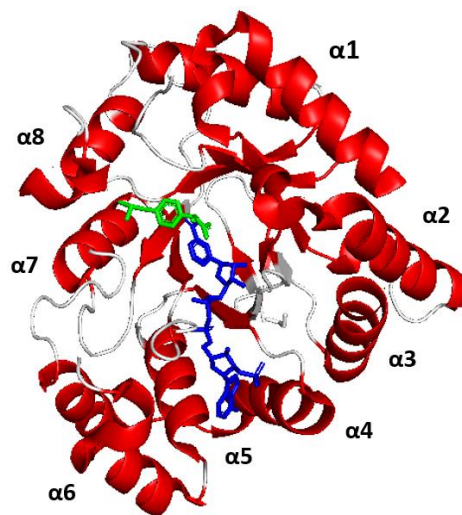
## 1 JOHDANTO

Aldo-keto-reduktaasi (AKR) kuuluu oksidoreduktaasin superperheeseen. AKR -perheen geenejä löytyy sekä prokaryootti- että eukaryoottisoluista. AKR-superperhe sisältää 15 perhettä ja 151 jäsentä. Kaikista suurin AKR-perheistä on AKR1, joka jakautuu alaheimoihin, kuten selkärankaisille tunnettuun AKR1C-alaheimoon ([www.med.upenn.edu/akr](http://www.med.upenn.edu/akr)). Ihmisellä (*Homo Sapiens*) AKR1Cs-geenipaikka on kromosomissa 10p15-10p14. AKR1Cs geeni sisältää 12 eksonia, jotka koodaavat 13:ta ainutlaatuista proteiinia (AKR1C1-13). Ihmisellä esiintyy neljä erilaista AK1Cs-geeniä: AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 ja AKR1C4. Näiden aldo-keto-reduktaasien sekvenssit ovat 84-98 % homologisia toistensa kanssa (Jez ym. 1997, Penning & Byrns 2009, Zeng ym. 2017). Vaikka ihmisen AKR1Cs-muodot muistuttavat toisiaan, vastaavat ne elimistössä erilaisista ja osittain vuorovaikutuksissa toistensa kanssa olevista tehtävistä (Penning ja Dryry 2007, Penning ja Byrns 2009). Kaikkia AKR1C-entsyymejä yhdistää kyky hapettaa ketoneista ja aldehydeistä elimistölle vähemmän myrkyllisiä alkoholeja käyttämällä kofaktoreina NADH:ta ja NADPH:ta (Jez ym. 1997, Jez ja Penning 2001).

### 1.1 AKR1C3-proteiinin rakenne

AKR1C3-geeni kuuluu AKR1-perheeseen, ja on perheenjäsen C3. AKR1C3 tunnetaan myös nimellä tyyppin 5 17beeta-hydroksisteroididehydrogenaasi (17 $\beta$ -HSD5). Ilmentyessään AKR1C3-geeni tuottaa sytoplasmista proteiinia, joka sisältää 323 aminohappoa, ja on kooltaan 37 kDa (Jez ym. 1997, Jez ym. 1997b, Jez ja Penning 2001). Tässä tutkimuksessa keskityttiin AKR1C3-proteiiniin, jonka referenssisekvenssin tietokantanumero on NP\_003730.4NP\_003730.4 (National Center for Biotechnology Information).

Kaikille AKR-entsyymeille on tyypillistä, että ne muodostavat kolmiulotteisen  $(\alpha/\beta)_8$ -tynnyrirakenteeseen, jossa on kolme joustavaa silmukkaa. AKR1C3:n kolmiulotteinen rakenne koostuu kahdeksasta yhdensuuntaisesta  $\beta$ -juosteesta ja kahdeksasta vastakkaissuuntaan vuorottelevasta  $\alpha$ -heliksistä, jotka yhdessä muodostavat katalyyttisen taskun (Kuva 1) (Jez ym. 1997, Amano ym. 2015, [www.med.upenn.edu/akr](http://www.med.upenn.edu/akr)). Aikaisemmissa kiteytystutkimuksissa on osoitettu, että katalyyttisen taskun sisällä on neljä aminohappotähdettä (Asp50, Tyr55, Lys84, His117), jotka voivat olla vuorovaikutukseen NADP:n ja substraatin kanssa (Jez ym. 1997).



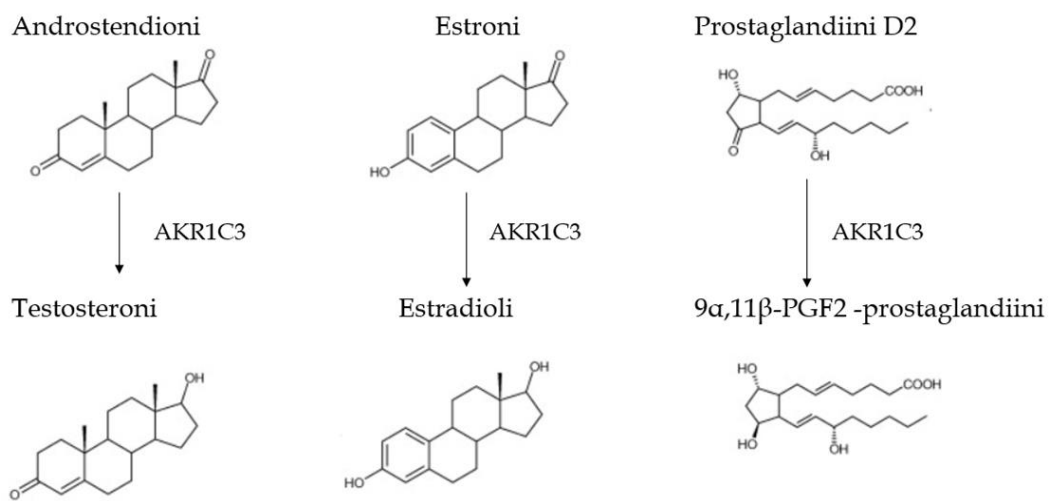
Kuva 1. AKR1C3-proteiinin rakenne: punaisella  $\alpha 1$ - $\alpha 8$   $\alpha$ -heliksikierteet, valkoisella silmukat, keskellä entsyymin katalyyttisessä taskussa sinisellä NADP ja vihreällä ibuprofeini (RCSP Protein Data Bank, 3R8G).

## 1.2 AKR1C3-entsyymin toiminta

AKR1C3 osallistuu prostaglandiinien synteeseihin, joissa se pelkistää prostaglandiineja: prostaglandiini D2 (PGD2), prostaglandiini H2 (PGH2), *phenanthrenequinone* (PQ) sekä hapettaa  $9\alpha,11\beta$ -PGF2 -prostaglandiinia (Penning ja Byrns 2009). Prostaglandiinisynteesien lisäksi AKR1C3:n tärkeisiin tehtäviin kuuluu hormonituotantoon osallistuminen. Se katalysoi androstendionista



testosteronia ja estronista estradiolia (Kuva 2) (Penning ym. 2000, Penning ja Byrns 2009). Muodostuneet hormonit sitoutuvat soluissa niille spesifisiin tumareseptoreihin: testosteroni AR-, estradioli ER $\alpha$ - ja 9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -PGF $_2$ -prostaglandiini PPAR $\gamma$  -reseptoriin (Penning ja Dryry 2007). AKR1C3-geeni ilmentyy paikallisesti voimakkaisten munuaisissa, lihaksissa, maitorauhasissa, eturauhasessa, perifeerisissä veren lymfosyyteissä sekä kohdussa. AKR1C3:n lievää ilmentymistä on havaittu myös maksassa, keuhkoissa, sydämessä, lisämunuaisissa, munasarjoissa ja kiveksissä (Penning ym. 2000).



Kuva 2. AKR1C3-entsyymin katalysoimia reaktioita (mukaillen Gobec ym. 2005).

### 1.3 AKR1C3 ja hormoniriippuvaiset syövät

AKR1C3 vastaa elimistön prostaglandiinien ja steroidien tuotannosta, minkä takia AKR1C3 on keskeisessä asemassa hormoniriippuvaisten syöpien syntymisessä (Penning ym. 2006, Penning ja Byrns 2009). Tyypillisesti hormoniriippuvaisten syöpien kehittymiseen tarvitaan suurentuneita hormonipitoisuuksia (Penning ym. 2006). Eturauhassyövässä suurentunut testosteronitaso johtuu AKR1C3:n paikallisesta yli-ilmentymisestä (Byrns ym. 2012). Myös Byrns ym. (2010) tutkimuksessa havaittiin, että keinotekoinen AKR1C3 yli-ilmentyminen rintakudoksessa johtaa tehostettuun testosteroni- ja estradiolituotantoon sekä progesteronin inaktivointiin. Transfektoidut solut alkoivat lisääntyä vasteena

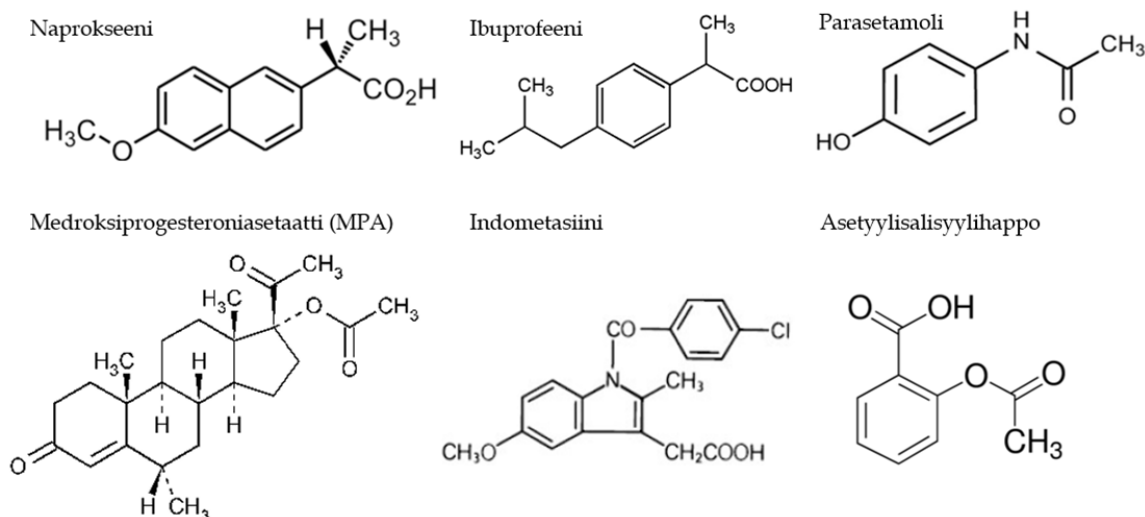
hormonipitoisuuden muutokselle, mikä aiheutti rintasyövän kehittymisen (Byrns ym. 2010). Lisäksi monissa aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että pahanlaatuisissa rinta- ja eturauhassyöpäkudoksissa AKR1C3:n lähetti-RNA:n ja/tai proteiinin ilmentymistasot muuttuvat (Agung ym. 2005, Suzuki ym. 2005, Byrns ja Penning 2009).

#### 1.4 AKR1C3-inhibiittorit

AKR1C3-entsyymien inhibiittorit ovat osoittautuneet potentiaalisiksi lääkkeiksi hormoniriippuvaisten syöpien hoitamisessa. Yleisesti tunnettuja AKR1C3-entsyymiä inhiboivia lääkkeitä ovat NSAID-lääkkeet (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*), joiden toiminta perustuu syklo-oksigenaasin ja prostaglandiinisynteesin estämiseen (Pawlowski ym. 1991, Desmond ym. 2003, Gobec ym. 2005). NSAID-lääkkeet kykenevät inhiboimaan syöpäsolujen kasvua ja indusoimaan apoptoosia COX-riippuvaisten mekanismien avulla (Desmond ym. 2003, Kashfi ja Rigas 2005, Wang ym. 2006). Yksi tunnetuimmista kliiniseen käyttöön otetuista AKR1C3-entsyymiä inhiboivista NSAID-lääkkeistä on indometasiini, jota käytetään muun muassa rintasyövän ja akuutin myelooiseen leukemian hoitamisessa (Kuva 3) (Desmond ym. 2003, Zeng ym. 2017, [www.pharmacafennica.fi](http://www.pharmacafennica.fi)).

NSAID-lääkkeiden lisäksi tunnetaan useita muita AKR1C3-entsyymiä inhiboivia molekyyliä, joista useimmat ovat karboksyylihappoja (Kuva 3). AKR1C3-entsyymiä inhiboiviin aineisiin kuuluu muun muassa kanelihappo (Brozic ym. 2006), steroidihormonianalogit (Bydal ym. 2009), flavonoidit (Skarydova ym. 2009), syklopentaanit (Stefane ym. 2009), bentsoehapot (Adeniji ym. 2011), bakkariinianalogit (Zang ym. 2015), ruteniumkompleksit (Kljun ym. 2016), yleisimmin käytetyt diabeteslääkkeet (Zhao ym. 2015) ja progestiinit (Beranic ym. 2011), kuten rinta- ja keuhkosyövän hoitamisessa käytetty medroksiprogesteroniasetaatti (Khanim ym. 2014, Zeng ym. 2017, [www.pharmacafennica.fi](http://www.pharmacafennica.fi)). Usean lääkkeen ongelmana kuitenkin on, että

AKR1C3:lla on kyky inaktivoitua ja muuntua vastustuskykyiseksi lääkkeitä vastaan. Resistenssiä on havaittu erityisesti syöpälääkkeitä käytettäessä (Barski ym. 2008, Novotna ym. 2008).



Kuva 3. AKR1C3-entsyymiä inhiboivia lääkkeitä (mukaiillen Gobec ym. 2005, Zeng ym. 2017).

Viimeaikaisissa tutkimuksissa on löydetty lupaava AKR1C3-entsyymiin kohdennettu lääkeaine: ASP9521-inhibiittori. Kikuchi ym. (2014) ja Lorient ym. (2014) ovat osoittaneet, että ASP9521 estää eturauhassyövän kehittymisen sekä *in vitro*- että *in vivo* -kokeissa. Vaikka kehitteillä on lupaavia lääkkeitä, kliiniseen käyttöön ei ole hyväksytty vielä yhtään AKR1C3-entsyymiin kohdennettua lääkeainetta (Pippione ym. 2018). Jatkossakin tarvitaan lisää AKR1C3-tutkimusta, jotta ymmärrettäisiin syvemmin AKR1C3-riippuvaisten sairauksien mekanismeja ja pystyttäisiin kehittämään parempia AKR1C3-entsyymiin kohdennettuja lääkeaineita.

## 2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

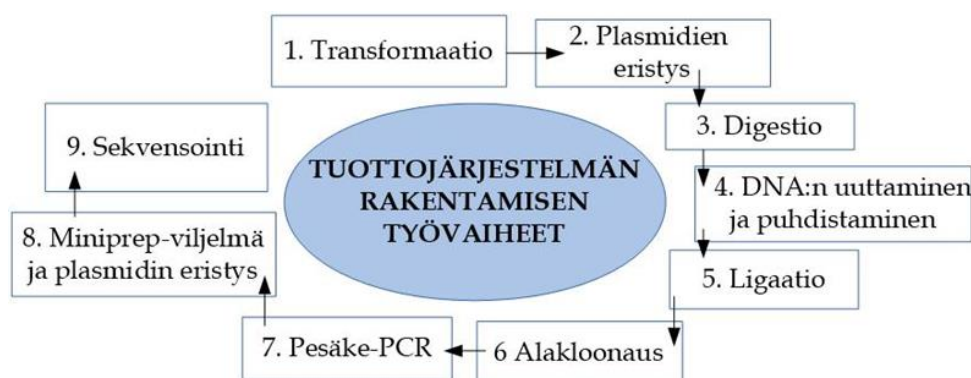
Tutkimuksen tavoitteena oli optimoida AKR1C3-proteiinin tuotto-, puhdistus- ja kiteyttämisolosuhteet mahdollisimman tehokkaiksi jatkotutkimuksia varten.

Tutkimukseen kuului 6 päätavoitetta:

- 1) *AKR1C3*-geenin kloonaukseen tuottovektoriin
- 2) *AKR1C3*-entsyymin tuotto-olosuhteiden optimointi
- 3) *AKR1C3*-entsyymin puhdistus-olosuhteiden optimointi
- 4) Uusien *AKR1C3*-entsyymiin kohdennettujen lääkeainekandidaattien sitoutumisen tutkiminen lämpötilariippuvaisella fluoresenssispektroskopiolla
- 5) *AKR1C3*-entsyymin kiteytysolosuhteiden optimointi röntgenkristallografiolla tehtävää rakennetutkimusta varten
- 6) *AKR1C3*-ligandikompleksin kiteytysolosuhteen optimointi ligandin sitoutumismuodon määrittämistä varten.

## 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 3.1 Tuottojärjestelmän rakentaminen

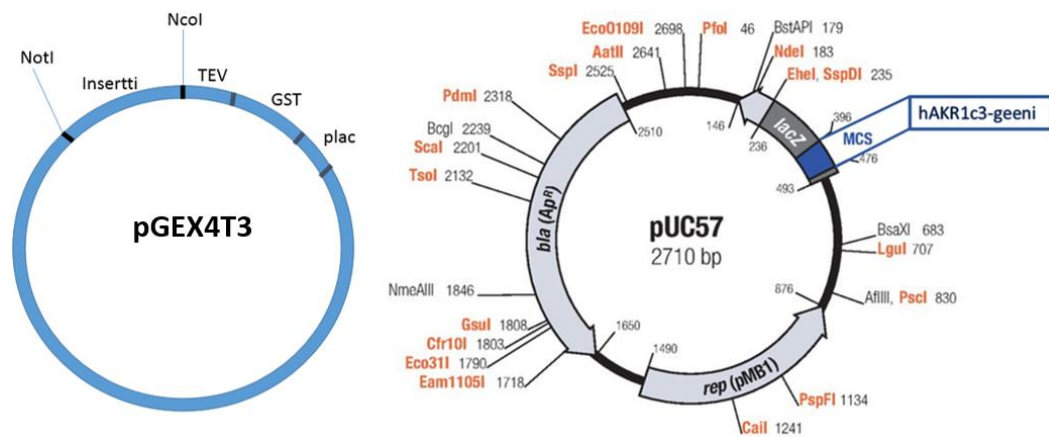


Kuva 4. Tuottojärjestelmä rakennettiin työvaiheiden mukaisesti.

Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla rakennettiin AKR1C3-entsyymille tuottojärjestelmä (Kuva 4). Tutkimuksessa käytettiin kaupallista *E. coli* -bakteeriin suunniteltua pUC57::hAKR1C3 -plasmidia (GenScript, Piscataway, New Jersey, USA), johon oli kiinnitetty synteettinen AKR1C3-geeni. pUC57::hAKR1C3 -plasmidi sekä pGEX4T3-tuottovektori (Kuva 5) transformoitiin kompetentteihin *E. coli* DH5a -soluihin. Plasmidit eristettiin käyttämällä NucleoSpin Plasmid Miniprep -kittiä (Macherey-Nagel, REF 740588.250). pGEX4T3-vektorille ja pUC57::hAKR1C3 -plasmidille tehtiin restriktioanalyysi digestoimalla tuotetut DNA:t *NcoI*- (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) ja *NotI*- (Thermo Fischer Scientific) restriktioentsyymeillä. Digestiossa käytettiin restriktioentsyymien lisäksi 10x Cut smart -restriktiopuskuria (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). AKR1C3-insertti ja pGEX4T3-vektori liitettiin toisiinsa T4-DNA -ligaasilla (5 U/μl, Thermo Fischer Scientific) sekä 10x T4 DNA ligaasi -puskurilla (Thermo Fischer Scientific). Muodostunut ligaatioseokseos transformoitiin *E. coli* DH5a -soluihin ja maljattiin ampisilliiniselektiivisille agarmaljoille. Maljoja kasvatettiin yön yli 37 °C asteen lämpötilassa.

pGEX4T3::AKR1C3-plasmidit paikannettiin pesäke-PCR:llä. Templaattina PCR:ssä käytettiin bakteeripesäkettä, jonka emäsjärjestys kopioitiin. Yksi reaktioseos sisälsi 1  $\mu$ M pGEX5' -seq -aluketta (5' CTGGCAAGCCACGTTTGG 3', Metabion, Planegg, Saksa), 1  $\mu$ M pGEX3 -seq -aluketta (5' GGAGCTGCATGTGTCAGAG 3', Metabion, Planegg, Saksa), 0.4 mM deoksinukleotideja (dNTPs) (Thermo Fischer Scientific) sekä 1.5 mU DreamTaq DNA -polymeraasientsyymiä (Fermantas, #EP0702). PCR-näytteet ajettiin PCR-laitteella (Bio-Rad Laboratories MyCycler thermal cycler), johon luotiin erillinen ohjelma. PCR:ssä käytettiin ohjelmaa: 1x alkudenaturaatio 2 min / 95 °C, 30-kertainen sykli: denaturaatio 30 s / 94 °C, kiinnittyminen 30 s / 55 °C, loppupidennys 1 min / 72 °C, viimeinen loppupidennys 5 min / 72 °C ja 1x säilytyslämpötila 1 min / 4 °C.

Pesäke-PCR varten valmistettiin 1 % agarosigeeli, jossa oli 0.5  $\mu$ g/ml etidiumbromidia (Midori Green Advanced DNA Stain, Nippon Genetics Europe GmbH). Elektroforeesissa käytettiin ajopuskurina 1x TAE-puskuria (40 mM tris-asetatti, 1 mM EDTA). Näytteisiin lisättiin 6x Gel Loading Dye Purple -näytepuskuria (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Molekyylipainomarkkerina käytettiin 1 kb DNA-standardia (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Näytteitä ajettiin elektroforeesissa 100 V jännitteellä 20 minuuttia. Geeli kuvattiin Bio-Rad -kuvantamislaitteella. Sekvensointi tehtiin FIMM:n (Institute for Molecular Medicine Finland, Helsinki) laboratoriossa.



Kuva 5. pGEX4T3-vektorin ja pUC57::hAKR1C3 -plasmidin (muokailten Thermo Fischer Scientific, puC57 DNA) kaavamaiset rakenteet. Molemmassa plasmideissa on *NotI*- ja *NcoI*-leikkauskohdat. pGEX4T3-vektori on kooltaan 4968 bp, pUC57-vektori 2710 bp ja AKR1C3-geeni 982 bp.

## 3.2 Proteiinin tuottaminen

### 3.2.1 Tuotto-olosuhteiden optimointi

pGEX4T3::AKR1C3-plasmidi (230 ng/ $\mu$ l) transformoitiin kompenttiin *E. coli* BL21-Gold -tuottokantaan (Agilent Technologies, #230133). Transformoidulta agarmaljalta poimittiin yksi bakteeripesäke 50 ml LB-esikasvatusliuokseen, jossa oli 1 % glukoosia ja 100  $\mu$ g/ml ampicilliinia. Esikasvatusliuoksen annettiin kasvaa yön yli ravistelijassa (250 rpm, 30 °C) (New Brunswick Scientific, Excella E25). 1 ml esikasvatusliuosta siirrettiin 250 ml:n kasvatuspulloihin, jotka sisälsivät 50 ml kasvatusliuoksia: LB, M9ZB ja TB (Liite 1 ja 2). Kasvatus aloitettiin 37 °C lämpötilassa. Solujen kasvatusta jatkettiin, kunnes bakteeriviljelmän absorbanssi 600 nanometrin aallonpituudella ylitti arvon 0.6. Proteiinin tuotanto aloitettiin lisäämällä bakteeriviljelmiin 0.4 mM IPTG (isopropyyli  $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidi). Soluja kasvatettiin Taulukon 1 mukaisissa olosuhteissa.

Taulukko 1. AKR1C3-proteiinin kasvatusolosuhteet.

Lämpötila	Kasvatusliuos ja induktioaika		
	LB	TB	M9ZB
20 °C	20 h	20 h	20 h
30 °C	3.5 h	3.5 h	3.5 h
37 °C	3.5 h	3.5 h	3.5 h

Kasvatuksen aikana kaikista kasvatuspulloista otettiin SDS-PAGE -näytteet ennen ja jälkeen indusoinnin. SDS-PAGE -näytteet ajettiin 12 % SDS-PAGE -geelillä 1x SDS-puskurissa Bio-Rad Mini-PROTEAN -ajolaitteella 200 V, 50 min (Liite 3 ja 4). Standardina käytettiin: Broad Range, SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, Cat. 161-0317) sekä Blue Plus Prestained Protein Marker (Nippon Genetics Europe GmbH, Cat. MWP04). Geeli värjättiin PageBlue protein staining -liuoksella (Thermo Fischer Scientific).

Kasvatetut solut kerättiin sentrifugoimalla (6000 x g, 15 min, 4 °C) ja supernatantti kaadettiin pois. Tämän jälkeen soluja pestiin jääkylmällä 1x PBS:llä (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, pH 7.4), kerättiin sentrifugoimalla (5000 x g, 10 min, 4 °C) ja supernatantti kaadettiin pois. Lopuksi solut suspensoitiin 1x PBS:llä (2.5 ml/1 g soluja) ja bakteerisuspensiot säilöttiin -80 °C pakkaseen.

### 3.2.2 Puhdistusolosuhteiden optimointi

Bakteerisuspensio sulatettiin 30 °C vesihauteessa ja hajotettiin 40 barilla Emulsiflex C3-laitteella (Avestin Europe GmbH). Lysaatti kirkastettiin sentrifugoimalla (35 000 x g, 30 min, 4 °C). Muodostuneen lysaatin puhdistusta jatkettiin affiniteettikromatografiavaiheeseen. Tutkimuksessa eluutio ja GST:n poisto tehtiin kahdella eri menetelmällä: *in situ* ja dialyysi.



### GST:n poisto *in situ* -menetelmällä

Pylvääseen siirrettiin 1x PBS:llä esivalmisteltu affiniteettimateriaali (Protino 4B Glutathione Agarose, Macherey-Nagel, Ref 745500.100) ja muodostunut lysaatti, jota pestiin 1x PBS:llä. Pylvääseen lisättiin 1 ml TEV-proteaasia (0.93 mg/ml) ja 9 ml dialyysipuskuria (5 % glyseroli, 1x PBS, 1 mM DTT, pH 7.4). Pylvään annettiin keinua yön yli 4 °C lämpötilassa. Seuraavana päivänä puhtaan proteiinin annettiin tippua hiljalleen jäällä olevaan sentrifuugiputkeen. Pylvääseen lisättiin dialyysipuskuria, kunnes tippuvan proteiinin pitoisuudeksi saatiin 0 mg/ml. Proteiinin pitoisuus mitattiin spektrofotometrisesti 280 nm aallonpituudella NanoDrop ND-1000 -laitteella (Finnzymes). *In situ* -katkaistu proteiini väkevöitettiin konsentraattorilla (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 10 000 MWCO, Ref UFC901008) sentrifugoimalla 1-5 min jaksoissa (5000 rpm, 4 °C) (Thermo Fischer Scientific, ST16R).

### GST:n poisto dialyysillä

Esivalmisteltu affiniteettimateriaali (Protino 4B Glutathione Agarose, Macherey-Nagel) ja lysaatti pestiin 1x PBS:llä. Pylvääseen lisättiin 1 ml:n erissä eluutiopuskuria (50 mM tris, 40 mM glutationi, 1 M DTT) ja kerättiin 25 kappaletta 1 ml:n fraktioita. Fraktioiden pitoisuus mitattiin spektrofotometrisesti 280 nm aallonpituudella. Kaikki yli 0.8 mg/ml fraktiot yhdistettiin, ja niihin lisättiin 1 ml TEV-proteaasia (0.93 mg/ml). Syntynyt AKR1C3-TEV -seos siirrettiin dialyysiletkuun (Spectra/Por molecular membrane tubing, Spectrum labs, MWCO 12-14 kD, Lot. 9200541) ja annettiin dialysoitua yön yli 2 l dialyysipuskurissa (5 % glyseroli, 1x PBS, 1 mM DTT, pH 7.4) 4 °C lämpötilassa. Proteiini siirrettiin pylvääseen, jossa oli esivalmisteltu affiniteettimateriaali (Protino 4B Glutathione Agarose, Macherey-Nagel) ja puhdistettiin TEV-proteaasin leikkaamasta GST-osasta dialyysipuskurilla, joka sisälsi 10 mM DTT:n. Puhtaan proteiinin annettiin tippua hitaasti jäällä olevaan sentrifuugiputkeen. Proteiinin pitoisuutta kontrolloitiin puhdistuksen aikana mittaamalla läpi putoavista pisaroista

NanoDrop ND-1000 -laitteella (Finnzymes) konsentraatio. Proteiinin puhdistus ja dialyysipuskurin lisääminen lopetettiin, kunnes läpi tulleen pisaran pitoisuudeksi saatiin 0 mg/ml. Dialysoitu proteiini väkevöitettiin konsentraattorilla (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 10 000 MWCO, Ref UFC901008) sentrifugoimalla 1-5 min jaksoissa (5000 rpm, 4 °C) (Thermo Fischer Scientific, ST16R).

Väkevöitetyt proteiinit suodatettiin (Millex-GV Syringe Filter Unit, 0.22 µm) ruiskulla (BD Luer-lock Syringe) ja siirrettiin geelisuodatettavaksi Äkta prime plus -laitteeseen, joka oli varusteltu affiniteettipylväällä (GE Healthcare, HiLoad 26/60 Superdex 75, Lot 10031717, ID 0039). Geelisuodatuksessa käytettiin 0.5 MPa:n painetta, 3 ml/min virtausnopeutta ja kerättiin 2 ml:n fraktioita. Pylväs tasapainoitettiin puskuriin: 10 mM KPi, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4. Geelisuodatusta seurattiin ja analysoitiin PrimeView -ohjelmalla. Proteiinit väkevöitettiin, säilöttiin 5 % glyseroliin ja nestetyypen kautta -80 °C pakkaseen.

Proteiinin puhdistusprosessin eri vaiheista kerättiin SDS-PAGE -näytteitä, jotka ajettiin (200 V, 50 min) 12 % SDS-PAGE-geelillä (Liite 3 ja 4). Näytteitä vertailtiin standardiin (Broad Range, SDS-PAGE Standards, Bio-Rad). Proteiiniliuoksen puhtaus määritettiin ajamalla 2.5 µg, 5 µg ja 7.5 µg AKR1C3-proteiininäytteet elektrofooresilla. Geeli värjättiin Coomassie Brilliant R250 -väriaineella ja tausta puhdistettiin värinpoistoliuoksella (10 % etikkahappo, 20 % etanoli). AKR1C3-proteiinin puhtausaste määritettiin kvantitatiivisesti ImageJ -ohjelmistolla (National Institutes of Health, USA). Proteiinin puhtauden lisäksi tutkimusryhmän yhteistyökumppani Forendo Pharma Ltd (Turku) varmisti tuotetun AKR1C3-entsyymin aktiivisuuden. Yhteistyökumppanin käyttämä entsyymiaktiivisuuden mittaussuomenetelmä on yrityssalaisuus.

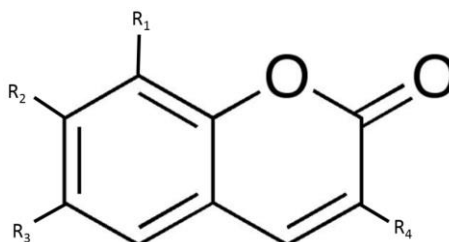
### 3.3 AKR1C3-entsyymin laskostumisen tutkiminen lämpötilariippuvaisella fluoresenssispektroskopiolla

#### 3.3.1 DMSO:n vaikutus AKR1C3 stabiiliuuteen

Lämpötilariippuvaisella fluoresenssispektroskopiolla (Thermofluor, *thermal shift assay*) testattiin, että AKR1C3-proteiini pysyy stabiilina ja kestää tulevat DMSO-käsittelyt. Testikonsentraatioina kokeiltiin viittä eri DMSO-pitoisuutta: 0.0 %, 2.5 %, 5.0 %, 7.5 % ja 10.0 %. Näytteet sisälsivät: 58  $\mu\text{M}$  AKR1C3-proteiinia, 22  $\mu\text{M}$  NADP (Acros organics, Lot AO337632), 5x Sypro-väriainetta (5000x SYPRO Orange protein gel stain in DMSO, Invitrogen, Lot 451399), 0-10.0 % DMSO:ta ja puskuria (5 % glyseroli, 1x PBS, 1 mM DTT, pH 7.4). Kullekin näytteelle valmistettiin myös taustaliuokset, joihin AKR1C3-proteiinia ja NADP:tä ei lisätty. Taustaliuoksissa proteiinin määrä korvattiin puskurilla. Näytteet jaettiin kaivoihin 25  $\mu\text{l}$ :n eriin 96-kuoppalevyille. Kuoppalevyyn ajettiin RT-PCR -laitteella (Bio-Rad CFX96 Touch) (reaaliaikainen, qPCR) lämpötilagradienttia 20–95 °C välein siten, että minuuttia kohti tapahtui 0.5 °C lisäys. Detektorin tulokset analysoitiin Microsoft Excel- (2013) ja Matlab (R2016b) -taulukkolaskentaohjelmilla. Kuvaajat muodostettiin näytteiden keskiarvojen ja taustaliuosten keskiarvojen erotuksen perusteella. Matlab-ohjelmalla data normalisoitiin välille 0-1. Kuvaajat koottiin normalisoidusta datasta. Esitystavan siistimisen vuoksi kaikki kuvaajat asemoitiin nolnaan 40 asteen kohdalla.

#### 3.3.2 Lääkeainekandidaattien vaikutus AKR1C3-entsyymin sulamislämpötilaan

Lämpötilariippuvaisella fluoresenssispektroskopiolla testattiin 64 erilaisen lääkeainekandidaatin (Prof. Olli Pentikäinen, Turun yliopisto) vaikutukset AKR1C3-entsyymin sulamislämpötilaan. Testattaville ligandeille oli yhteistä heterosyklinen kumariinirakenne. Tutkimuksessa testatut kumariinijohdannaiset ligandit erosivat toisistaan sivuketjujen (R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub>) osalta (Kuva 6). Kontrolliligandina käytettiin ASP9521-molekyyliä (Forendo Pharma Ltd, Turku).



Kuva 6. Kumariinijohdannainen ligandi. R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> kuvaavat testattujen kumariinijohdannaisten molekyylien sivuketjuja.

Näytteet sisälsivät 58  $\mu\text{M}$  AKR1C3-proteiinia (1.1 mM), 22  $\mu\text{M}$  NADP:tä, dialyysipuskuria (5 % glyseroli, 1x PBS, 1 mM DTT, pH 7.4), 5x Sypro-väriainetta (Invitrogen) ja 100  $\mu\text{M}$  ligandia (Kuva 6). Lisäksi jokaista näytettä varten valmistettiin taustaliuokset. Sama mittaus toistettiin kolmesti. Tulokset analysoitiin Excel- (2013) sekä Matlab (R2016b) -taulukkolaskentaohjelmien avulla. Matlab-ohjelmalla data normalisoitiin välille 0-1. Normalisoidusta datasta luettiin  $\Delta T_m$ -arvot ja muodostettiin kuvaajat. Esitystavan siistimisen vuoksi kaikki kuvaajat asemoitiin nolnaan 40 asteen kohdalla. Kuvaajien x-akselille asetettiin lämpötila välille 40–65 °C ja y-akselille FRET-arvo (A.U.).

### 3.4 Kiteyttäminen

#### 3.4.1 AKR1C3-proteiinin kiteytysolosuhteen etsiminen ja optimointi

Ensimmäiset kiteytyskokeet tehtiin kaupallisilla kiteytyssarjoilla: JSG-plus HT-96 (Molecular Dimensions, MD1-40), Wizard-classic 1 & 2 HT96 (Rigaku, Lot 1002-128) ja Proplex HT-96 (Molecular Dimension, MD1-42). Kaupallisten kiteytyssarjojen kaivoliuos siirrettiin multikanavapipetillä 96-kuoppalevyille kiteytysrobottiin (TTP LabTech Mosquito). Robotti valmisti automatisoidusti kiteytyslevyn jakamalla 96-kuoppalevyille AKR1C3-NADP-proteiinin (587  $\mu\text{M}$  AKR1C3, 2 mM NADP Acros Organics). AKR1C3-proteiini tasapainoitettiin puskuriin (10 mM KPi, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4) ennen kiteytyskoetta. Toisessa kiteytyskokeessa käytettiin tohtoriopiskelija Chandan Thapan

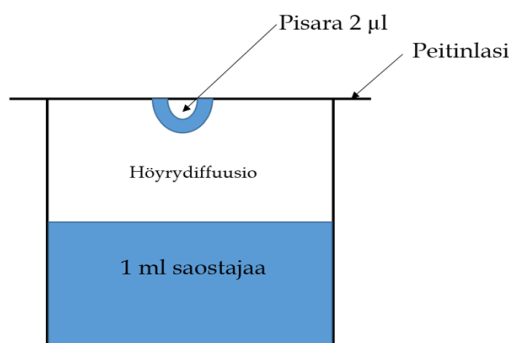
suunnittelemaa kiteytyssarjaa (Taulukko 2) ja riippuva pisara -menetelmää (*hanging drop*). Pisara sisälsi 1:1 AKR1C3-NADP -proteiinia ja kaivoliuosta.

Taulukko 2. Kiteytysolosuhdesarja AKR1C3-proteiinille.

Kiteytysolosuhteet		
Olosuhteet 1	Olosuhteet 2	Olosuhteet 3
0.1 M HEPES pH 6.5	0.1 M Natrium- sitraatti pH 5.5	0.1 M Natrium- asettaatti pH 6.0
0.2 M Ammonium dihydrogen- fosfaatti	0.4 M Ammonium- asettaatti	0.2-0.8 M Ammonium- asettaatti
	2.5 % 2-methyl-2.4- pentadioli	2.5 % 2-methyl-2.4- pentadioli
20-25 % PEG3350	20-25 % PEG4000	25 % PEG4000

### 3.4.2 Kiteiden tuottaminen

Kaupallisen Proplex-kiteytyssarjan olosuhde (24 % PEG4000, 0.1 M kakodyylihappo, pH 6.5) optimoitiin AKR1C3-proteiinin kiteytymiseen sopivaksi kokeilemalla erilaisia polyetyleeniglykoleja ja säätämällä polyetyleeniglykolipitoisuutta. AKR1C3-kiteitä tuotettiin klassisella riippuva pisara -menetelmällä (Kuva 7). Kiteyttäminen tehtiin huoneenlämmössä.



Kuva 7. Riippuva pisara -menetelmä (mukaillen Rupp B. 2010).

### 3.4.3 Kompleksikiteen rakentaminen

Kompleksikiteen rakentamisessa käytettiin yhteiskiteytystä (*co-crystallization*) (22 mg/ml AKR1C3, 2 mM NADP, 1.5 mM ligandi) sekä liuotuskoetta (*soaking*). Liuotuskokeessa kide siirrettiin ligandia sisältävään pisaraan (0.11 M NaCood, 44 % PEG 3350, 90  $\mu$ M ligandia). Kaivoliuoksena käytettiin: 40 % PEG3350, 10 % DMSO, 0.1 M kakodyylihapo, pH 6.5. Ligandi diffundoitui 1–2 vuorokautta ennen kuin muodostuneet kompleksikiteet nostettiin silmukan avulla pakkassuojaliuokseen (10 % glyseroli, 39.6 % PEG3350, 0.09 M kakodyylihapo; pH 6.5) ja nestetyyppeen säilytykseen.

Tutkimuksessa kiteiden kokoa kokeiltiin kasvattaa mikrosemennyksellä (*microseeding*). Menetelmässä kiteet murskattiin ja kidemurska pyyhkäistiin kissanviiksellä peitinlasille tehtyihin pisaroihin (saostaja: 32 % PEG3350, 0.1 M kakodyylihapo, pH 6.5 ja AKR1C3-NADP: 587–540  $\mu$ M AKR1C3, 2 mM NADP).

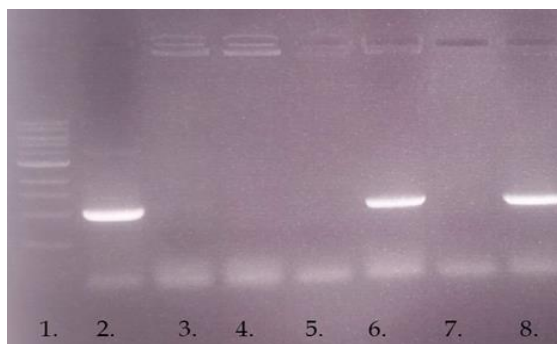
## 3.5 Röntgenkristallografia

Proteiinikiteiden röntgensironta määritettiin synkrotronilla Euroopan Synktronilaitoksessa (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, Ranska) käyttäen automaattista MASSIF-1 datan keräys- ja prosessointijärjestelmää. Mittaus tehtiin 0.966 Å aallonpituudella.

## 4 TULOKSET

### 4.1 AKR1C3-geenin kloonaukseen tuottovektoriin

Tutkimuksen alussa pUC57::*hAKR1C3* -plasmidi (GenScript) ja pGEX4T3-vektori digestoitettiin, jotta tutkittava *hAKR1C3*-insertti (982 bp) voitiin liittää pGEX4T3-vektoriin (4968 bp). Digestoidut tuotteet kiinnitettiin toisiinsa ligaasientsyymillä. Pesäke-PCR:n avulla paikannettiin pGEX4T3::*AKR1C3*-plasmidia sisältävät *E. coli* -bakteeripesäkkeet (Kuva 8).



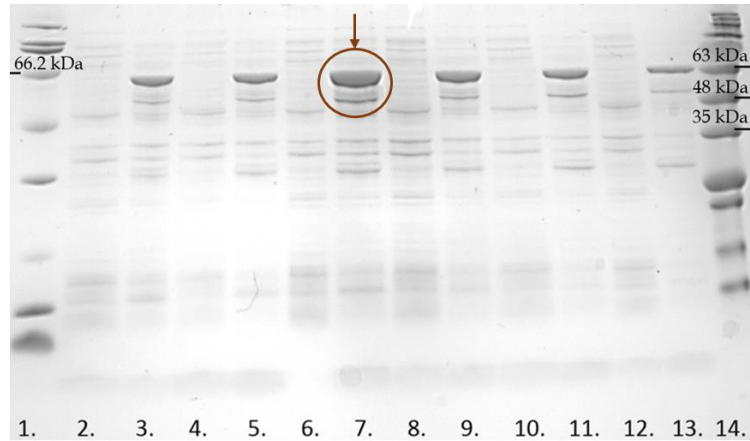
Kuva 8. Pesäke-PCR -tuotteet. Kaivossa: 1. 1 kb DNA- standardi (New England Biolabs) ja kaivoissa: 2., 6., 8. pGEX4T3::*AKR1C3*-plasmidin sisältävät *E. coli* -bakteerit.

*AKR1C3*-geenin sekvenssi varmistettiin oikeaksi sekvensoinnilla. Sekvensointitulokset osoittivat, että tuotetun yhdistelmä-DNA-plasmidin *AKR1C3*-geenin nukleotidit olivat 98 % identtisiä tunnetun *AKR1C3*-geenin nukleotidijärjestyksen kanssa.

### 4.2 Tuotto-olosuhteiden optimointi

Proteiinia tuotettiin kolmessa eri kasvatusliuoksessa: LB, TB ja M9ZB. 37 °C sekä 30 °C kasvatuksissa käytettiin 3.5 h induktioaikaa, ja 20 °C kasvatuksissa 20 h induktioaikaa. *AKR1C3*-proteiinia tuottui eniten TB-kasvatusliuoksessa 30 °C lämpötilassa 3.5 tunnin kasvatuksella. Toiseksi parhaiten *AKR1C3*-proteiinia tuottui M9ZB-kasvatusliuoksessa 30 °C lämpötilassa 3.5 tunnin kasvatuksella. Fuusioproteiinin massa on 63 kDa, ja tällä kohdalla havaitaan vyöhyke SDS-PAGE

-geelissä (Kuva 9). Tutkimuksen aikana LB-bakteeriviljelmät jouduttiin hylkäämään solujen huonon kasvun takia.



Kuva 9. Eri olosuhteissa tuotettujen AKR1C3-proteiinien SDS-PAGE -näytteet. Kaivoissa: 1. Standardi (Broad-Range, SDS-PAGE Standards, Bio-Rad), 2. TB 37 °C ennen indusointia, 3. TB 37 °C indusoinnin jälkeen, 4. M9ZB 37 °C ennen indusointia, 5. M9ZB 37°C indusoinnin jälkeen, 6. TB 30 °C ennen indusointia, 7. **TB 30 °C indusoinnin jälkeen**, 8. M9ZB 30 °C ennen indusointia, 9. M9ZB 30 °C indusoinnin jälkeen, 10. TB 20 °C ennen indusointia, 11. TB 20 °C indusoinnin jälkeen, 12. M9ZB 20 °C ennen indusointia, 13. M9ZB 20 °C indusoinnin jälkeen, 14. Standardi (BlueStar Plus Prestained Protein Marker, Nippon Genetics Europe GmbH). Nuolen osoittamassa kohdassa olosuhde, jossa AKR1C3-proteiinia tuottui eniten.

Solujen optimaalinen kasvu varmistettiin mittaamalla kasvatusliuoksista pH:t ennen proteiinituotannon käynnistämistä. Lisäksi pH-arvot mitattiin kasvatuksen lopussa. Kaikista korkein pH kasvatuksien alussa oli TB-kasvatusliuoksessa ja matalin LB-kasvatusliuoksessa. M9ZB-kasvatusliuoksen pH laski kasvatuksen edetessä 0.2 yksikköä ja TB-kasvatusliuoksen pH-arvo nousi 0.2 yksikköä (Taulukko 4).

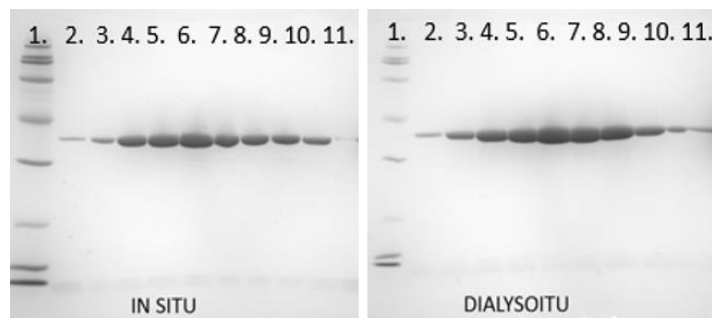
Taulukko 4. Kasvatusliuoksien pH:t kasvatuksien alussa ja lopussa.

pH	Kasvatusliuos		
	LB	TB	M9ZB
alussa	6.9	7.1	6.1
lopussa	-	7.3	5.9

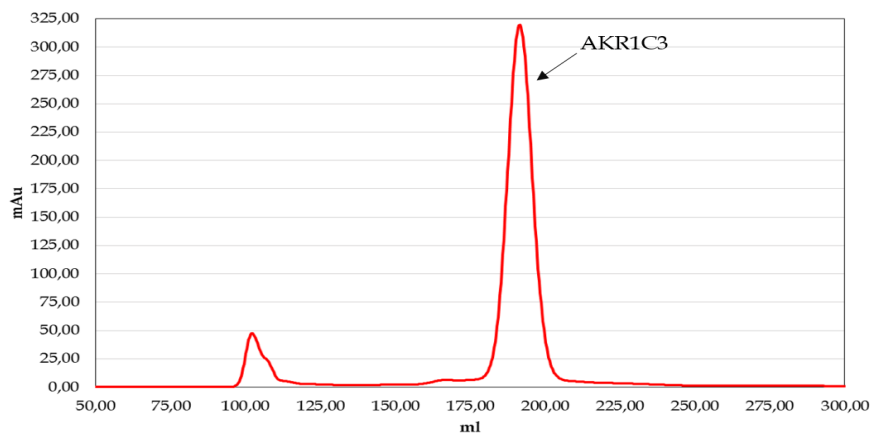


### 4.3 Puhdistusolosuhde

Jatkotutkimuksia varten AKR1C3-entsyymi oli puhdistettava, jotta sitä pystyttiin käyttämään kiteyttämässä sekä lämpötilariippuvaisessa fluoresenssispektroskopisessa tutkimuksessa. Puhdistusolosuhteiden optimointia varten AKR1C3-proteiinia tuotettiin 1 l TB-kasvatusliuoksessa, jossa syntyi 11 g solumassaa. AKR1C3-proteiinin kokonaissaanto 0.5 l tuotossa oli 11.9 mg ja *in situ*-leikatun AKR1C3-proteiinin 8.9 mg. AKR1C3-proteiinin saanto oli dialyysin jälkeen 33.7 % parempi kuin *in situ*-katkaisun jälkeen. Kvantitatiivisella proteiinin määrittelyllä AKR1C3-proteiinin puhtausasteeksi saatiin 96.5 %. Lisäksi proteiinin puhtaus varmistettiin SDS-PAGE -geelillä (Kuva 10) ja kromatografialla (Kuva 11).



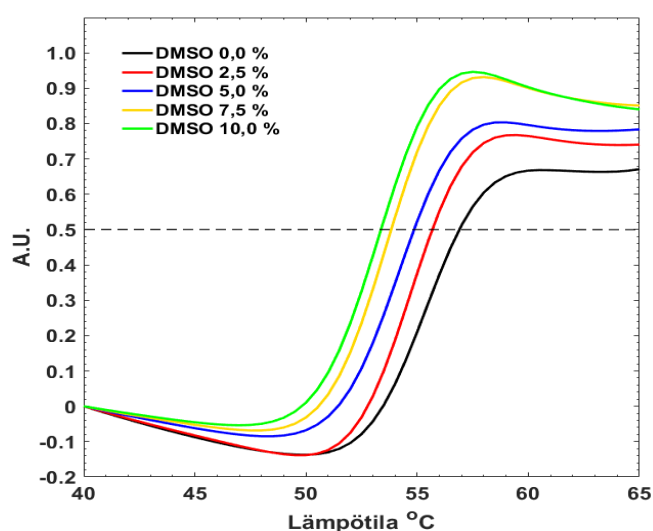
Kuva 10. Geelisuodatetut AKR1C3-SDS-PAGE - näytteet. Kaivoissa 1. Broad-Range -molekyylistandardi (Bio-Rad) ja kaivoissa 2.-11. geelisuodatetut AKR1C3-fraktiot.



Kuva 11. AKR1C3-entsyymin kromatogrammi. Geelisuodatetun AKR1C3-proteiinin yksi symmetrinen piikki osoittaa, että AKR1C3-proteiini muodostaa yhdenlaisen oligomeerin. Pylvään vasemmanpuoleinen piikki kuvaa vapaata tilavuutta (engl. *void volume*).

#### 4.4 Lämpötilariippuvainen fluoresenssispektroskopia

Tuotettua AKR1C3-proteiinia käytettiin lääkeainevuorovaikutuksien tutkimiseen lämpötilariippuvaisella fluoresenssispektroskopiolla ja kiteyttämisessä. Ennen varsinaisia lääkeainevuorovaikutuksien testaamista piti varmistaa AKR1C3-proteiinin stabiilius eri DMSO-pitoisuuksissa. Kuvasta 12 havaitaan, että DMSO-pitoisuuden kasvaessa sulamiskäyrän muoto pysyy samana. Näin ollen AKR1C3-proteiini pysyy stabiilina eri DMSO-pitoisuuksissa.

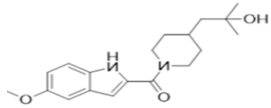
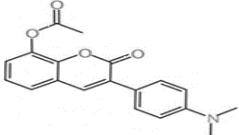
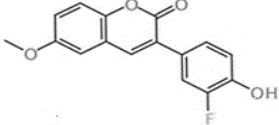
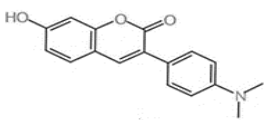
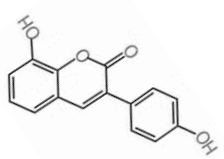
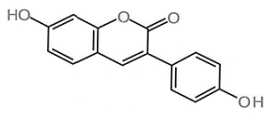
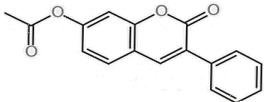


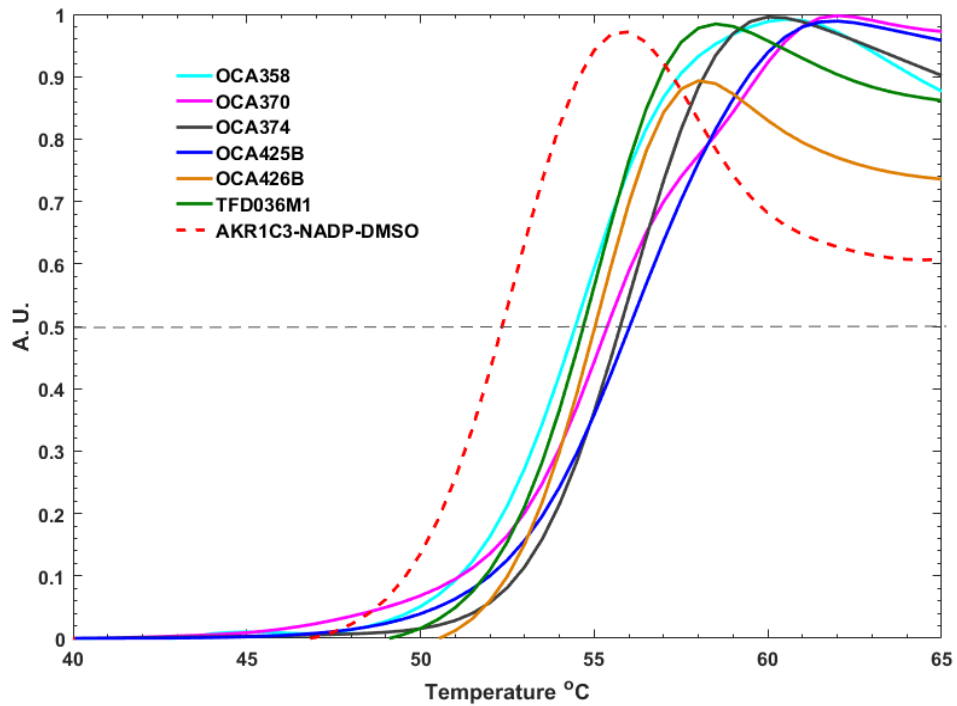
Kuva 12. AKR1C3-proteiinin sulamiskäyrät eri DMSO-pitoisuuksissa.

Kun AKR1C3-proteiini oli osoitettu stabiiliksi eri DMSO-pitoisuuksissa (Kuva 12), tutkimuksissa edettiin selvittämään lääkeainekandidaattien vaikutuksia AKR1C3-entsyymiin lämpötilariippuvaisella fluoresenssispektroskopiolla. 64 testatusta molekyylistä löytyi 6 molekyyliä, jotka vaikuttivat AKR1C3-entsyymiin  $\Delta T_m$ -arvoon  $\geq 2.5$  °C. Kontrollinäytteenä käytettiin AKR1C3-NADP-DMSO -näytettä, jonka sulamislämpötila oli 52 °C. Puhtaan AKR1C3-entsyymiin sulamislämpötila oli 50 °C. Kontrolliligandina käytettiin ASP9521-molekyyliä (Forendo Pharma Ltd), joka oli aikaisimmassa tutkimuksissa osoitettu sitoutuvan AKR1C3-entsyymiin. ASP9521 on tunnettu AKR1C3-entsyymiin inhibiittori, jota on testattu myös eturauhassyöpöpotilailla (Loriot ym. 2014). ASP9521-molekyylin ongelmana kuitenkin on aineen aiheuttama oma fluoresenssi. Tässä tutkimuksessa ASP9521-

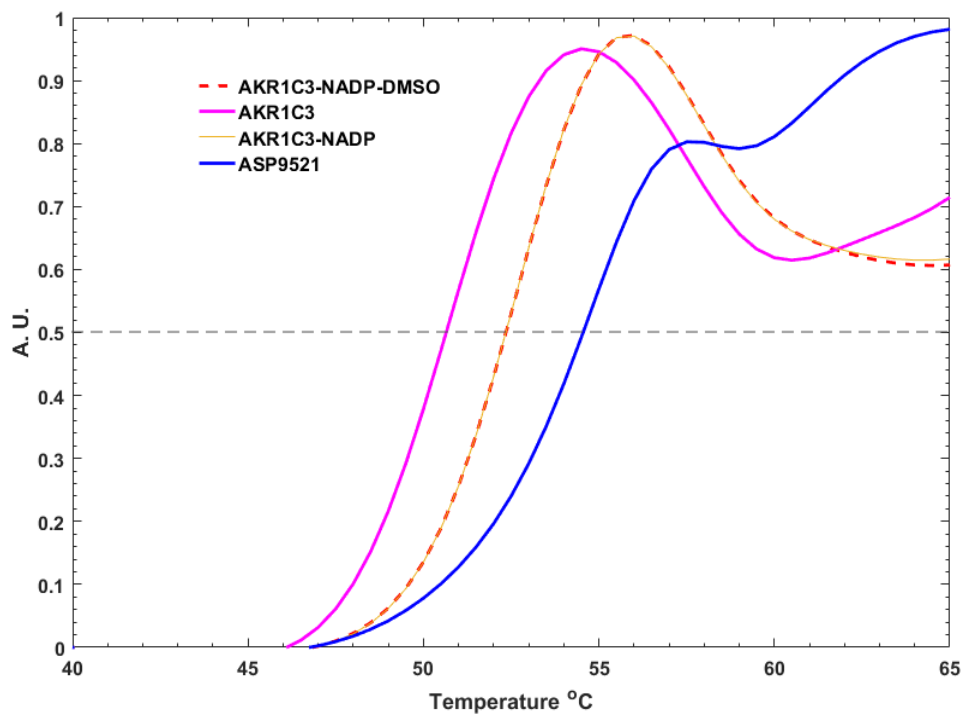
molekyylin  $\Delta T_m$ -arvon osoitettiin olevan 2.5 °C (Taulukko 5, Kuva 13 ja 14). Lisäksi testatuista molekyyleistä löytyi 2 kumariinijohdannaista ligandia, jotka laskivat AKR1C3-entsyymin  $\Delta T_m$ -arvoa < 0 °C (Taulukko 6 ja Kuva 15). Näillä molekyyleillä on haitallisia vaikutuksia AKR1C3-entsyymin rakenteelle.

Taulukko 5. Ligandit, jotka nostavat AKR1C3-entsyymin  $\Delta T_m$ -arvoa ( $\geq 2.5$  °C).

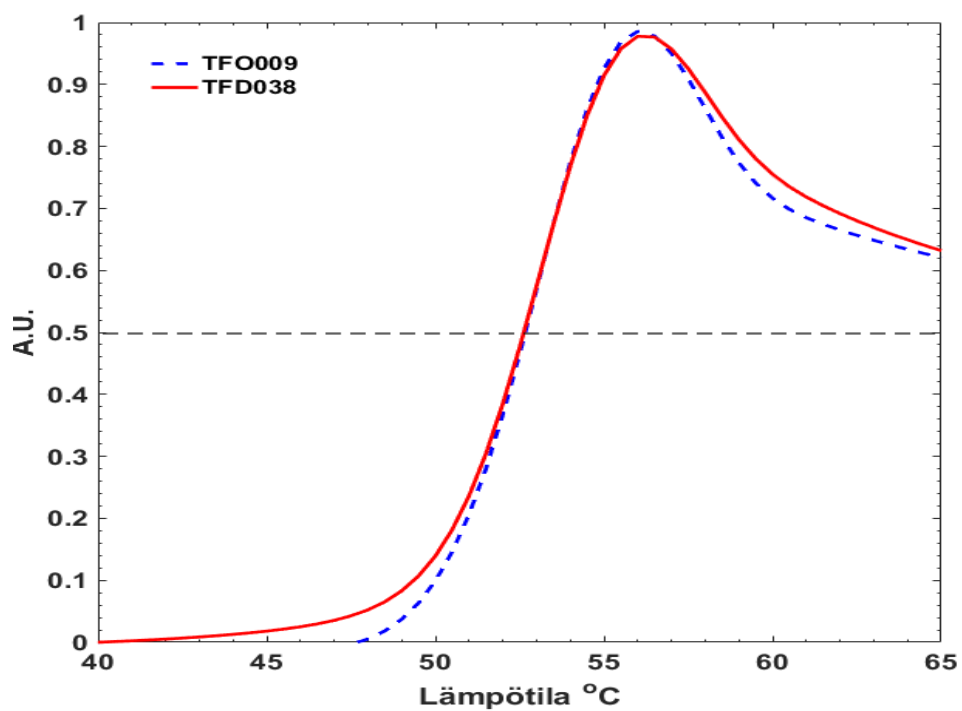
Lämpötilariippuvainen fluoresenssispektroskopia			
Ligandi	Molekyylirakenne	$T_m$ -arvo	$\Delta T_m$ -arvo
ASP9521		54.5	2.5
OCA358		54.5	2.5
OCA370		55.5	3.5
OCA374		55.5	3.5
OCA425B		56	4
OCA426B		54.5	2.5
TFD036M1		54.5	2.5



Kuva 13. AKR1C3-ligandien sulamiskäyrät, joiden  $\Delta T_m$ -arvo on  $\geq 2.5$  °C.

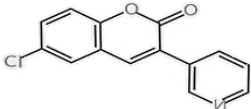
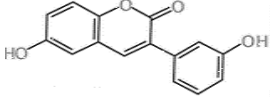


Kuva 14. Tutkimuksessa käytettyjen kontrollien sulamiskäyrät.



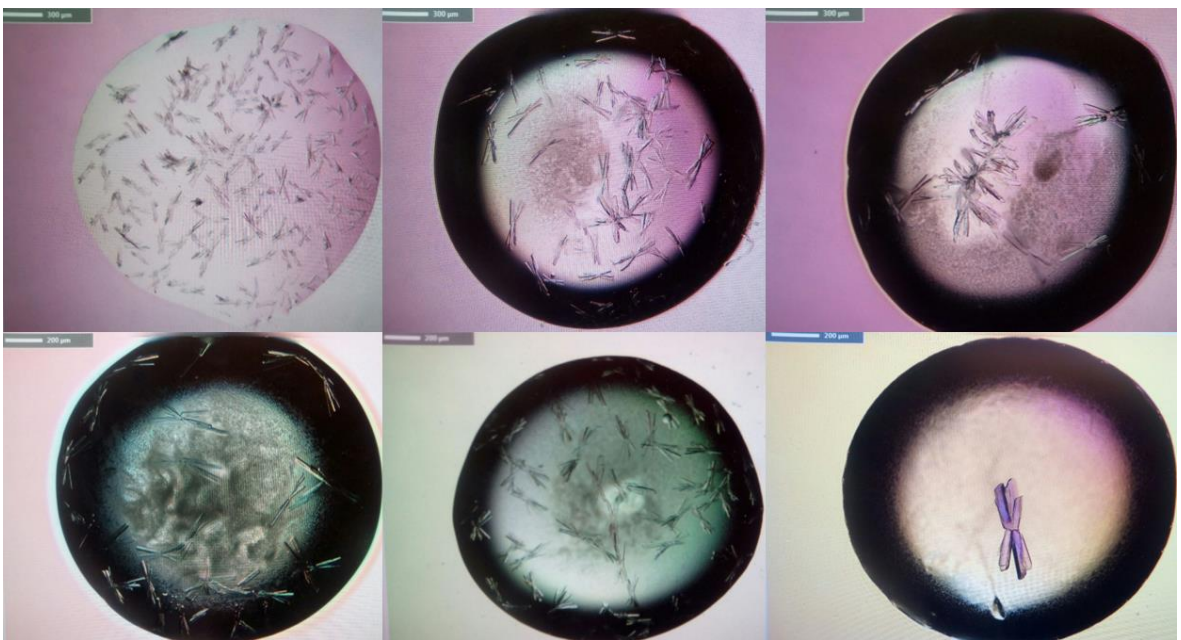
Kuva 15. AKR1C3-ligandien sulamiskäyrät, joiden  $\Delta T_m$ -arvo  $< 0$  °C.

Taulukko 6. Ligandit, jotka vaikuttavat negatiivisesti AKR1C3-entsyymien  $\Delta T_m$ -arvoon.

Lämpötilariippuvainen fluoresenssispektroskopia			
Ligandi	Molekyyli rakenne	$T_m$ -arvo	$\Delta T_m$ -arvo
TFO009		45	-7
TFD038		51	-1

#### 4.5 AKR1C3-proteiinin kiteytys

AKR1C3-proteiini kiteytyi, kun kaivoliuoksena käytettiin: 30–32 % PEG3350 (Sigma-Aldrich, Lot BCBP4085V), 0.1 M kakodyylihappo (Agar Scientific, R1104), pH 6.5. Syntyneet kiteet olivat keskiarvomitoiltaan 190  $\mu\text{m}$  pitkiä, 35  $\mu\text{m}$  leveitä ja 20  $\mu\text{m}$  paksuja (Kuva 16). Kiteytyminen tapahtui viiden vuorokauden aikana. Tutkimuksessa testattiin myös Taulukon 2 kiteytysolosuhdesarja, mutta niillä kiteytysolosuhteilla AKR1C3-kiteitä ei muodostunut.



Kuva 16. AKR1C3-kiteitä kiteytymisen loppuvaiheista. Kiteet kuvattiin ja mitattiin kuvantamislaitteella (Formulatrix Rock Imager 54).

Riippuva pisara -menetelmällä syntyneitä AKR1C3-NADP -kiteitä käytettiin liuotuskokeessa kompleksikiteiden rakentamiseen. Kiteet pysyivät ehjinä suoritettujen kokeiden ajan. Ligandin vaikutuksesta kiteiden väri muuttui keltaisen eri sävyihin. 20 liuotuskäsiteltyä kiteä säilöttiin nestetyyppien odottamaan röntgenkristallografista tutkimusta.

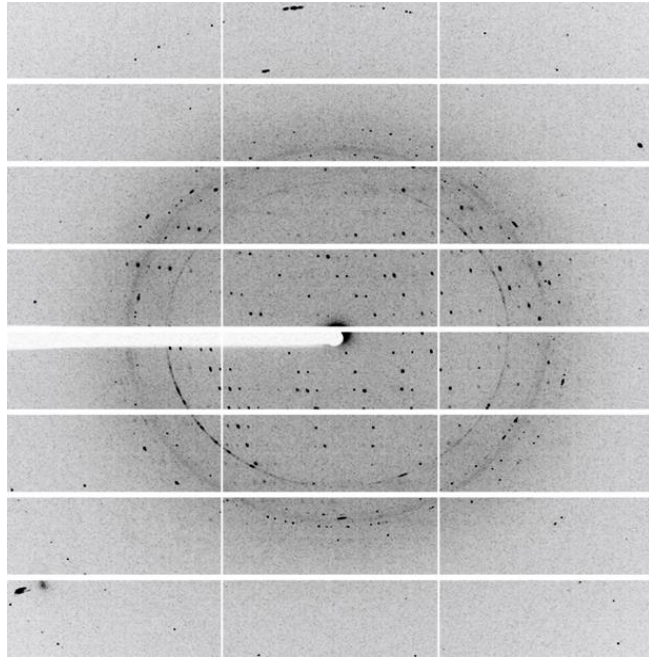
Myös yhteiskiteytymenettelmällä onnistuttiin muodostamaan hentorakenteisia, merisiilen muotoisia kiteitä. Näitä kiteitä hyödynnettiin mikrosiemennyskokeessa, jonka seurauksena AKR1C3-kiteiden kokoa saatiin kasvatettua  $\sim 1,5$  -kertaiseksi riippuva pisara -menetelmällä syntyneisiin kiteisiin verrattuna.

#### 4.6 Kiteiden diffraktion määrittäminen

20 kompleksikiteestä neljä diffraktoi röntgenkristallografisessa (MASSIF-1, ESRF) tutkimuksessa. AKR1C3-kiteet, joihin oli mahdollisesti kiinnittyneenä TFD036M1- sekä OCA370-ligandit diffraktoivat erittäin hyvin (2.2–2.5 Å). Heikompaa diffraktiota havaittiin AKR1C3-OCA358- ja AKR1C3-ASP9521 -kiteissä (3–4 Å) (Taulukko 7 ja Kuva 17). Valitettavasti automaattisen prosessoinnin tuloksista ei voida suoraan nähdä ligandin kiinnittymistä kiteeseen.

Taulukko 7. Automaattiprosessoinnin tuloksia.

Röntgenkristallografia, kiteiden alustava karakterisointi				
Kide ja ligandi	Symmetria	Alkeiskopin sivujen pituudet a, b, c (Å)	Alkeiskopin kulmat $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	Datasetin resoluutio (Å)
AKR1C3 ja OCA370	P1	39.25	76.94	38.13–2.42
		50.85	85.30	
		77.32	76.38	
AKR1C3 ja ASP9521	P1	39.89	77.21	49.82–2.99
		52.27	85.65	
		76.73	77.14	
AKR1C3 ja TFD036M1	P1	39.84	77.11	100.0–2.16
		52.15	86.62	
		77.08	77.99	
AKR1C3 ja OCA358	P1	37.51	76.80	100.0–3.95
		50.02	83.38	
		76.35	75.00	



Kuva 17. AKR1C3-OCA370 -kiteen diffraktio.



## 5 TULOSTEN TARKASTELU

### 5.1 *AKR1C3*-geenin kloonaminen

Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla onnistuttiin kloonamaan *AKR1C3*-geeni haluttuun pGEX4T3-vektoriin. Varsinkin eukaryoottisolujen kromosomaalisia geenejä on vaikea kloonata, koska eukaryoottien intronialueet ovat monta kertaa pidempiä kuin varsinaiset koodaavat eksonialueet (Nelson ja Cox 2005). Introneista on usein haittaa, kun halutaan ilmentää tiettyä geeniä vieraassa isännässä. Eivätkä yhdistelmä-DNA-tekniikassa työkaluina käytetyt bakteerit osaa poistaa introneita, koska niillä intronialueita ei ole (Ollila ja Suominen 2003).

Tavallisesti geenin etsintä alkaa, kun koe-eliön perimästä tehdään DNA- tai cDNA-kirjasto (*complementary DNA*) (Nelson ja Cox 2005). Kun tutkittava eliö on eukaryootti, rakennetaan usein cDNA-kirjastoja (Ollila ja Suominen 2003). Tässä tutkimuksessa DNA-kirjaston seulontaa ei tarvinnut tehdä, koska tutkimuksessa käytettiin kaupallista *E. coli* -bakteeriin suunniteltua pUC57::*hAKR1C3* -plasmidia (GenScript). Plasmidin sisään oli kiinnitetty synteettinen *AKR1C3*-geeni, jonka kodoni oli translaation helpottamiseksi optimoitu vastaamaan *E. coli* -bakteerin kodonijakaumaa. *AKR1C3*-geenin vektoriksi valittiin plasmidi, joka kykenee yhdistelmä-DNA-plasmidin muodostumisen jälkeen replikoitumaan hyvin tunnetussa, hallittavissa olevassa *E. coli* -isäntäsolussa.

Toimivien ekspressioon kykenevien komponenttien kokoaminen olisi ollut aikaa vievää, joten tutkimuksessa käytettiin pGEX4T3-vektoria, jossa oli oikea lukukehys ja tarvittavat osat valmiina. Vektorin valinnassa kiinnitettiin huomiota siihen, että plasmidi sisälsi replikaation aloitus- eli ori-alueen, selektiogeenin (antibioottiresistenssigeeni), tunnistuskohdan restriktioentsyymille (*NotI* ja *NcoI*) sekä voimakkaan promoottori- ja transkription lopetusalueen. Plasmidivektorin täytyi olla myös mahdollisimman pieni (< 5 kb), jotta liitettävälle vieraalle DNA:lle jäisi mahdollisimman paljon tilaa (Ollila ja Suominen 2003).

Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla tutkittava *AKR1C3*-geeni voitiin eristää ja siirtää sopivaan vektoriin. Digestion tarkoituksena oli irrottaa insertti vektorista ja määrittää eristetyn DNA:n pituus agarosigeeli-elektroforeesilla. Restriktioentsyymit tunnistivat spesifisen nukleotidijärjestyksen DNA:ssa, joka on yleensä 4–8 nukleotidiparin pituinen. Ligaatiossa suljettiin DNA-ligaasientsyymien avulla DNA:n kohessiiviset päät siten, että DNA-jaksojen välille syntyi fosforisidos (Ollila & Suominen 2003). Syntyneellä ligaatioseoksella transformoitiin isäntäsolut ja pesäke-PCR:llä paikannettiin *AKR1C3*-geenin sisältävät solut. Lopuksi sekvensoinnilla varmistettiin *AKR1C3*-geeni oikeaksi. Tämän jälkeen voitiin aloittaa proteiinisynteesi.

## 5.2 *AKR1C3*-proteiinin tuottaminen *E. coli* -bakteerissa ja puhdistus

Onnistuneiden sekvensointituloksien perusteella voitiin olettaa, että *AKR1C3*-geeni ilmenee ainakin lähetti-RNA:n tasolla ja oikeiden olosuhteiden löydyttyä translaatio on myös mahdollinen. Tässä tutkimuksessa osoitettiin, että *AKR1C3*-proteiini tuottuu parhaiten TB-kasvatusliuoksessa, 30 lämpötilassa 3.5 h induktioajalla. Puhtainta *AKR1C3*-entsyymiä saatiin käyttämällä proteiinin puhdistuksessa affiniteettikromatografiaa, dialyysiä ja geelisuodatusta.

Sopiva *AKR1C3*-proteiinin tuotto-olosuhde löydettiin kokeilemalla erilaisia kasvatusliuoksia, lämpötiloja sekä induktioaikoja. Kasvatusliuoksien valinta tehtiin aikaisempien tutkimuksien perusteella (Hellwig ym. 2005, Kram ja Finkel 2015, Studier W. 2005). LB-kasvatusliuos on testatuista kasvatusliuoksista yleisin ja tunnetusti hyvin toimiva varsinkin *E. coli*en kasvatuksessa (Hellwig ym. 2005). LB-kasvatusliuoksessa hiilen lähteenä oli 1 % glukoosi ja proteiinin lähteenä tryptoni, joka on kaseiinin hydrolysaattia (<http://dictionary.sensagent.com/tryptone/en-en>). Tryptonia oli LB-kasvatusliuoksessa yhtä litraa kohden 10 g, kun taas TB-kasvatusliuoksessa sitä oli 12 g. TB-kasvatusliuoksessa hiilen lähteenä toimi 0.5 % glyseroli ja hiivauutetta oli 4.8-kertainen määrä LB-kasvatusliuokseen verrattuna.

Testatuista kasvatusliuoksista TB-kasvatusliuos osoittautui parhaimmaksi kasvatusliuokseksi AKR1C3-proteiinin tuottamiselle. Tulos oli yllättävä, koska M9ZB-kasvatusliuos sisälsi TB-kasvatusliuokseen verrattuna huomattavasti suuremman määrän solujen kasvulle tarvittavia mineraaleja. Studier W. (2005) mukaan solut kasvavat tyypillisesti jopa 2-3 kertaa nopeammin runsaasti mineraalia sisältävässä kasvatusliuoksessa.

Kasvatusliuoksissa kaikista korkein pH oli TB-kasvatusliuoksessa (pH 7.14) ja matalin M9ZB-kasvatusliuoksessa (pH 6.12). pH oli korkein TB-kasvatusliuoksessa, koska se sisälsi alkalisointia ehkäisevää kaliumfosfaattipuskuria. Puskurin ansiosta pH pysyi kasvatuksen aikana tasaisempana pidempään (Kram ja Finkel 2015). Hellwig ym. (2005) mukaan TB-kasvatusliuoksen korkeampi pH johtaa korkeampaan solumassan tuotantoon. Muissa testatuissa kasvatusliuoksissa ei ollut puskuria, minkä seurauksena LB- ja M9ZB -kasvatusliuoksissa saattoi tapahtua nopeammin alkalisointia kasvatuksen edetessä. M9ZB-kasvatusliuoksessa havaittiin pienä pH:n laskua.

LB-kasvatusliuoksen pH (6.94) oli kasvatuksen alussa lähimpänä TB-kasvatusliuosta. pGEX4T3::AKR1C3-plasmidin sisältäneet *E. coli* -bakteerit eivät kasvaneet ollenkaan LB-kasvatusliuoksessa, vaikka LB-kasvatusliuosta käytetään yleisesti *E. coli* -bakteerien kasvatuksissa. Huono kasvu johtui mahdollisesti LB-kasvatusliuoksen toksisuudesta tai liian vähäisestä hiivauutteen määrästä TB-kasvatusliuokseen verrattuna. Tutkimuksessa ei nähty tarpeelliseksi tutkia LB-kasvatuksen epäonnistumista, koska kahdessa muussa kasvatusliuoksessa tuottotasot olivat korkeita.

Sopivan kasvatusliuoksien lisäksi oltiin kiinnostuneita lämpötilasta sekä induktioajasta. Tuloksista voitiin päätellä, että 37 °C on liian kuuma ja 20 °C liian kylmä AKR1C3-proteiinin tuotolle. Oletettavasti solujen kokema stressi kasvaa näissä lämpötiloissa liian suureksi. Matalaa kasvatuslämpötilaa (15 °C - + 21 °C) hyödynnetään erityisesti silloin, kun halutaan vähentää solujen metabolista stressiä

ja kun tiedetään, että yhdistelmä-DNA-plasmidissa on voimakas promoottori. Matalampaa kasvatuslämpötilaa käytettäessä proteiinin tuotto pystytään maksimoimaan pidentämällä induktioaikaa, joka vaihtelee kunkin proteiinin käytetyn yhdistelmä-DNA-plasmidin mukaan. Yleisesti induktioajat ovat vaihdelleet 4 tunnista 40 tuntiin (Hellwig ym. 2005).

Tutkimuksen optimointivaiheessa esille tulleita tuotto- ja puhdistusolosuhteita pystytään käyttämään AKR1C3-proteiinin tuottokasvatuksessa. Suuremman mittakaavan tuotossa voidaan suosia matalampaa lämpötilaa ja pitempää induktioaikaa. Matalammassa lämpötilassa ja pidemmällä induktioajalla tuottotaso laskee, mutta soluille jää enemmän aikaa jakautumiseen ja proteiinin laskostumiseen. Lisäksi suuremman mittakaavan tuoton jokaisessa työvaiheessa on lisäksi huomioitava, että suurien tilavuuksien takia työvaiheet ovat aikaavieviä ja reagensseja kuluu enemmän kuin optimointivaiheessa. Tuottokasvatuksessa on käytettävä tilavuuksiin nähden sopivia kromatografiapylväitä sekä Erlenmeyer- ja sentrifuugipulloja.

### 5.3 AKR1C3-entsyymin lääkeainevuorovaikutukset

Lämpötilariippuvainen fluoresenssispektroskopia perustuu siihen, että useat proteiinit sisältävät ligandin sitoutumista varten korkeaenergisia kohtia. Kun ligandi sitoutuu proteiiniin,  $\Delta T_m$ -arvo muuttuu sitoutuneesta yhdisteestä riippuen. Negatiivinen sulamislämpötila-arvon muutos kertoo, että yhdisteellä on haitallisia vaikutuksia natiivin proteiinin stabiiliudelle. Tällaiset yhdisteet siirtävät tasapainoa oikealle, jolloin  $T_m$ -arvo laskee. Kun  $T_m$ -arvo laskee tarpeeksi, proteiini denaturoituu. Useimmiten lääkeainesuunnittelussa ollaan kiinnostuneita yhdisteistä, jotka ovat mieluiten vuorovaikutuksessa natiivin proteiinin kanssa. Tällaiset yhdisteet lisäävät proteiinin lämpökestävyyttä ja siirtävät tasapainoa vasemmalle nostamalla  $T_m$ -arvoa. Menetelmää käytetään yleisesti proteiinien stabiilisuuden ja ligandin sitoutumisen tutkimiseen. Lämpötilariippuvaista fluoresenssispektroskopia sopii lääkeaineiden suunnitteluun, koska sen avulla

pystytään nopeasti seulomaan suuri määrä mahdollisia lääkeainekandidaatteja ja tutkimaan niiden affiniteettia proteiiniin (Pantoliano ym. 2001, Lo ym. 2004, Niesen ym. 2007).

Tutkimuksessa testatut lääkeainekandidaatit ovat kumariineja, jotka kuuluvat bentsopyronin perheeseen. Kumariini koostuu bentseenirenkaasta ja siihen kiinnittyneestä pyronirenkaasta. Kumariinit luokitellaan myös polyfenolisiin yhdisteisiin, joita löytyy useista kasvikunnan tuotteista (Rohini ja Srikumar 2014). Erilaisia kumariinijohdannaisia yhdisteitä pystytään rakentamaan helposti orgaanisen kemian menetelmillä, esimerkiksi syntetisoimalla fenoli ja etyyliasetoasetatti toisiinsa (Bairagi ym. 2012).

Kumariineista on kehitetty kliiniseen käyttöön useita tunnettuja lääkeaineita. Lääkeainesuunnittelussa on aina viisainta lähteä liikkeelle olemassa olevista, ihmiselimistössä toimivista lääkeaineista. Tunnetuimpiin kumariinijohdannaisiin lääkeaineisiin kuuluu verenhennuslääke varfariini, jonka vaikutus perustuu kumariinin kykyyn toimia K-vitamiinin inhibiittorina (Bairagi ym. 2012). Lisäksi kumariineilla on havaittu olevan sytotoksisia vaikutuksia tiettyjä syöpäsoluja vastaan (Taulukko 8) (Srikumar ja Rohini 2014).

Taulukko 8. Kumariinien terapeuttisia vaikutuksia (mukaillen Rohini ja Srikumar 2014).

Kumariini	Terapeuttinen vaikutus
Varfariini 4-hydroksikumariini	Pahanlaatuisen syöpä
Pyranokumariinit	Munuaissyöpä ja rintasyöpä
Bentsopyronit	Rintasyöpä
Varfariini	Verenhennus

Kumariinijohdannaisten lääkeaineiden on osoitettu tehoavan moneen erilaiseen sairauteen ja elimistö sietää niitä hyvin (Taulukko 8) (Srikumar ja Rohini 2014, [www.pharmacafennica.fi](http://www.pharmacafennica.fi)). Tämän takia kumariinijohdannaiset ligandit saattaisivat

olla käyttökelpoisia työkaluja myös AKR1C3-entsyymiin kohdennetun lääkeaineen kehittämisessä. Tässä tutkimuksessa testatuista kumariinijohdannaisista ligandeista löydettiin kolme potentiaalista lääkeainekandidaattia, jotka kykenivät nostamaan AKR1C3-entsyymin  $\Delta T_m$ -arvoa korkeammalle kuin ASP9521-kontrolliligandi (Forendo Pharma Ltd).

Suurin erottava tekijä ASP9521-ligandin ja testattujen ligandien välillä on se, että ASP9521-ligandissa ei ole kumariinirakenteelle tyypillistä pyronirengasta. ASP9521-ligandissa pyronirengas on korvattu tyypeä sisältävällä dihydropyrolilla (engl. *2,3-dihydropyrrole*). ASP9521-ligandin molempiin rengasrakenteisiin; dihydropyroliin ja bentseenirenkaaseen on kiinnittyneenä yksi sivuketju. ASP9521-ligandin bentseenirenkaassa on happea sisältävä metyylietteri-sivuketju, jota tavataan myös muilla lämpöarvoa nostaneilla kumariinijohdannaisilla ligandeilla. ASP9521-ligandin ominaisuutena on kyky muodostaa viisi vetysidosta AKR1C3-entsyymiin kanssa. OCA425B-, OCA374- ja OCA370 -ligandit kykenevät muodostamaan yhden vetysidoksen vähemmän ASP9521-ligandiin verrattuna (Kuva 6).

Kumariinijohdannaisista ligandeista kaikista eniten AKR1C3-proteiinin  $\Delta T_m$ -arvoa nosti OCA425B-ligandi ( $\Delta T_m$ -arvo = 4.0 °C), jonka kumariinirakenteen R<sub>1</sub>-sivuketjuun on kiinnittyneenä yksi alkoholiryhmä ja R<sub>4</sub>-sivuketjuun yksi fenoliryhmä. Myös OCA426B-ligandi ( $\Delta T_m$ -arvo = 2.5 °C) sisältää samat funktionaaliset ryhmät kuin OCA425B. OCA425B- ja OCA426B -ligandeissa alkoholiryhmät sijaitsevat kuitenkin eri kohdissa kumariinirakenteen bentseenirengasta. OCA426B-ligandissa OH-ryhmä sijaitsee R<sub>2</sub>-sivuketjussa. OCA425B-ligandin sulamislämpöä lisäävinä tekijöinä voidaankin pitää lähekkäin sijaitsevia happiryhmiä, jotka mahdollisesti pystyvät muodostamaan neljä vetysidosta AKR1C3-entsyymiin kanssa (Kuva 6).

Kaikille testatuille ligandeilla, joiden  $\Delta T_m$ -arvo  $\geq 2,5$  °C, on yhteistä kumariinirakenteen pyronirenkaan R<sub>4</sub>-sivuketjuun kiinnittynyt bentseenirengas. Ligandista riippuen tähän bentseenirengassivuketjuun on liittyneenä korkeintaan

kaksi muuta sivuketjua. TFD036M1-ligandin R<sub>4</sub>-bentseenirenkaassa sivuketjua ei ole ollenkaan. OCA374- ja OCA358 -ligandien R<sub>4</sub>-sivuketjun bentseenirenkaaseen on kiinnittyneenä NH<sub>2</sub>-ryhmä, jolloin bentseenirenkaan nimeksi muodostuu aniliini. OCA370-ligandin kumariinirakenteen R<sub>4</sub>-sivuketjun bentseenirenkaaseen on liittyneenä sekä alkoholiryhmä että fluori (Kuva 6).

Lisäksi  $\Delta T_m$ -arvoa nostaneiden ligandien ( $\Delta T_m$ -arvo  $\geq 2,5$  °C) kumariinirakenteen bentseenirenkaassa on kiinnittyneenä erilaisia R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> -sivuketjuja (Kuva 6). Ligandien OCA425B, OCA426B ja OCA374 kumariinirakenteen bentseenirenkaassa on yksi alkoholiryhmä joko R<sub>1</sub>- tai R<sub>2</sub> -sivuketjussa. OCA358-ligandin R<sub>1</sub>- ja TFD036M1-ligandin R<sub>2</sub>-sivuketjussa on karboksyylihappo sekä OCA370-ligandin R<sub>3</sub>-sivuketjussa metyylietteri. Kun kumariinijohdannaisten ligandien rakenteita tutkitaan tarkemmin, huomataan, että AKR1C3-proteiinin T<sub>m</sub>-arvoa nostavat eniten sellaiset kumariinijohdannaiset ligandit, joiden kumariinirakenteen bentseenirenkaan R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> -sivuketjuihin on kiinnittyneenä happea sisältävä funktionaalinen ryhmä (alkoholi- tai eetteriryhmä) ja pyronirenkaan R<sub>4</sub>-sivuketjuun on liittyneenä bentseenirengas; mieluiten aniliini tai fenyyli. Kumariinijohdannaisten ligandien aromaattiset renkaat saattavat mahdollistaa  $\pi$ - $\pi$ -vuorovaikutuksen (nk. pinoutumisen) syntymisen ligandin ja AKR1C3-entsyymin välille. Oletettavasti sivuketjujensa avulla kumariinijohdannaiset ligandit pystyvät muodostamaan vetysidoksia AKR1C3-entsyymin kanssa ja kiinnittymään AKR1C3-entsyymin katalyyttiseen taskuun (Kuva 6).

Kaikista eniten AKR1C3-proteiinin sulamislämpöarvoa laski TFO009-ligandi (-7 °C). Selittävinä tekijöinä voidaan pitää TFO009-ligandin kumariinirakenteen R<sub>3</sub>-sivuketjuun kiinnittyntä klooria sekä pyronirenkaan R<sub>4</sub>-sivuketjuun liittyntä pyridiiniä. Suuresta negatiivisesta  $\Delta T_m$ -arvosta voidaan päätellä, että kumariinirakenteen bentseenirenkaaseen kiinnittyneellä kloorilla ja pyronirenkaaseen liittyneellä pyridiinillä on haitallisia vaikutuksia AKR1C3-proteiinin rakenteelle. Muilla testatuilla ligandeilla vastaavaa sivuketjuyhdistelmää ei tavata (Kuva 6).

Mielenkiintoista oli huomata, että AKR1C3-proteiinin sulamislämpöarvoa laskeva TFD038-ligandi ( $\Delta T_m$ -arvo =  $-1\text{ }^\circ\text{C}$ ) muistuttaa sulamislämpöä nostavia OCA425B- ja OCA426B -ligandeja, mutta ne eroavat toisistaan kumariinirakenteen bentseenirenkaassa olevan alkoholiryhmän sijainnin suhteen. TFD038-ligandissa OH-ryhmä sijaitsee  $R_3$ -sivuketjussa, OCA426B-ligandissa  $R_2$ -sivuketjussa ja OCA425B-ligandissa  $R_1$ -sivuketjussa (Kuva 6). Yksikin muutos kumariinijohdannaisen ligandin rakenteessa saattaa joko nostaa tai laskea AKR1C3-proteiinin sulamislämpötilaa. Tästä voidaankin päätellä, että funktionaalisen ryhmän sijainnilla on tärkeä merkitys kohdennettua lääkeaineligandia suunniteltaessa.

#### 5.4 AKR1C3 kiteytys ja diffraktio

Erilaisten kiteytysmenetelmien tarkoituksena on saada molekyyli järjestäytymään kiteeksi. Suurin osa mineraaleista ja orgaanisista molekyyleistä kiteytyy helposti, mutta proteiinin kiteyttäminen on vaikeaa. Kiteytyminen tapahtuu vain tarkan kiteytysikkunan sisällä, johon vaikuttaa pH, suolat, saostaja, pitoisuus, polaarisuus sekä lämpötila (Rupp B. 2010). Kiteyttämisen optimointivaiheessa käytettiin samoja kaivoliuoksia ja AKR1C3-NADP -pitoisuuksia kuin Amanon ym. (2015) tutkimuksessa, jossa AKR1C3-kiteet kasvatettiin kahdessa erilaisessa olosuhteessa. Tutkimuksessamme käytettiin myös samaa puskuria geelisuodatuspylvään tasapainoittamiseen kuin Amanon ym. (2015) kokeessa. Vaikka tutkimuksessamme käytettiin samoja kaivoliuoksia kuin Amanon ym. 2015 kokeessa, emme onnistuneet tuottamaan kiteitä samoilla kaivoliuoksilla. Selittävinä tekijöinä voidaan pitää käytettyjä kiteytysmenetelmiä ja laboratorio-olosuhteita, kuten ilmankosteutta. Lisäksi kiteytymistä Amanon ym. (2015) yhteiskiteytyksessä saattoi entisestään edistää käytetyt ligandit.

Amanon ym. (2015) kokeessa kiteyttämisessä käytettiin yhteiskiteytystä (*co-crystallisation*) sekä istuva pisara -menetelmää (*sitting drop*). Tässä tutkimuksessa kiteyttämiseen käytettiin ainoastaan riippuva pisara -menetelmää. Molemmat



riippuva ja istuva pisara -menetelmät perustuvat höyrydiffuusioon (Rupp B. 2010). Höyrydiffuusio perustuu siihen, että kaivoissa höyrynpaine on matalampi kuin roikkuvassa pisarassa. Höyrynpaineen tasaamiseksi pisarasta siirtyy kaivoon vettä ja pisaran proteiinipitoisuus kasvaa. Höyrydiffuusion seurauksena proteiini ylikyllästyy, tapahtuu spontaani nukleaatio ja lopulta proteiini kiteytyy. Kiteytyessään kiteen koko kasvaa, ja siihen saattaa muodostua eri suuntaan lähteviä sakaroita (Rupp B. 2010).

Riippuva ja istuva pisara -menetelmät eroavat toisistaan pisaran geometrian takia, minkä seurauksena vain osa kiteytymisestä tapahtuu joko istuva tai riippuva pisara -menetelmällä. Istuva pisara -menetelmällä kiteen tasapainoittuminen kestää kauemmin kuin riippuva pisara -menetelmällä. Tämän takia istuva pisara -menetelmällä voi olla haastavampaa tuottaa kiteitä. Toisaalta istuva pisara -menetelmä on mekaanisesti stabiilimpi kuin riippuva pisara -menetelmä (Luft ja DeTitta 2009).

Vaikka emme saaneetkaan tuotettua kiteitä Amanon ym. (2015) kaivoliuoksilla, tässä työssä onnistuttiin tuottamaan kiteitä uudessa olosuhteessa. Testasimme yhteensä 312 erilaista kiteytysolosuhdetta, joista ainoastaan yhdessä olosuhteessa muodostui kunnollisia AKR1C3-NADP -kiteitä. Oikea kiteytysolosuhde löytyi Proplex -kiteytyssarjasta (Molecular Dimensions). Erilaisia polyetyleeniglykoleja ja pitoisuuksia muuttamalla saatiin kaupallisen kiteytyssarjan olosuhteesta paras mahdollinen AKR1C3-NADP -kiteiden tuotto-olosuhde. Samaa olosuhdetta hyödynnettiin myös kompleksikiteen muodostamisessa liuotuskokeessa, jossa tarkoituksena oli kiinnittää ligandi diffuusion avulla AKR1C3-NADP -kiteen rakenteisiin. Tutkimuksien aikana kiteiden väri muuttui, mikä kertoi ligandin diffundoitumisesta.

Lisäksi jatkotutkimuksien kannalta on erityisen tärkeää, että kiteitä pystytään tuottamaan hallitusti, nopeasti ja suurina määriä. Yksi keino tähän on käyttää siemennystä (*seeding*), jossa nukleaatiota ei tarvita kiteytymisen käynnistämiseen.

Tutkimuksien aikana kiteiden kokoa saatiinkin kasvatettua merkittävästi mikrosiemennyskokeella. Toinen tapa tuottaa isompia kiteitä on käyttää makrosiemennystä (*macroseeding*), jossa kokonainen kide siirretään proteiiniliuosta sisältävään pisaraan (Rupp B. 2010).

Tuotettuja kiteitä tarvittiin röntgenkristallografisessa tutkimuksessa, jonka tarkoituksena on lisätä ymmärrystä molekyylin rakenteen muodosta ja toiminnoista atomitasolla. Röntgenkristallografisessa kokeessa kiteeseen kohdistetaan röntgensäde, joka siroaa kiteen elektroneista eri suuntiin. Kun nämä diffraktoitujen säteiden kulmat ja voimakkuudet mitataan, voidaan muodostaa kolmiulotteinen kuvan kiteen elektronien tiheydestä ja määrittää atomien keskimääräiset paikat sekä kemialliset sidokset. Pääasiallisesti menetelmää käytetään uusien aineiden atomirakenteen karakterisoimiseksi, kuten lääkeaineiden suunnittelussa (Rupp B. 2010).

Kompleksikiteille tehtiin röntgensädekristallografinen tutkimus MASSIF:illa, jota käytetään biologisten makromolekyylien kiteiden rakenteiden määrittämiseen. MASSIF-1 on täysin automatisoitu, mikä mahdollisti reaaliaikaisen nopean näytteiden diffraktioiden määrittämisen kotilaboratoriosta käsin Internetin välityksellä. Lisäksi automaattiprosessoinnin etuna oli, että sen avulla pystyttiin seuraamaan näytteitä sekä tallentamaan yksittäisiä diffraktio-ominaisuuksia ja diffraktiotietoja. Järjestelmään pystytään lisäämään spesifisiä parametrejä näytteelle ISPyB-tietokannasta (Delagenière ym. 2011, Bowler ym. 2015).

Röntgenkristallografiset mittaukset onnistuivat, koska neljä kidettä diffraktoi. Näistä automaattiprosessoinnin tuloksista ei voida varmuudella kertoa, onnistuttiinko kumariinijohdannaiset ligandit kiteyttämään AKR1C3-proteiinin kanssa. Ligandin kiinnittymisen varmistamiseen tarvitaan lisätutkimuksia.

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessa perehdyttiin kattavasti AKR1C3-proteiiniin ja sen toimintaan sekä rakennettiin AKR1C3-entsyymille optimaalinen tuottojärjestelmä. Rekombinanttiproteiinin tuottojärjestelmän avulla valmistettiin jatkotutkimuksia varten suuri määrä AKR1C3-entsyymiä. Lopulta tutkimuksissa päädyttiin röntgenkristallografisiin kokeisiin asti.

Perustutkimusta, kuten AKR1C3-entsyymin puhdistus- ja tuotto-olosuhteiden optimointia tarvitaan soveltavaan tutkimukseen. Ilman perustutkimusta ei pystytä selvittämään AKR1C3-riippuvaisten sairauksien syntymekanismeja, eikä voida kehittää AKR1C3-entsyymiin kohdennettuja lääkkeitä. Tutkimuksen aikana saavutettiin monen vaiheen kautta uusi suunta AKR1C3-entsyymiin kohdennetun lääkkeen suunnitteluun - kumariinijohdannaiset ligandit. Kuitenkin toimivan AKR1C3-kohdennetun lääkkeen suunnitteluun vaadittaisiin vielä useiden vuosien pitkäjänteistä työtä.

## KIITOKSET

Suurimmat kiitokset kuuluvat vastuuohjaajalleni FT Tatu Haatajalle, jonka ohjaus oli esimerkillistä. Hän osasi sytyttää tutkimuksen tekemiseen kipinän. Haluan myös kiittää tutkimusryhmänjohtajaa FT Ulla Pentikäistä, joka luotti kykyihini selviytyä Pro graduun liittyvästä laboratorio-osuudesta sekä Prof. Olli Pentikäistä, jonka ansiosta pääsin toteuttamaan unelma-ammattiani lääkeainekehittelyyn parissa. Suuri kiitos kiteiden mittaamisesta European Synchrotron Radiation Facility (MASSIF-1, ID30A-1). Lisäksi kiitokset kuuluvat tutkimusryhmän yhteistyökumppanille Forendo Pharma Ltd:lle, tohtoriopiskelija Chandan Thapalle, Bio- ja ympäristötieteen laitoksen välinehuoltajille sekä Konneveden tutkimusasemalle. Pro gradu -työhön myönnettiin Konnevesi-apuraha.

## KIRJALLISUUS

- Adeniji A., Twenter B., Byrns M., Jin Y., Winkler J., Penning T. 2011. *Discovery of substituted 3-(phenylamino)benzoic acids as potent and selective inhibitors of type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3)*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21(5):1464–1468. Saatavissa 10.1016/j.bmcl.2011.01.010.
- Agung B., Otoi T., Abe H., Hoshi H., Murakami M., Karja N., Murakami M.K., Wongsrikeao P., Watari H., Suzuki T. 2005. *Relationship between oxygen consumption and sex of bovine in vitro fertilized embryos*. *Reprod Domest Anim.* 40(1):51–56.
- Amano Y., Yamaguchi T., Niimi T., Sakashita H. 2015. *Structures of complexes of type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase with structurally diverse inhibitors: insights into the conformational changes upon inhibitor binding*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 71(Pt 4):918–27.
- Bairagi S., Salaskar P., Loke S., Surve N., Tandel D., Dusara M. 2012. *Medicinal Significance of Coumarins: A Review*. *International Journal of Pharmaceutical Research.* 4(2):16–19.
- Barski O. A., Tipparaju S., Bhatnagar A. 2008. *The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification*. *Drug Metab. Rev.* 40:553–624. Saatavissa 10.1080/03602530802431439.
- Beranic N., Gobec S., Rizner T. 2011. *Progestins as inhibitors of the human 20-ketosteroid reductases, AKR1C1 and AKR1C3*. *Chem. Biol. Interact.* 191:227–233. Saatavissa 10.1016/j.cbi.2010.12.012.
- Bowler M., Nurizzo D., Barrett R., Beteva A., Bodin M., Caserotto H., Delagenie`re S., Dobias F., Flot D., Giraud T., Guichard N., Guijarro M., Lentini M., Leonard G., McSweeney S., Oskarsson M., Werner Schmidt W., Snigirev A., von Stetten D., Surr J., Svensson O., Theveneauc P., Mueller-Dieckmann C. 2015. *MASSIF-1: a beamline dedicated to the fully automatic characterization and data collection from crystals of biological macromolecules*. *J. Synchrotron Rad.* 22:1540–1547.
- Brozic P., Golob B., Gomboc N., Rizner T. L., Gobec S. 2006. *Cinnamic acids as new inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3)*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 248:233–235.
- Bydal P., Luu-The V., Labrie F., Poirier D. 2009. *Steroidal lactones as inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5: chemical synthesis, enzyme inhibitory activity, and assessment of estrogenic and androgenic activities*. *Eur. J. Med. Chem.* 44:632–644. Saatavissa 10.1016/j.ejmech.2008.03.020

- Byrns M., Duan L., Lee H., Blair I., Penning T. 2010. *Aldo-keto reductase 1C3 expression in MCF-7 cells reveals roles in steroid hormone and prostaglandin metabolism that may explain its over-expression in breast cancer.* J Steroid Biochem Mol Biol. 118:177-87.
- Byrns M., Mindnich R, Duan L., Penning T. 2012. *Overexpression of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) in LNCaP cells diverts androgen metabolism towards testosterone resulting in resistance to the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor finasteride.* J Steroid Biochem Mol Biol. 130(1-2):7-15.
- Byrns M., Penning T. 2009. *Type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase (AKR1C3): role in breast cancer and inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drug analogs.* Chem Biol Interact. 178(1-3):221-227.
- Desmond J., Mountford J., Drayson M., Walker E., Hewison M., Ride J., Luong Q., Hayden R., Vanin E., Bunce C. 2003. *The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Cancer Res. 63(2):505-512.
- Delagenière S., Brenchereau P., Launer L., Ashton A., Leal R., Veyrier S., Gabadinho J., Gordon E., Jones S., Levik K., McSweeney S., Monaco S., Nanao M., Spruce D., Svensson O., Walsh M., Leonard G. 2011. *ISPyB: an information management system for synchrotron macromolecular crystallography.* Bioinformatics. 27:3186-3192.
- Gobec S., Brožič P. Rižner T. 2005. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: New lead compounds for the development of anticancer agents.* Bioorganic & Medical Chemistry Letters. 23:5170-5175.
- Hellwig S., Stöckmann C., Gellissen G., Bühchs J. 2005. *Comparative Fermentation.* Teoksessa Gellissen G. (toim.) *Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany. 287-317.
- Jez J., Bennett M., Schlegel B., Lewis M., Penning T. 1997. *Review article. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily.* Biochem. J. 326:625-636.
- Jez J., Flynn T., Penning T. 1997b. *A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily.* Biochemical Pharmacology. 54:639-647.
- Jez J., Penning T. 2001. *The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update.* Chem Biol Interact. 30; 130-132(1-3):499-525.

- Kashfi K., Rigas B. 2005. *Non-COX-2 targets and cancer: Expanding the molecular target repertoire of chemoprevention*. *Biochem Pharmacol.* 70(7):969–986.
- Khanim F., Davies N., Velica P., Hauden R., Ride J., Pararasa C., Chong M., Gunther U., Veerapen N., Winn P., Farmer R., Trivier E., Rigoreau L., Drayson M., Bunce C. 2014. *Selective AKR1C3 inhibitors do not recapitulate the anti-leukaemic activities of the pan-AKR1C inhibitor medroxyprogesterone acetate*. *British Journal of cancer* volume. 110:1506-1516.
- Kikuchi A., Furutani T., Azami H., Watanabe K., Niimi T., Kamiyama Y., Kuromitsu S., Baskin-Bey E., Heeringa M., Ouatas T., Enjo K. 2014. *In vitro and in vivo characterisation of ASP9521: a novel, selective, orally bioavailable inhibitor of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. (17 $\beta$ HSD5; AKR1C3)*. *Invest New Drugs.* 5:860-70.
- Kljun J., Anko M., Traven K., Sinreih M., Pavlič R., Peršič Š. 2016. *Pyrrithione-based ruthenium complexes as inhibitors of aldo-keto reductase 1C enzymes and anticancer agents*. *Dalton Trans.* 45:11791–11800. Saatavissa 10.1039/c6dt00668j
- Kram K., Finkel S. 2015. *Rich Medium Composition Affects Escherichia coli Survival, Glycation, and Mutation Frequency during Long-Term Batch Culture*. *Appl Environ Microbiol.* 81(13):4442–4450.
- Lo M-C., Aulabaugh A., Jin G., Cowling R., Bard J., Malamas M., Ellestad G. 2004. *Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery*. *Analytical biochemistry.* 332(1):153–159.
- Loriot Y., Fizazi K., Jones R. J., Van Den Brande J., Molife R. L., Omlin A. 2014. *Safety, tolerability and anti-tumour activity of the androgen biosynthesis inhibitor ASP9521 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: multi-centre phase I/II study*. *Invest. New Drugs.* 32:995–1004. Saatavissa 10.1007/s10637-014-0101-x.
- Luft J., DeTitta G. 2009. *Rational Selection of Crystallization Techniques*. Teoksessa Bergfors T. (toim.) *Protein Crystallization*. IUL Biotechnology Series. Second edition. International University Line, La Jolla, USA. 26-38.
- Nelson D., Cox M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Novotna R., Wsol V., Xiong G., Maser E. 2008. *Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3*. *Toxicol. Lett.* 181:1–6. Saatavissa 10.1016/j.toxlet.2008.06.858.
- Ollikka P., Suominen I. 2003. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. Opetushallitus. Helsinki.

- Pantoliano M., Petrella E., Kwasnoski J., Lobanov V., Myslik J., Graf E., Carver T., Asel E., Springer B., Lane P, Salemme FR. 2001. *High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery*. Journal of biomolecular screening. 6(6):429-40.
- Pawlowski J., Huizinga M., Penning T. 1991. *Isolation and partial characterization of a full-length cDNA clone for 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase: a potential target enzyme for nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Agents Actions. 34: 289-293.
- Penning T., Burczynski M., Jez J., Hung C-F., Lin H-K., Ma H., Margaret Moore M., Palackal N., Ratnam K. 2000. *Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones*. Biochem. J. 351:67–77.
- Penning T., Byrns M. 2009. *Steroid Hormone Transforming Aldo-Keto Reductases and Cancer*. *Steroid Enzymes and Cancer*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1155:33–42.
- Penning T., Dryry J. 2007. *Human Aldo-Keto Reductases: Function, Gene Regulation, and Single Nucleotide Polymorphisms*. Arch Biochem Biophys. 15; 464(2):241–250. Saatavissa 10.1016/j.abb.2007.04.024.
- Penning T., Steckelbroecka S., Baumana D., Miller M., Jin Y., Peehl D., Fung K-M., Lin H-K. 2006. *Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: Role in prostate disease and the development of specific inhibitors*. Molecular and Cellular Endocrinology. 27:182-191.
- Pippione A., Carnovale I., Bonanni D., Sini M., Goyal P., Marini E., Pors K. Adinolfi S., Zonari D., Festuccia C., Wahlgren W., Friemann R., Bagnati R., Boschi D., Oliaro-Bosso S., Lolli M. 2018. *Potent and selective aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) inhibitors based on the benzoisoxazole moiety: application of a bioisosteric scaffold hopping approach to flufenamic acid*. European Journal of Medicinal Chemistry. 150:930-945.
- Niesen F., Berglund H., Vedadi M. 2007. *The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability*. Nature protocols. 2(9):2212–2221.
- Rohini K., Srikumar PS. 2014. J Thermodyn Catal. Vol 5(2): 130. Saatavissa 10.4172/2157-7544.1000130.
- Rupp B. 2010. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to structural Biology*. 1st Edition. Garland Science. New York. USA.



- Skarydova L., Zivna L., Xiong G., Maser E., Wsol V. 2009. *AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids*. Chem. Biol. Interact. 178: 138–144. Saatavissa 10.1016/j.cbi.2008.10.015.
- Stefane B., Brozic P., Vehovc M., Rizner T. L., Gobec S. 2009. *New cyclopentane derivatives as inhibitors of steroid metabolizing enzymes AKR1C1 and AKR1C3*. Eur. J. Med. Chem. 44:2563–2571. Saatavissa 10.1016/j.ejmech.2009.01.028.
- Studier W. 2005. *Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures*. Protein Expression and Purification. 41:207–234.
- Suzuki T., Miki Y., Nakamura Y., Moriya T., Ito K., Ohuchi N., Sasano H. 2005. *Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer*. Endocr Relat Cancer. 12(4):701–720.
- Wang D., Dubois RN. 2006. *Prostaglandins and cancer*. Gut. 55:115–22.
- Zang T., Verma K., Chen M., Jin Y., Trippier P. C., Penning T. M. 2015. *Screening baccharin analogs as selective inhibitors against type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3)*. Chem. Biol. Interact. 234:339–348. Saatavissa 10.1016/j.cbi.2014.12.015
- Zeng C-M., Chang L-L., Ying M-D., Cao J., He Q-J., Zhu H., Yang B. 2017. *Aldo-Keto Reductase AKR1C1–AKR1C4: Functions, Regulation, and Interovention for Anti-cancer Therapy*. Front Pharmacol. 14;8:119. Saatavissa 10.3389/fphar.2017.00119.
- Zhao Y., Zheng X., Zhang H., Zhai J., Zhang L., Li C., Zeng K., Chen Y., Li Q., Hu X. 2015. *In vitro inhibition of AKR1Cs by sulphonylureas and the structural basis*. Chem. Biol. Interact. 240:310–315. Saatavissa 10.1016/j.cbi.2015.09.006.

## LIITTEET

### Liite 1.

#### LB-kasvatusliuos

10 g	tryptoni
5 g	hiivauute
10 g	NaCl

1. Liuotetaan 1 litraan asti ionivaihdetulla vedellä.
2. Autoklavoidaan.
3. LB-kasvatusliuokseen lisätään ennen käyttöä 1 % glukoosi.

#### TB-kasvatusliuos

	TB-liuos:
12 g	tryptoni
24 g	hiivauute
0.5 %	glyseroli
	10x Fosfaattipuskuri (KPi):
0.17 M	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0.72 M	$\text{K}_2\text{HPO}_4$

1. Tryptoni, hiivauute ja glyseroli liuotetaan 900 ml:n asti ionivaihdetulla vedellä. TB-liuos autoklavoidaan.
2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ja  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  liuotetaan 1000 ml:n asti ionivaihdetulla vedellä. Fosfaattipuskuri autoklavoidaan.
3. 1 l käyttövalmis TB-kasvatusliuos saadaan, kun 1900 ml TB-liuosta lisätään 100 ml 10x Fosfaattipuskuria.

**Liite 2.**

## M9ZB-kasvatusliuos

	ZB-liuos:
10 g	NZ-amiini
5 g	NaCl
	10x M9-suolaliuos:
10 g	ammoniumkloridi
30 g	kaliumdivetyfosfaatti
60 g	natriumvetyfosfaatti

1. NZ-amiini ja NaCl liuotetaan 900 ml:n asti ionivaihdetulla vedellä. ZB-liuos autoklavoidaan.
2. Ammoniumkloridi, kaliumdivetyfosfaatti ja natriumvetyfosfaatti liuotetaan 500 ml:n asti ionivaihdetulla vedellä. 10x M9 suolaliuos autoklavoidaan.
3. 1 l käyttövalmista M9ZB-kasvatusliuosta saadaan, kun 1900 ml ZB-liuosta lisätään 100 ml 10x M9-suolaliuosta.
4. Ennen käyttöä valmiiseen M9ZB-kasvatusliuokseen lisätään 1 % glukoosia ja 1 mM magnesiumsitraattia.

**Liite 3.**

12 % SDS-PAGE-geelien valmistusohje  
(4:lle geelille ja 10 kDa - 200 kDa proteiinille)

Erotusgeeli (Running gel)

4.95 ml	ddH <sub>2</sub> O
6.0 ml	30 % Akryyliamidi/Bis-akryyliamidi
2.1 ml	1.5 M Tris, pH 8.8
75 µl	20 % SDS
1.875 ml	2.0 M Sukroosi
15 µl	TEMED
100 µl	10 % APS

Aineet lisätään järjestyksessä 50 ml:n sentrifuugiputkeen. Viimeisenä pipetoidaan TEMED ja 10 % APS vetokaapissa. Aineet sekoitetaan Pasteur-pipetillä ja siirretään polymerisoitumaan geelikasettiin 15 minuutiksi. Geelin päälle lisätään ddH<sub>2</sub>O:sta kuivumisen estämiseksi.

Peitegeeli (Stacking gel)

5.25 ml	ddH <sub>2</sub> O
6.0 ml	30 % Akryyliamidi/Bis-akryyliamidi
2.1 ml	1.5 M Tris, pH 8,8
75 µl	20 % SDS
1.875 ml	2.0 M Sukroosi
15 µl	TEMED
100 µl	10 % APS

Aineet lisätään järjestyksessä 15 ml:n sentrifuugiputkeen. Viimeisenä pipetoidaan TEMED ja 10 % APS. Aineet sekoitetaan Pasteur-pipetillä, siirretään geelikasettiin ja asetetaan kammat paikoilleen. Annetaan polymerisoitua.

**Liite 4.**

10x SDS-puskuri

30.0 g        Tris-emäs

144.0 g       Glysiini

10.0 g        SDS

1. Liuota aineet 1000 ml ionivaihdettuun veteen.
2. Säädä pH 8.3.
3. Säilytetään huoneenlämmössä. Ennen käyttöä liuotetaan 1x tilavuuteen.