

Turun yliopisto

DNA-templatoitu N(Me)-alkoksi- amiiniglykosylaatio

Tommi Österlund
Maaliskuu 2019

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

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

TOMMI ÖSTERLUND: DNA-templatoitu *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio

Tutkielma, 71s., 4 liites.

Kemia

Maaliskuu 2019

Peri ja Dumy kehittivät vuonna 1998 (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaation, joka tunnetaan nykyään myös neoglykosylaationa. Tämän reaktion kemo- ja stereoselektiivisyys tekevät siitä hyvän synteettisen työvälineen. Reaktio on bio-ortogonaalinen, eikä sen käytössä vaadita suojaryhmiä tai reaktiivisten ryhmien aktivointia. Perin ja Dumyn tutkimusta on hyödynnetty monissa tutkimuksissa erilaisten *N,O*-glykosidien eli neoglykosidien synteeseissä. Neoglykosidit voivat toimia epäluonnollisesta glykonin ja aglykonin välisestä sidoksesta huolimatta luonnollisten glykosidien jäljitteinä.

DNA-templatoitua synteesiä on käytetty erilaisten oligonukleotidien välisten reaktioiden katalyysissä. DNA-templatoitu synteesi perustuu DNA:n ominaisuuteen hybridisoitua komplementtinsa kanssa liuoksessa. DNA-templatoidussa synteeseissä kaksi tai useampi oligonukleotidiketju ovat modifioitu reaktiivisilla ryhmillä. Tällöin oligonukleotidien hybridisoituessa keskenään tai erillisen templaattioligonukleotidin kanssa reaktiiviset ryhmät asettuvat toistensa kanssa lähekkäin niin, että reaktiivisten ryhmien paikalliskonsentraatio kasvaa ja reaktio tehostuu. Monet solubiologian reaktiot, kuten esimerkiksi DNA:n synteesi, ovat DNA-templatoituja. Laboratorioissa DNA-templatoitua synteesiä on hyödynnetty muun muassa supramolekulaarisessa kemiassa ja kombinatorisessa kemiassa.

Näitä kahta menetelmää hyödyntäen erikoistyössä kehitettiin DNA-templatoitu *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio, jossa 5'-*O*-metyyliaminomodifoidun hiusneulaoligonukleotidin häntäosa hybridisoituu lyhyemmän oligonukleotidin kanssa ja reagoi sen 3'-päähän liitetyn glukoosin kanssa. *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiolla on reaktion monia DNA-templatoinnin kannalta mielenkiintoisia ominaisuuksia. Sovelluskohteiden kannalta näitä mielenkiintoisia ominaisuuksia ovat muun muassa reaktion dynaamisuus ja reversiibeliys, pH-riippuvuus sekä sen bio-ortogonaalisuus. Näitä ominaisuuksia voidaan hyödyntää esimerkiksi dynaamisessa kombinatorisessa kemiassa ja itsejärjestäytyvien rakenteiden kemiassa.

Tämän tutkielman tavoitteena on esitellä DNA-templatoidun synteessin ja *N*-alkoksiamiiniglykosylaation taustaa ja sovelluskohteita, ja näyttää lopulta miksi ja miten näitä soveltaen kehitettiin DNA-templatoitu menetelmä *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiolle.

Asiasanat

DNA, DNA-templatointi, *N*-glykosylaatio, oligomeerit

Lyhenneluettelo

- CD – sirkulaarinen dikroismi
- DCM – dikloorimetaani
- DECL – DNA-merkitty molekyylikirjasto
- DIAD – di-isopropyliatsodikarboksylaatti
- DIEA – *N,N*-di-isopropylietyyliamiini
- DMF – dimetyyliformamidi
- DMSO – dimetyylisulfoksidi
- DMTr – 4,4'-dimetoksitriityyli
- EDC – 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi
- ESI-TOF – sähkösumutus-ionisaatio-lentoaika
- Fmoc – 9-fluorenyylimetyylioksikarbonyyli
- GBP – glykaaniin sitoutuva proteiini
- HPLC – korkean erotuskyvyn nestekromatografia
- LCAA-CPG – pitkäketjuisia alkyyliamiineja sisältävä huokoinen lasi
- PBS – fosfaattipuskuroitu suolaliuos
- PCR – polymeraasiketjureaktio
- PMB – 4-metoksibentsyylieetteri
- PNA – peptidinukleinihappo
- PyBOP – bentsotriatsolyyli-1-oksitripyrrolidinofosfoniumheksafluorifosfaatti
- SNP – yksittäinen emäspoikkeavuus
- TACA – kasvaimille ominainen hiilihydraattiantigeeni
- TAMRA – tetrametyylirodamiini
- TBSCl – tert-butyylidimetyylisilyyli
- TEA – trietyyliamiini
- THF – tetrahydrofuraani

Sisällysluettelo

Kirjallinen osa

1.1.	Johdanto	4
1.2.	<i>N</i> -glykosylaatio	5
1.2.1.	Yleistä <i>N</i> -glykosylaatiosta.....	5
1.2.2.	Esimerkkejä <i>N</i> -glykokonjugaattien biologisista sovelluksista	7
1.2.3.	(<i>N</i> -alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatio	11
1.2.4.	(<i>N</i> -alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatio glykokonjugaattien synteesissä	15
1.3.	DNA-templatoitu synteesi.....	20
1.3.1.	Yleistä DNA-templatoidusta synteesistä	20
1.3.2.	Esimerkkejä DNA-templatoidusta ligaatiosta oligomeerien synteesissä.....	23
1.3.3.	DNA-templatoinnin sovellukset	33
1.3.3.1.	Nukleinihappojen havaitseminen.....	33
1.3.3.2.	Kombinatorinen kemia	34
1.3.3.3.	Supramolekulaarinen kemia	38
1.4.	DNA-templatoitu <i>N</i> (Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio	40
1.4.1.	Yleistä DNA-templatoidusta <i>N</i> (Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiosta.....	40
1.5.	Yhteenveto	41
2.1.	Johdanto	44
2.2.	Tulokset ja niiden tarkastelu	44
2.2.1.	Kokeelliset menetelmät	47
2.2.1.1.	Yleiset menetelmät	47
2.2.1.2.	5'- <i>O</i> -(metyyliamino)tymidiinin fosforamidiitin synteesi	48
2.2.1.3.	Sokerikantajan synteesi.....	52
2.2.1.4.	Oligonukleotidien synteesi	53
2.2.1.5.	DNA-templatoidun <i>N</i> (Me)-alkoksiamiiniglykosylaation seuraaminen.....	55
2.3.	Sovelluskohteet	59

2.4. Yhteenveto	61
3. Lähteet.....	63
4. Liitteet	67
Liite 1. Oligonukleotidien raakapuhdistuksien HPLC-kromatogrammit	68
Liite 2. Syntetisoitujen modifioitujen oligonukleotidien massaspektit.....	69

KIRJALLINEN OSA

1.1. Johdanto

N-glykosidit ovat luonnossa esiintyviä yhdisteitä, jotka koostuvat hiilihydraatista ja sen anomeeriseen hiileen kondensoituneesta aglykoniosasta, joka on sitoutunut hiilihydraattiin typen välityksellä. Luonnossa esiintyy laaja kirjo *N*-glykosideja, kuten esimerkiksi nukleosidejä, nukleotidejä, glykoproteiineja ja glykolipidejä. Näiden molekyylien biologinen aktiivisuus on herättänyt kemistien huomion, ja erilaisia *N*-glykokonjugaatteja on syntetisoitu muun muassa lääkekäyttöön.¹ Myös luonnossa esiintyviä *N*-glykokonjugaatteja on hyödynnetty esimerkiksi suunnittelemalla niihin sitoutuvia lääkeaineita, jotka kykenevät näin kohdistumaan tiettyjä glykokonjugaatteja sisältäviin soluihin.²

Peri ja Dumy kehittivät vuonna 1998 *N*-glykosylaatioon perustuvan (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaation, joka tunnetaan nykyään myös neoglykosylaationa.³ Tämän reaktion kemo- ja stereoselektiivisyys tekevät siitä hyvän synteettisen työvälineen. Reaktio on bio-ortogonaalinen, eikä sen käytössä vaadita suojaryhmiä tai reaktiivisten ryhmien aktivointia. Perin ja Dumyn tutkimusta on hyödynnetty monissa tutkimuksissa erilaisten *N,O*-glykosidien eli neoglykosidien synteeseissä. Vaikka neoglykosidit eivät sisällä luonnollista glykonin ja aglykonin välistä sidosta, biologisen aktiivisuuden kannalta tärkeä hiilihydraattiosan konformaatio säilyy. Neoglykosideja on käytetty esimerkiksi syöpäsolujen vastaisina solumyrkkyinä.⁴

DNA-templatoitua synteesiä on hyödynnetty erilaisten oligonukleotidien välisten reaktioiden katalyysissä.⁵ DNA-templatoitu synteesi perustuu DNA:n ominaisuuteen hybridisoitua komplementtinsa kanssa liuoksessa. DNA-templatoidussa synteeseissä kaksi tai useampi oligonukleotidiketjua ovat modifioitu reaktiivisilla ryhmillä. Tällöin oligonukleotidien hybridisoituessa keskenään tai erillisen templaattioligonukleotidin kanssa reaktiiviset ryhmät asettuvat toistensa kanssa lähekkäin niin, että reaktiivisten ryhmien paikalliskonsentraatio kasvaa ja reaktio tehostuu. Monet solubiologian reaktiot, kuten esimerkiksi DNA:n synteesi, ovat DNA-templatoituja. Laboratorioissa DNA-templatoitua synteesiä on hyödynnetty muun muassa supramolekulaarisessa kemiassa⁶ ja kombinatorisessa kemiassa⁷.

Erikoistyössä kehitettiin DNA-templatoitu *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio, jossa hyödynnetään Perin ja Dumyn kehittämää neoglykosylaatiota. Neoglykosylaatiolla on reaktiona monia DNA-templatoinnin kannalta mielenkiintoista ominaisuutta. Sovelluskohteiden kannalta mielenkiintoisia ominaisuuksia ovat muun muassa

neoglykosylaation dynaamisuus ja reversiibeliys, pH-riippuvuus sekä sen bio-ortogonaalisuus. Reaktio saatiin toimimaan hiusneulaoligonukleotidin ja sen häntäosan kanssa hybridisoituvan lyhyemmän oligonukleotidin välisenä reaktiona. Hiusneulaoligonukleotidin 5'-pään hydroksyyliiryhmä oli modifioitu metyyliaminoryhmällä, ja lyhyemmän oligonukleotidin 3'-pää glukoosilla, ja näiden kahden ryhmän välillä tapahtui haluttu reaktio. Erikoistyon tuloksista on myös julkaistu artikkeli.⁸

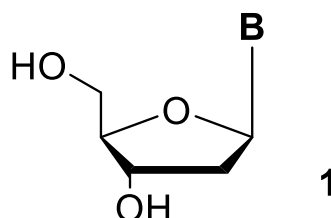
Tämän tutkielman tavoitteena on perehtyä DNA-templatoitun *N*(Me)-glykosylaation taustaan, kuten *N*-glykosylaatioon ja DNA-templatoitun synteesiin ja niiden aikaisempiin sovelluskohteisiin. Lopulta esitetään myös mahdollisia sovelluskohteita kehitetylle DNA-templatoitulle *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiolle itsejärjestäytyvien supramolekulaaristen rakenteiden kemiassa sekä kombinatorisessa kemiassa.

1.2. *N*-glykosylaatio

1.2.1. Yleistä *N*-glykosylaatiosta

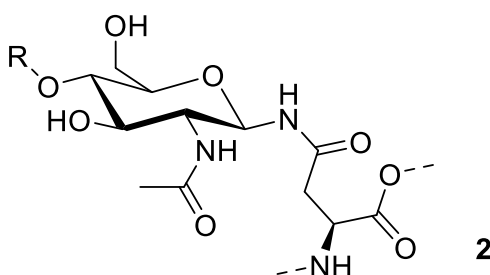
N-glykosylaatiolla tarkoitetaan aglykonin liittymistä hiilihydraatin anomeeriseen asemaan typen välityksellä. Reaktion voidaan ajatella olevan kondensaatio hemiasetaalisen hiilihydraatin ja aglykonin välillä. Reaktiosta riippuen saadaan α - ja β -anomeerien seos.

Erilaisia *N*-glykosideja esiintyy luonnossa kaikissa eliöissä. Esimerkiksi nukleosidien ja nukleotidien emäksen ja sokerin välinen sidos on tyypillinen esimerkki *N*-glykosidisesta sidoksesta (Kuva 1). Muita luonnossa esiintyviä *N*-glykosideja ovat esimerkiksi *N*-glykosyloidut peptidit, *N*-glykoproteiinit ja *N*-glykolipidit.⁹ Isompia kahden erilaisen biopolymeerin (esim. peptidit ja hiilihydraatit) välisiä rakenteita kutsutaan usein *N*-glykokonjugaateiksi.¹⁰



Kuva 1. Esimerkki luonnon *N*-glykosidisesta sidoksesta: yleinen DNA-nukleosidi **1**. Aglykoniosa on nukleoemäs **B** (A, C, G, T), joka on sitoutunut glykoniosana toimivan deoksiriboosin anomeeriseen hiileen *N*- β -glykosidisella sidoksella.

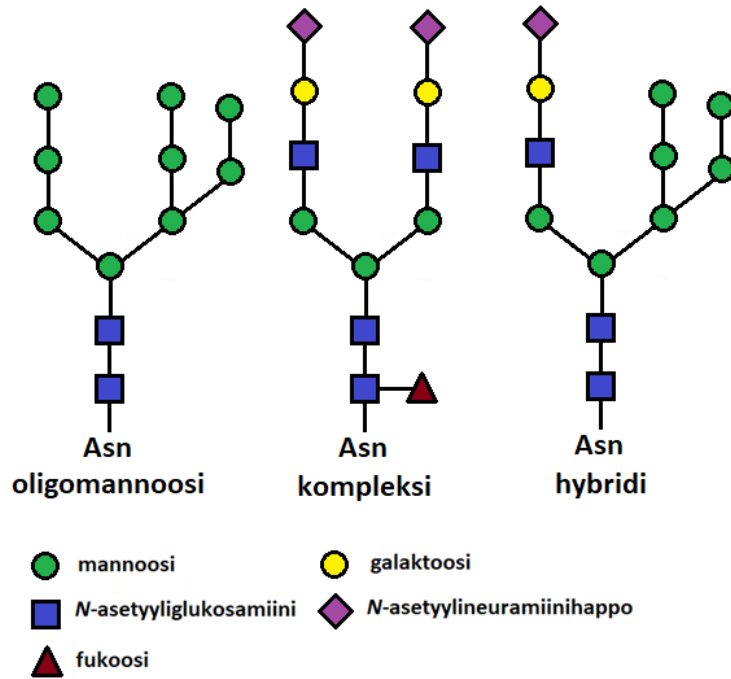
Proteiinien tapauksessa hiilihydraatti liittyy yleensä proteiineissa olevien asparagiinitähteiden amidiryhmiin (Kuva 2). Ensimmäinen asparagiiniin sitoutunut hiilihydraatti on tyypillisesti luonnollisissa *N*-glykaaneissa *N*-asetyyli-glukosamiini, joka on sitoutunut asparagiiniin β -glykosidisella sidoksella. Proteiinien glykaanit koostuvat tyypillisesti useammasta toisiinsa liittyneistä sokereista, jotka ovat tässä tapauksessa merkitty R:llä. *N*-glykosyloituja proteiineja esiintyy sekä aitotumallisissa että esitumallisissa eliöissä.¹¹ *N*-glykoproteiinien muodostuminen tapahtuu kaikissa eliöissä samalla tavalla kolmivaiheisessa entsymaattisessa synteesissä. Aitotumallisissa eliöissä voi tapahtua vielä tämän synteesin jälkeen *N*-glykaanien modifikaatioita Golgin laitteissa.



Kuva 2. Tyypillinen esimerkki *N*-glykosyloidusta asparagiinitähteestä.

Proteiinien *N*-glykaanit voidaan jakaa kolmeen eri luokkaan, joissa kaikissa on ydinrakenteena samanlainen asparagiiniin liittynyt kahden *N*-asetyyli-glukosamiinin ja kolmen mannoosin muodostama hiilihydraattirakenne.¹² Ensimmäinen luokka on oligomannoosit, joissa *N*-glykaanin ydinrakenteeseen on liittynyt vain mannooseja. Toinen on kompleksit, joissa ydinrakenteeseen on liittyneinä *N*-asetyyli-glukosamiinien aloittamia ulokkeita. Kolmas on hybridit, joissa on ydinrakenteeseen on liittynyt sekä pelkästään mannooseja sisältävä uloke että komplekseille tyypillinen *N*-asetyyli-glukosamiiniuloke. Luokat on esitelty kuvassa 3.

N-glykosyloiduilla proteiineilla on monia tärkeitä rooleja biologisissa prosesseissa, kuten esimerkiksi immuunijärjestelmän toiminnassa, solujen välisessä tunnistuksessa ja proteiinien laskostumisessa ja stabiiliudessa esimerkiksi lämpötilan tai pH:n suhteen.¹³ Esimerkiksi immuunijärjestelmän vasta-aineet ovat *N*-glykosyloituja proteiineja. Vasta-aineet ovat Y:n muotoisia molekyyliä, joiden päissä on antigeenejä sitova alue. Ne ovat vastuussa elimistön immuunivasteesta, ja antigeenit muuttuvat toimintakyvyttömiksi niiden sitoutuessa vasta-aineisiin. Myös täysin synteettisiä vasta-aineita on syntetisoitu erilaisiin lääkinnällisiin tarkoituksiin.



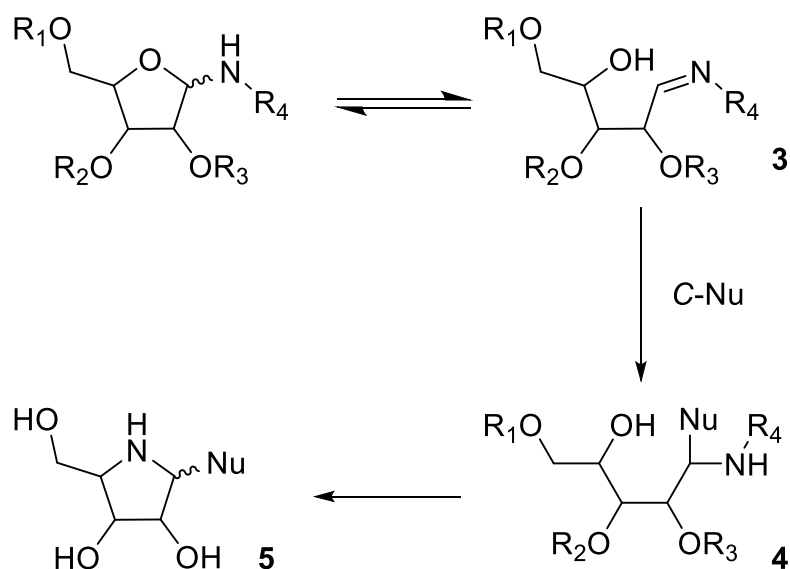
Kuva 3. Proteiinien N-glykaanien luokat.

Solujen välisessä tunnistuksessa tärkeät glykosyloidut proteiinit ja lipidit sijaitsevat solukalvolla, jossa ne voivat toimia erilaisten GBP-proteiinien ligandeina.¹⁴ Jotkin sairaudet aiheuttavat näiden solukalvon glykokonjugaattien glykaaneissa muutoksia, joita voidaan hyödyntää esimerkiksi diagnostiikassa ja hoitokeinojen kohdentamisessa.²

Biologisesti aktiiviset glykokonjugaatit ovat herättäneet kemistien kiinnostuksen monien mahdollisten lääkinnällisten sovelluskohteiden vuoksi. Tämän lisäksi esimerkiksi solupinnan glykaaneja tutkimalla voidaan kehittää erilaisia biologisia työkaluja.

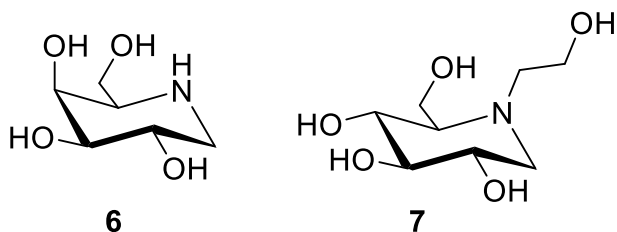
1.2.2. Esimerkkejä N-glykokonjugaattien biologisista sovelluksista

N-glykosideissa voi esiintyä mutarotaatiota, jolloin ne tautomerisoituvat avoketjuisiksi imiineiksi (3). Tällöin ne voivat reagoida monien erilaisten hiilnukleofiilien kanssa tuottaen 1,2-*syn*- tai 1,2-*anti*-aminoalditoleja (4). Aminoalditolien syklistaatiota voidaan edelleen hyödyntää erilaisten iminosokeri-C-glykosidien valmistuksessa. (5) (Kaavio 1).¹⁶



Kaavio 1. Suojatun N-glykosidin mutarotaatio ja reaktio C-nukleofiilin kanssa. Reaktiossa muodostuu aminoalditoli 4, joka vapaan alkoholin aktivoinnin jälkeen syklistoituu iminosokeriksi 5. R₁₋₄ ovat tyypillisesti suojaryhmiä.

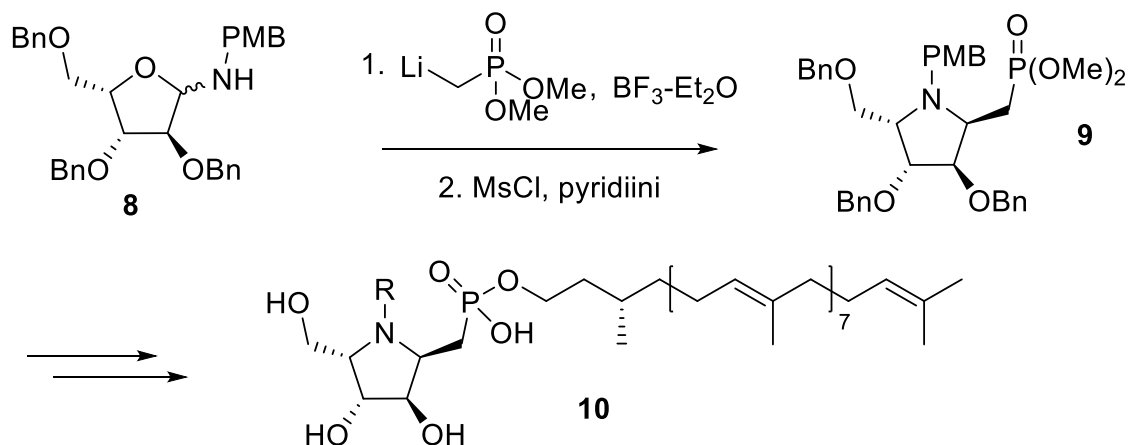
Hyvin samankaltaisia biologisesti aktiivisia iminosokereita esiintyy luonnossa monissa mikro-organismeissa ja kasveissa. Luonnollisissa iminosokereissa on kuitenkin anomeerisessä hiilessä sitoutuneena happi. Tällaisten iminosokereiden *N,O*-asetaaliryhmän labiilius on usein este niiden soveltamisessa esimerkiksi lääkkeinä tai biologisina koettimina. 1-deoksi-iminosokerijohdannaiset ja iminosokeri-C-glykosidit ovat tästä syystä olleet mielenkiintoinen tutkimuskohde, koska ne ovat paljon pysyvämpiä verrattuina luonnollisiin iminosokereihin, mutta samalla ne voivat jäljitellä luonnollisia iminosokereita elimistössä. Esimerkkejä lääkekäytössä olevista 1-deoksi-iminosokerijohdannaisista ovat muun muassa 1-deoksigalaktonojirimysiini (6), jota käytetään Fabryn taudin hoidossa¹⁷, ja *N*-(2-hydroksietyyli)-1-deksinojirimysiini (7), jota käytetään tyypin 2 diabeteksen hoidossa¹⁸ (Kuva 4). Yleensä 1-deoksi-iminosokerijohdannaisissa on joku *N*-substituentti biologisen aktiivisuuden parantamiseksi.



Kuva 4. 1-deoksigalaktonojirimysiini **6** ja N-(2-hydroksietyyli)-1-deoksinojirimysiini **7**.

Vaikka vastaavat N-substituoidut 1-deoksi-iminosokerit ovat yleensä helpompia syntetisoida, iminosokeri-C-glykosideilla on useita etuja verrattuna 1-deoksi-iminosokereihin. Ne ovat yleensä tehokkaampia antiviraalisina lääkkeinä ja ne ovat osoittautuneet myös selektiivisiksi hiilihydraatteja käsittelevien entsyymien inhibiittoreiksi.¹⁹

Käytännön esimerkki N-glykosidien käytöstä iminosokeri-C-glykosidien synteesissä on Eustache et al.:n tutkimus²⁰, jossa tutkimusryhmä syntetisoi pyrrolidiini-C-glykosidiin perustuvia β -D-arabinofuranosyyli-1-monofororyylidekaprenolin jäljitelmiä (**10**) käyttäen lähtöaineena suojattua N-glykosidia (**8**). Näillä jäljitelmillä havaittiin olevan lupaavia tuberkuloosimykobakteerien vastaisia ominaisuuksia. Synteesissä nukleofiilina käytettiin organolitiumyhdistettä (Kaavio 2), joka liittyi lähtöaineena käytettyyn N-glykosidiin kaavion 3 mekanismilla.



Kaavio 2. Eustache et al.:n β -D-arabinofuranosyyli-1-monofororyylidekaprenolin jäljitelmien synteesi.

Proteiineja on käytetty pitkään lääkkeinä, mutta usein niillä on heikko terapeuttinen tehokkuus johtuen huonoista fysiokemiallisista ja farmakologisista ominaisuuksista. Huonot fysiokemialliset ominaisuudet proteiineissa johtuvat usein niiden heikosta molekulaarisesta stabiiliudesta. Huonot farmakologiset ominaisuudet taas johtuvat

lääkkeen toimintaa vastustavista farmakodynaamisista vasteista tai heikoista farmakokineettisistä ominaisuuksista. Tällaisissa tapauksissa proteiinin *N*-glykosylaatio voi esimerkiksi parantaa sen stabiiliutta tai sen farmakologisia ominaisuuksia, tehden näin lääkkeestä tehokkaamman.¹⁵

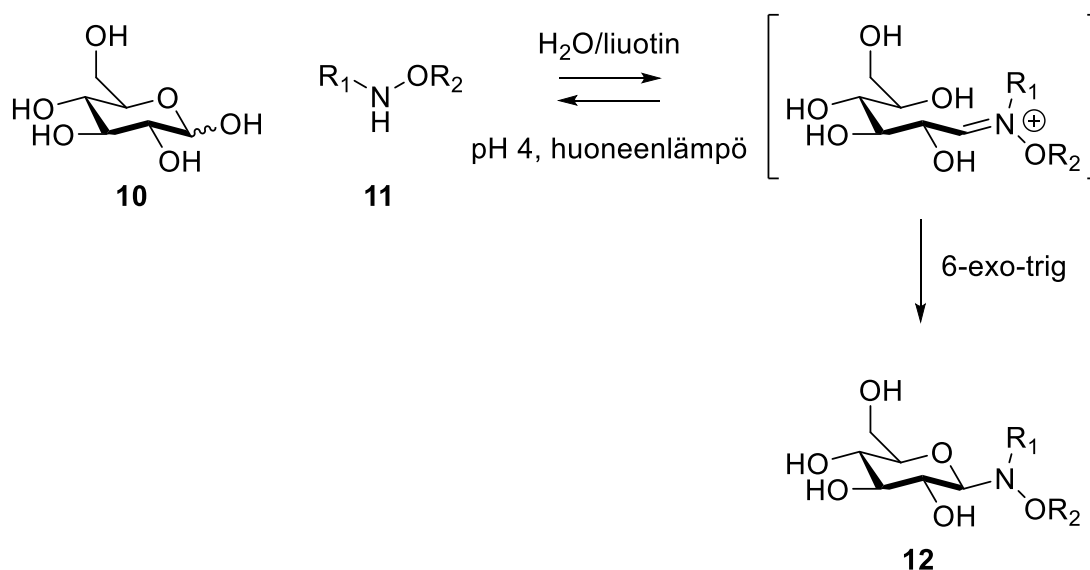
Esimerkkejä proteiinien stabiiliutta haittaavista tekijöistä ovat happo-emäs- ja redox-reaktiot, jotka voivat aiheuttaa proteiiniketjussa hydrolyysiä, hajoamista, ristikytkentöjä, hapetusta, deamidaatiota, β -eliminaatiota ja rasemisaatiota. Sekundääri- ja tertiäärirakenteet voivat muuttua proteiinin toimintaa haittaavilla tavoilla esimerkiksi irreversiibeillä konformaation tai laskostumisen muutoksilla. Proteiinit ovat myös herkkiä esimerkiksi pH:n, lämpötilan ja konsentraation muutoksille, jotka voivat aiheuttaa niissä esimerkiksi saostumista tai aggregaatiota. Lääkekäytössä proteiinien pitää myös kestää elimistön erilaisia entsyymejä.

Käytännön esimerkki *N*-glykosylaation tärkeydestä proteiinien tehokkuuden kannalta on ihmisen α -galaktosidaasi A:n glykosylaatio.²¹ α -galaktosidaasi A:n aktiivisuuden laskeminen elimistössä on edellä mainitun Fabryn taudin aiheuttaja. Aktiivisuuden laskun syy saattaa olla geenimutaatio, joka vaikuttaa α -galaktosidaasi A:n glykosylaatioon. Tutkimuksessa havaittiin, että normaalisti tässä glykoproteiinissa kolme asparagiinitähdettä Asn-139, Asn-192 ja Asn-215 olivat *N*-glykosyloituneet. Näistä tärkeimmäksi havaittiin Asn-215:n hybridityypin *N*-glykaani, joka teki entsyymistä liukoisen ja aktiivisen. Kun Asn-215:n glykaani poistettiin, se paljasti hydrofobisen pinnan, joka hankaloitti proteiinin liukenemista ja aiheutti sen aggregoitumista endoplasmakalvostolla. Asn-139:n ja Asn-192:n *N*-glykaanien poistaminen ei vaikuttanut yhtä merkittävästi entsyymien toimintaan. α -galaktosidaasi A:n rekombinantiversioita agalsidaasi alfaa ja beetaa voidaan käyttää Fabryn taudin hoidossa.¹⁵

Erilaisten sairauksien aiheuttamia muutoksia proteiinien ja lipidien glykaaneissa voidaan hyödyntää rokotteiden kehittämisessä.²² Esimerkiksi enemmistön syöpäsairauksista tiedetään aiheuttavan muutoksia solupinnan glykolipidien sekä *O*- ja *N*-glykoproteiinien glykaaneissa.²³ Esimerkkejä näistä muutoksista ovat katkenneet oligosakkaridiketjut ja *N*-asetyylineuramiinihapon eli siaalihapon yliesiintyminen. Kasvaimille ominaisten hiilihydraattiantigeenien (TACA) löytäminen on mahdollistanut näille antigeeneille spesifisten rokotteiden kehityksen.

1.2.3. (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatio

Ensimmäisenä sekundääristen hydroksyyliamiinien ja pelkistävien sokerien välistä glykosylaatiota tutkivat Peri ja Dumy vuoden 1998 tutkimuksessaan.³ He osoittivat, että reaktio on stereo- sekä kemoselektiivinen, ja että reaktio ei vaadi funktionaalisten ryhmien suojausta tai anomeerisen keskuksen aktivointia. Tutkimuksen reaktiot tehtiin joko vesipuskurissa (pH 4) tai polaarisisissa orgaanisissa liuottimissa, joka oli yleensä DMF:n ja etikkahapon sekoitus (Kaavio 3). Reaktiot pysäytettiin NaBH₃CN:llä. Saannot olivat pääosin hyviä, ja reaktio oli useimpien reaktanttien tapauksessa edennyt loppuun 20 tunnin kuluessa (Taulukko 1).



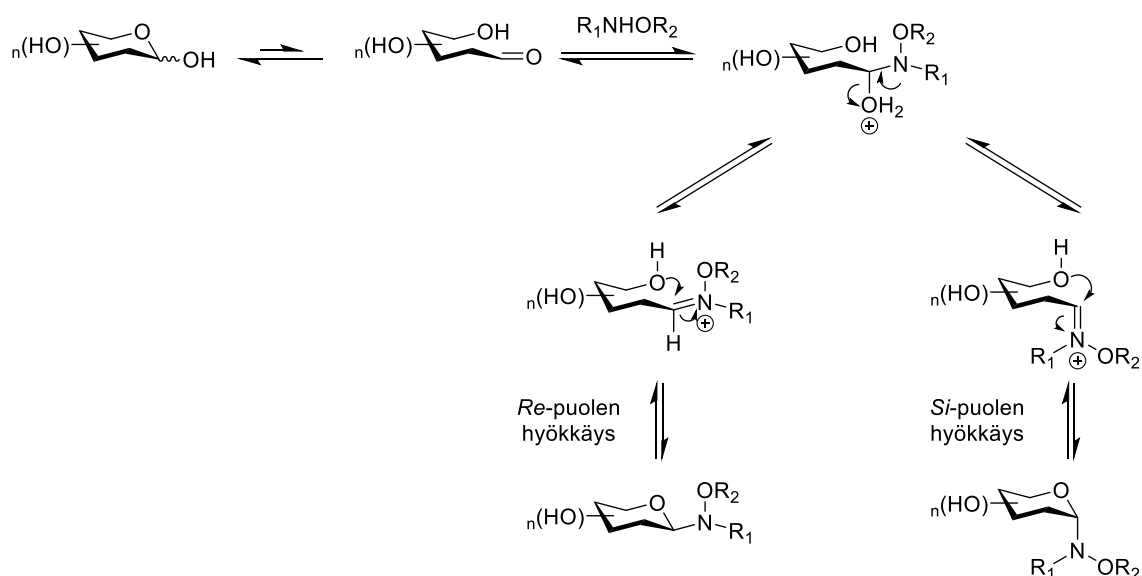
Kaavio 3. Yleisen hydroksyyliamiinin 11 glykosylaatio D-glukoosin 10 kanssa. R₁ ja R₂ taulukon 1 mukaisesti.

Tuotteet eristettiin ja analysoitiin NMR-spektrometrisesti. D-galaktofuranoosin ja D-mannoosin tapauksessa tuote oli seos pyranoosi- ja furanoosimuodoista, mutta muiden synteesien tapauksessa tuotteet olivat puhtaasti ⁴C₁-konformaatioissa pyranoosimuodossa. Lisäksi NMR-tutkimuksissa kävi ilmi, että D-mannoosituote oli puhtaasti alfa-konfiguraatioissa, kun taas muiden tuotteiden tapauksessa betakonfiguraatio oli suositumpi. Saantoa saattoivat pienentää *N*-asetyyli-glukosamiinin ja *N*-oktyyli-*O*-metyylihydroksyyliamiinin tapauksissa reaktiokeskuksen lähellä olevat steeriset esteet.

Taulukko 1. Hydroksyyliamiinien ja erilaisten pelkistävien sokerien välisten glykosylaatioiden saannot ja reaktioajat.³

Sokeri	R ₁	R ₂	Aika (h)	Saanto (%)
L-glukoosi	Et	Bn	20	90
D-glukoosi	Me	Me	20	92
N-asetyyilglukosamiini	Me	Me	20	40
D-galaktofuranoosi	Et	Bn	20	80
Laktoosi	Me	Me	60	95
D-mannoosi	Me	Me	144	60
D-glukoosi	Oktyyli	Me	20	30

(N-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaation mekanismissa nukleofiilinen N,O-substituoitu hydroksyyliamiini hyökkää elektrofiiliseen sokerin avoketjuisen muodon aldehdyryhmään. Tällöin muodostuu tetraedrinen välivaihe, josta vedynsiirron jälkeen irtoaa vesi. Tämän jälkeen tapahtuu tyypillisesti intramolekulaarinen syklisaatio, jossa yksi sokerin vapaista hydroksyyliiryhmistä hyökkää muodostuneen imiiniryhmän hiileen. Syklisaatio tuottaa termodynaamisesti pysyvemmän syklisen N-glykosidin (Kaavio 4).²⁴



Kaavio 4. (N-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaation mekanismi. Myös 4-hydroksyylin hyökkäys on mahdollinen, jolloin tuotteena saadaan vastaava pyranoosi.

Renkaan sulkeutumisesta vastaavat joko 4- tai 5-aseman hydroksyyliiryhmät. Jos 4-hiilen hydroksyyliiryhmä hyökkää välituotteena muodostuneen imiiniryhmän hiileen, tuotteena muodostuu sokerin furanosidi. 5-hydroksyylin hyökätessä saadaan vastaavasti sokerin

pyranosidi. Tämän vuoksi Peri ja Dumy saivat alkuperäisessä tutkimuksessaan D-galaktofuranoosin ja D-mannoosin tapauksissa reaktiosta tuotteena seoksen pyranoosi- ja furanoosituotteita.

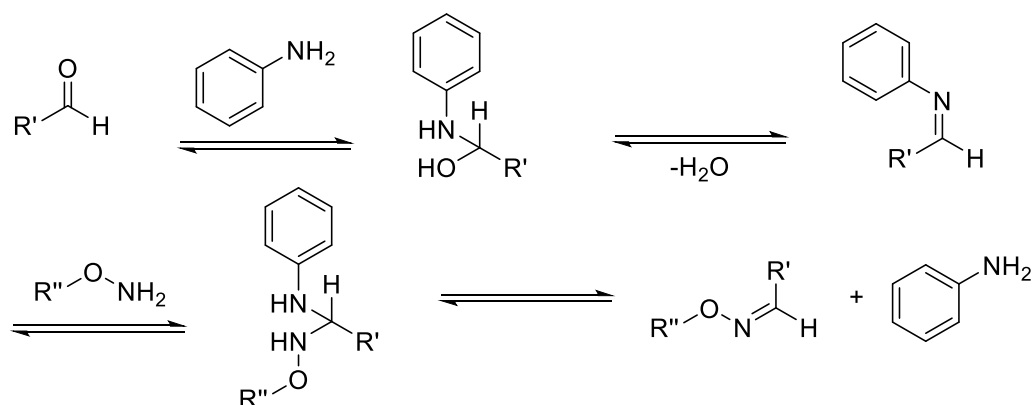
(*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaation kemoselektiivisyys verrattuna perinteiseen glykosylaatioon johtuu siitä, että hydroksyyliamiini reagoi nimenomaan pelkistävän sokerin avoketjuisen muodon aldehdyryhmän kanssa, eikä sitä sen vuoksi haittaa sokerissa läsnä olevat vapaat hydroksyyliiryhmät. Jos sokerissa on kuitenkin muita vapaita aldehdyryhmiä, hydroksyyliamiini voi reagoida niiden kanssa.

Reaktion tiedetään vaativan happamat olosuhteet. Myöhemmissä tutkimuksissa reaktion on havaittu toimivan pH-alueella 4–5,5²⁴, kun taas neutraaleissa ja emäksisissä olosuhteissa se ei etene.⁸ Alhaisen pH:n tarkoitus nopeuttaa veden irtoamista tetraedrisestä välituotteesta, mutta liian alhainen pH taas kuitenkin protonoi nukleofiilin ja hidastaa reaktiota. Reaktion nopeutta rajoittava vaihe on veden irtoaminen tetraedrisestä välivaiheesta.²⁵ pH:ta neljästä kuuteen nostaessa reaktion saannon voidaan havaita paranevan, mutta samalla se hidastuu merkittävästi. Esimerkiksi 5'-*O*-metyyliamiinymidiinin ja glukoosin välisen reaktion saannon nähtiin paranevan näin 25 %:sta noin 42 %:iin, mutta samalla reaktion puoliintumisaika nousi noin kolmestakymmenestä tunnista sataan päivään.⁸

Tyypillisesti reaktio tehdään haluttuun pH-arvoon säädetyssä puskuriliuoksessa. Veden lisäksi muita tavallisesti käytettyjä liuottimia ovat polaariset aproottiset liuottimet kuten DMSO ja DMF, mutta myös metanolin tiedetään toimivan. Perin ja Dumyn alkuperäisessä tutkimuksessa reaktio tehtiin huoneenlämmössä, mutta lämpötilan nostaminen 40 °C:een tiedetään parantavan saantoja ja nopeuttavan reaktiota.²⁴ Toinen tapa parantaa saantoa ja nopeuttaa reaktiota on kasvattaa reaktiossa reaktanttien konsentraatiota. Reaktio tunnetaan nykyään myös toisella nimellä neoglykosylaationa ja sen muodostamat reaktiotuotteet neoglykosideina.²⁴

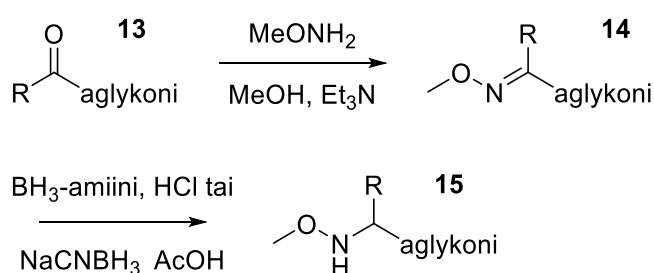
Jos reaktio pitää tehdä hyvin pienessä konsentraatiossa tai neutraalissa pH:ssa esimerkiksi jonkin reaktantin happolabiiliuden vuoksi, reaktiota voidaan nopeuttaa myös nukleofiilisillä katalyyteillä. Varsinkin biologisissa sovelluskohteissa, joissa yleisesti vaaditaan neutraalia pH:ta, voidaan tarvita katalyyttiä. Erityisesti aniliinin ja aniliinijohdannaisten on havaittu katalysoivan aldehdydin ja oksiimin välistä ligaatiota (Kaavio 5).²⁵ Myös jotkut muut nukleofiilit kuten esimerkiksi glysiini, 5-metoksiantraniilihappo ja *m*-fenyleeniamiini katalysoivat reaktiota.

Aniliinijohdannaisten substituenttien tiedetään vaikuttavan niiden katalyyttiseen tehokkuuteen reaktiossa. Esimerkiksi Jensen tutkimusryhmineen osoittivat *p*-metoksianiliinin olevan tehokkaampi katalyytti kuin aniliini.²⁶



Kaavio 5. Aniliinin katalysoima aldehydin ja oksiimin välinen ligaatio. R' on sokeri ja R'' sokeriin liitettävä aglykoniosa. Reaktion jälkeen yksi sokerin vapaista hydroksyyliiryhmistä hyökkää tyypen kaavion 4 mukaisesti.

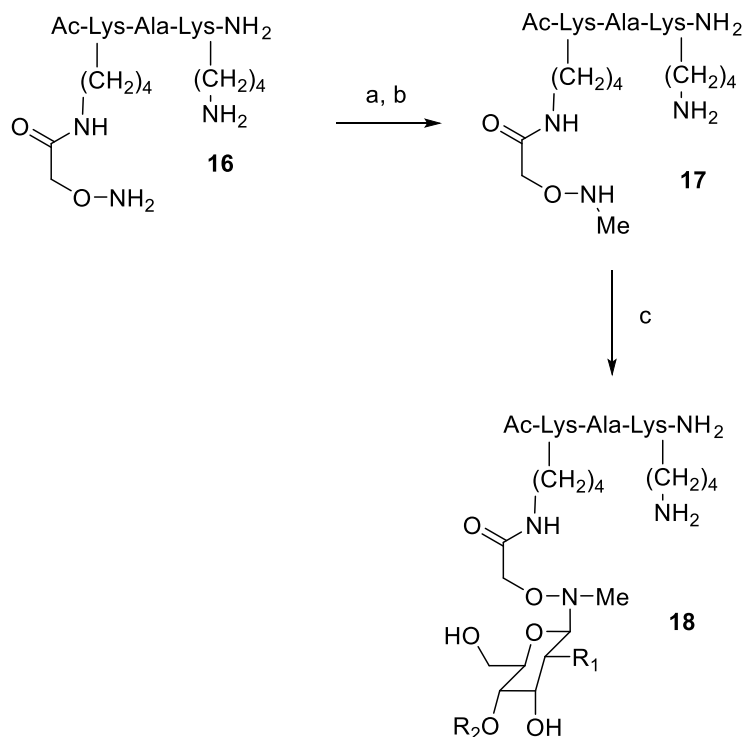
Reaktion sopivan aglykonimolekyylin synteesi on myös (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaation kannalta olennainen osa. Tyypillisin tapa liittää vaadittava alkoksiamiiniryhmä aglykoniosaan on kaaviossa 5 esitetty yksinkertainen kaksivaiheinen pelkistävä aminaatio.²⁴ Aminaation ensimmäisessä vaiheessa aglykoniosan vapaa ketoni tai aldehydi kondensoituu alkoksiamiinin kanssa heikon emäksen läsnä ollessa.. Toisessa vaiheessa muodostunut imiini pelkistetään polaarissa liuottimessa.



*Kaavio 5. Tyypillinen tapa liittää (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaation vaatima metoksiamiini yleiseen aglykoniin **13**. R = H tai alkyyliiryhmä*

Peri ja Dumy osoittivat vielä alkuperäisessä tutkimuksessaan³, että (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatiota voidaan hyödyntää myös esimerkiksi peptidien β -*N*-glykosylaatioon. He hyödynsivät primääristä amino-oksipeptidiä **16**. Synteesissä (Kaavio 6) muodostettiin ensin formaldehydioksiimi, joka pelkistettiin tuotteeksi **17**

(Reaktiot 6a-b). **18**:een liitettiin erilaisia D-glukoosijohdannaisia (Reaktio 6c). Reaktio oli kemoselektiivinen, eikä vaatinut suojaryhmiä muualla peptidissä.



Kaavio 6. Aminoksipeptidin pelkistys ja kemoselektiivinen glykosylaatio erilaisilla D-glukoosijohdoksilla. a) CH₂O, pH 4 natriumasetatipuskuriliuoksessa, b) NaBH₃CN, AcOH, c) pH 4 natriumasetatipuskuriliuoksessa, 60 °C, sokeri

Tämän tutkimuksen tuloksia on hyödynnetty monissa myöhemmissä tutkimuksissa erilaisten glykokonjugaattien synteeseissä.^{4,28-31}

1.2.4. (N-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatio glykokonjugaattien synteessissä

Kuten edellä mainittua, glykokonjugaateilla on tärkeä rooli monissa biologisissa prosesseissa, ja Perin ja Dumyn alkuperäisen tutkimuksen tulosten perusteella (N-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatiolla on helppo valmistaa muun muassa erilaisia luonnollisia biomolekyylejä hyödyntäen laaja kirjo monimuotoisia glykosyloituja molekyylejä. Vaikka reaktiossa muodostuneet tuotteet eivät sisällä luonnollista glykoniglykonisidosta, biologisen aktiivisuuden kannalta tärkeä sokeriysikön konformaatio säilyy. Tämän ansiosta reaktiotuotteita voidaan hyödyntää luonnollisten elimistössä aktiivisten biomolekyyliden jäljitelminä.

Yksi neoglykosylaation tärkeimmistä sovelluskohteista on neoglykosatunnaistaminen.²⁴ Neoglykosatunnaistamisessa tarkoituksena on valmistaa suuri kirjasto glykosyloituja

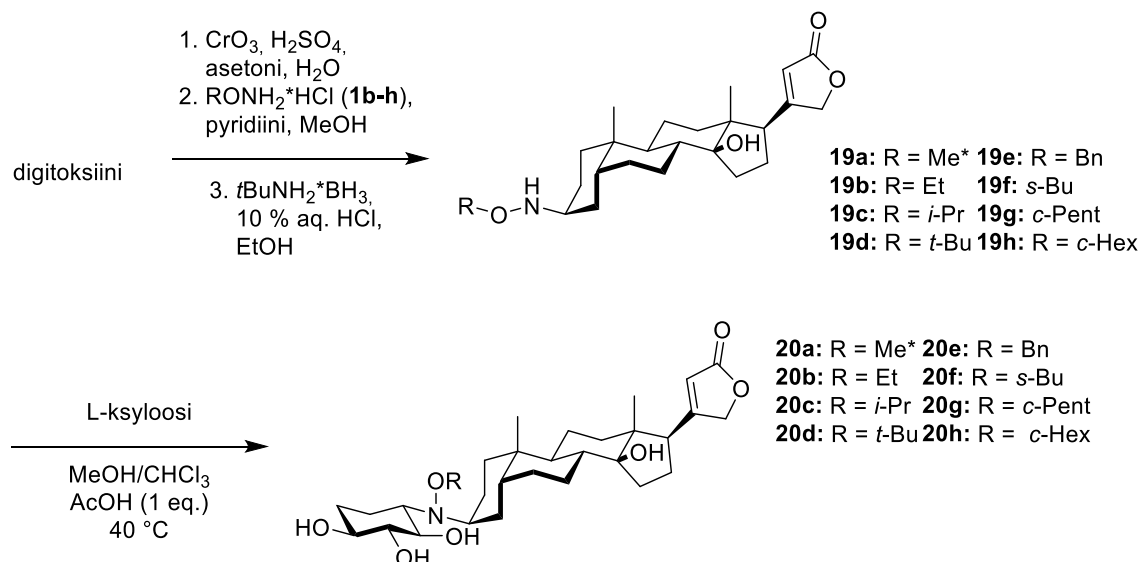
molekyylejä, jotka eroavat toisistaan vain niihin liitetyn sokerin osalta. Tutkittavat molekyylit ovat tyypillisesti luonnonyhdisteitä tai pienmolekyylilääkkeitä, joiden farmakologisia ominaisuuksia halutaan parantaa löytämällä tarkoitukseen parhaiten soveltuva sokeriosa. Neoglykosylaatio on tähän tarkoitukseen tehokas ja yksinkertainen reaktio. Reaktiot voidaan tehdä mikrogrammaskaalassa muutaman millilitran pulloissa. Reaktion valmistuttua liuos voidaan kuivata vakuuissa ja puhdistaa kiinteäfaasiuutolla ja tarvittaessa vielä HPLC:llä. Nämä prosessit ovat usein automatisoitavissa, jonka vuoksi suuren molekyylikirjaston valmistus on helppoa. Synteesin ja puhdistuksen jälkeen molekyylikirjaston farmakologisia ominaisuuksia voidaan tutkia, ja tällä tavalla löytää haettuun tarkoitukseen tehokkain lääke.

Esimerkki tällaisesta lääkeaineen optimoinnista on Langenhanin tutkimusryhmän artikkeli.⁴ Tutkimuksessaan Langenhal et al. hyödyntävät (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatiota erilaisten digitoksiiniglykosidien syntetisointiin. Digitoksiiniglykosideja on käytetty perinteisesti sydänglykosideina sydämen vajaatoiminnan ja rytmihäiriön hoidossa, mutta myöhemmin niiden on havaittu toimivan myös syöpäkasvainten vastaisena solumyrkkinä.³² Parhaiksi solumyrkyiksi on havaittu neotoksiinin L-ribosidi- ja L-glukosidijohdannaiset, jotka ovat syntetisoitu hyödyntämällä *N*-alkoksiamiiniglykosylaatiota. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää sopiva synteesi neotoksiiniglykosideille ja valmistaa laajempi kirjasto erilaisia neotoksiiniglykosideja, joiden solumyrkyllisyyttä syöpäsoluja vastaan arvioitiin. Aiemmassa tutkimuksessa²⁷ Langenhan tutkimusryhmineen osoitti, että erilaisilla oksiamiinisidosmodifikaatioilla voidaan parantaa neotoksiiniglykosidien selektiivisyyttä kasvaimiin.

Optimoitu reaktio on esitetty kaaviossa 7. Ensimmäisessä vaiheessa redox-reaktio tuottaa digitoksigenonin, josta saadaan oksiiimeetterit käsittelemällä digitoksigenonia alkoksiamiineilla. Pelkistys *tert*-butyyliamiiniboraanilla 10 % vetykloridin ja etanolin seoksessa tuotti yhdisteet **19a-19h** sekä näiden yhdisteiden C-3 α -stereoisomeerin, joka erotettiin seoksesta. **19a-19h** reagoivat 40 °C:ssä L-ksyloosin ja etikkahapon kanssa metanolin ja kloroformin seoksessa, tuottaen digitoksiinineoglykosidit **20a-20h**.

Syntetisoitujen digitoksiiniglykosidien solumyrkyllisyyttä arvioitiin kahdeksaa eri ihmisen syöpäsolulinjaa vastaan. Eri sivuryhmien havaittiin vaikuttavan solumyrkyllisyyteen sekä tehokkuuden että selektiivisyyden kannalta. Erityisesti esiin nousivat glykosidit **20c** ja **20f-h**, jotka havaittiin selektiivisemmiksi verrattuna digitoksiiniin ja muihin glykosidijohdannaisiin. Esimerkiksi **20c** oli kaksinkertaisesti

voimakkaampi solumyrkky NCI/ADR-RES-soluja vastaan kuin mikään muu arvioiduista glykosideista. Glykosidit **20f-20h** olivat taas selektiivisempiä A549-soluja vastaan. Näistä esimerkiksi **20h** oli noin kolminkertaisesti vahvempi A549-soluja kuin muita solulinjoja vastaan.



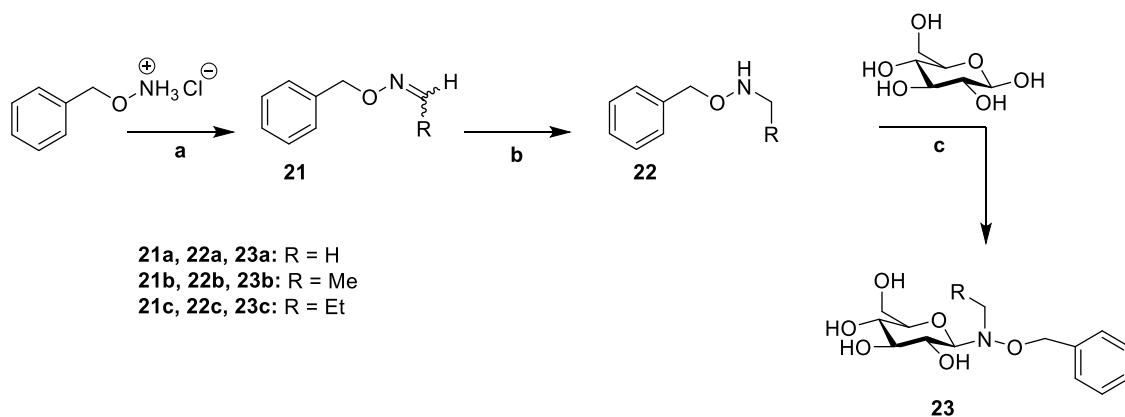
Kaavio 7. Digitoksiinineoglykosidien synteesi. Tähdellä merkitty tuote syntetisoitiin muista poiketen edeltävän tutkimuksen²⁸ mukaisesti.

Koska neoglykosylaatio on reversiibeli reaktio, sillä voidaan liittää tarvittavia funktionaalisia ryhmiä molekyyliin väliaikaisesti. David Teze et al. syntetisoivat²⁹ neoglykosylaatiota hyödyntäen glykokonjugaattiakseptoreita entsyymattista glykosylaatioreaktiota varten. Entsyymattisessa synteesissä entsyyminä hyödynnetään glykosyntaasia tai transglykosidaasia. Entsyymattiset glykosylaatioreaktiot ovat tavallisiin ei-entsyymattisiin verrattuna regio- ja stereoselektiivisempiä. Entsyymattisessa glykosylaatioissa on kuitenkin omat haasteensa. Glykosyloitavaan hiilihydraattiin vaaditaan usein glykosyntaasin ja transglykosidaasin tapauksessa fenyyliryhmä, jotta se sopisi entsyymin aktiiviseen kohtaan. Fenyyliryhmät on kuitenkin hankala poistaa rikkomatta muodostettuja glykosidisia sidoksia.

Tämän vuoksi Teze et al. valmistivat erilaisia aromaattisia glykokonjugaatteja hyödyntäen (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatiota. Nämä bentsyyliryhmän sisältävät glykokonjugaatit sopivat edellä mainittujen entsyymien aktiivisiin kohtiin. Lisäksi liitetty hydroksyyliamiiniosa saadaan irrotettua heikosti happamissa olosuhteissa.

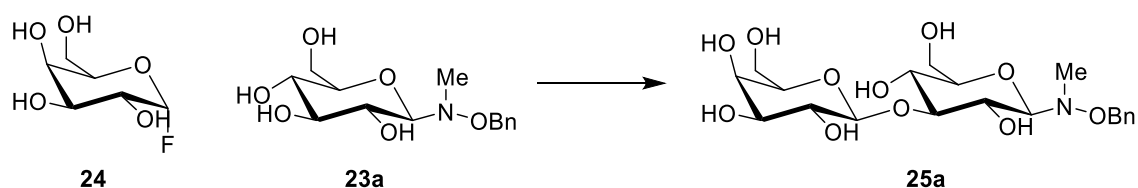
Kaaviossa 8 on esitetty akseptorien **23a-c** synteesi. Aluksi valmistettiin *O*-bentsyylioksiimit, jotka pelkistettiin niitä vastaaviksi *N*-metyyli-*O*-

bentsyylihydroksyyliamiineiksi. Hydroksyyliamiinit glykosyloitiin, ja lopulta saatiin haluttu glykokonjugaattiakseptori.



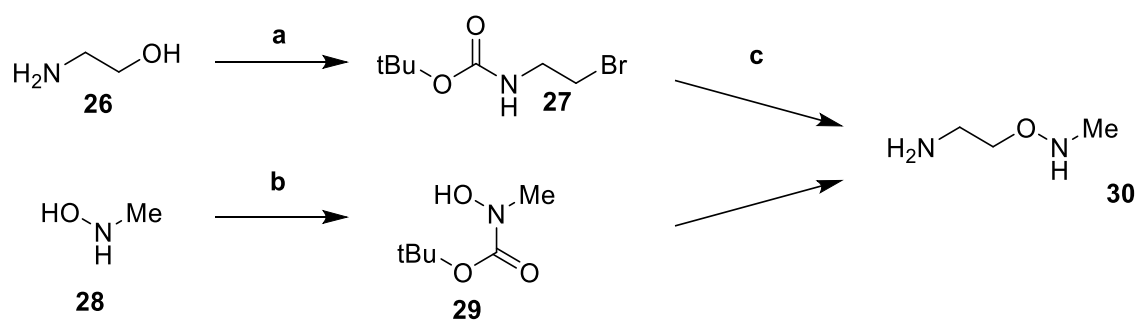
Kaavio 8. Akseptorien 23a-c kemoselektiivinen synteesi. a) AcONa, H₂O/MeOH 4:1, aldehydi tai ketoni (3 eq.), 95-97%; b) NaCNBH₃, EtOH, HCl, 80-89%; c) THF/AcOH 3:1, 43-86%.

Kaaviossa 9 on esitetty akseptorin **23a** toiminta entsyymaattisessa oligosakkaridisynteesissä. Akseptorit **23a-c** olivat hyviä substraatteja glykosyntaaseille ja niiden avulla di- ja trisakkarideja syntetisoitiin hyvillä saannoilla.



Kaavio 9. Akseptorin 23a transglykosylaatio galaktosyylifluoridin 24 toimiessa donorina. Reaktio tehtiin 55 °C ammoniumvetykarbonaattipuskurissa pH:ssa 7,8 ja glykosyntaasi E338G:n toimiessa entsyyminä. Saanto oli 87%.

Bohorov et al. hyödynsivät (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatiota glykaanien valmistukseen glykaanisiruteknologiaa varten.³⁰ Glykaanisirut sisältävät laajan kirjaston erilaisia glykaaneja immobilisoituna siruun, ja tämän sirun avulla voidaan muun muassa tutkia glykaanien ja proteiinien välisiä interaktioita. Haasteena tämän tutkimusmenetelmän hyödyntämisessä on kuitenkin ollut glykaanien syntetisointi ja kiinnittäminen siruun, johon Bohorov et al. esittävät ratkaisuksi bifunktionaalisoitua linkkeriä, joka sisältää toisessa päässä (*N*-metyyli)alkoksiamiinin ja toisessa päässä primäärisen amiinin. (*N*-metyyli)alkoksiamiinipuoli voidaan kiinnittää erilaisiin hiilihydraatteihin (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatiolla, kun taas vapaa primäärinen amiini voidaan kiinnittää siruun. Linkkerin **30** synteesi on esitetty kaaviossa 10.



Kaavio 10. Bifunktionaalisen 2-amino-metyyli-*N,O*-hydroksietyylilinkkerin **30** synteesi.

a) 1. *t*-Bu₂CO₃, TEA 2. MsCl, TEA 3. LiBr. b) *t*-Bu₂CO₃, TEA c) 1. NaH, DMF 2. TFA

Linkkerin **30** synteessin jälkeen tutkimusryhmä hyödynsi sitä erilaisten glykokonjugaattien synteessissä. Haluttu oligosakkaridi ja ylimäärä linkkeriä liuotettiin happamaan vesipuskuriin, ja niiden annettiin reagoita 24-48 h. Saannot olivat lähes kvantitatiivisia.

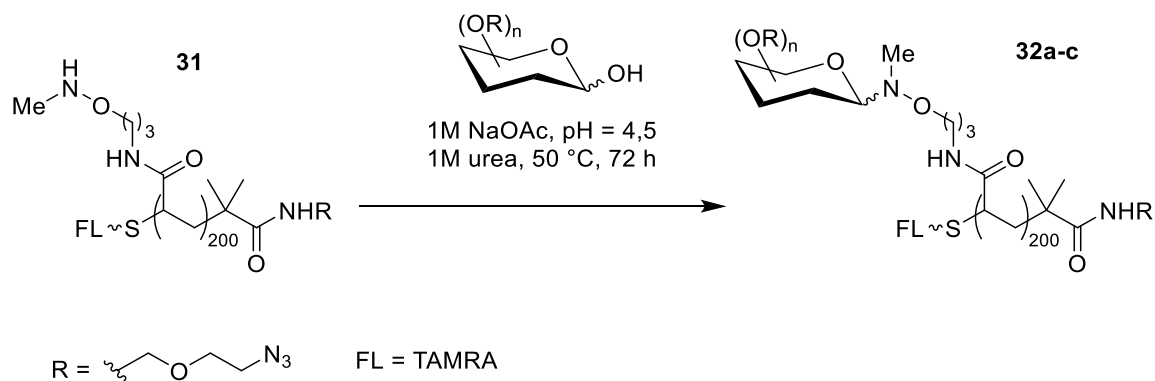
Kehitetyllä menetelmällä on useita etuja verrattuna aikaisemmin käytettyihin glukaanisirumenetelmiin kuten pelkistävän aminaation käyttöön. Tämä menetelmä säilyttää oligosakkaridien rakenteen ja pitää rengasrakenteet suljettuina. Toisen pään primäärinen amiini mahdollistaa glykaanien helpon liittämisen siruihin proteiini-glykaani-interaktiotutkimuksia varten. Glykokonjugaattien synteesi on yksivaiheinen one-pot-synteesi, ja syntetisoidut glykokonjugaatit ovat stabiileja.

Godula tutkimusryhmineen kehitti edellä mainittua glykaanisiruteknologiaa hyödyntäen mallin, joka approksimoi luonnollista limakalvojen glykaanitarjontaa.³¹ Heidän tavoitteenaan oli kehittää tutkimusmenetelmä, jonka avulla voidaan tutkia influenssavirusten sitoutumista erilaisiin limakalvoproteiineihin.

Glykaanisirujen valmistamiseksi tutkimusryhmä syntetisoi ensin polymeerin **31**, joka sisälsi reaktiivisen (*N*-metyyli)alkoksiamiinin. Tähän reaktiiviseen keskukseen liitettiin (*N*-alkyyli)alkoksiamiiniglykosylaatiolla eri glykaanit (Kaavio 11). Molekyylin toisessa päässä on atsidoryhmä, jonka avulla valmistettu glykopolymeeri voidaan liittää syklo-oktyyneillä peitettyyn siruun. Lisäksi glykopolymeeri sisältää fluoresoivan TAMRA-ryhmän.

Glykopolymeerien **32a-c** liittämiseksi siruun ne liuotettiin puskeriin ja siirrettiin siruille eri konsentraatioissa. Sirujen annettiin olla yön yli 4 °C:ssä, jonka aikana glykopolymeerit sitoutuivat siruun atsidiryhmän ja alkyyneiryhmän välisellä reaktiolla. Sirut pestiin pesuliuksella (0,1 % Triton X-100:a PBS:ssä) ylimääräisten

reagoimattomien polymeerien poistamiseksi, jolloin saatiin lopullinen toimiva glykaanisiru.



Kaavio 11. Glykopolymeerien synteesi. 32a:ssa glykaani oli laktoosi, 32b:ssä 3'-sialyl-laktoosi ja 32c:ssä 6'-sialyl-laktoosi.

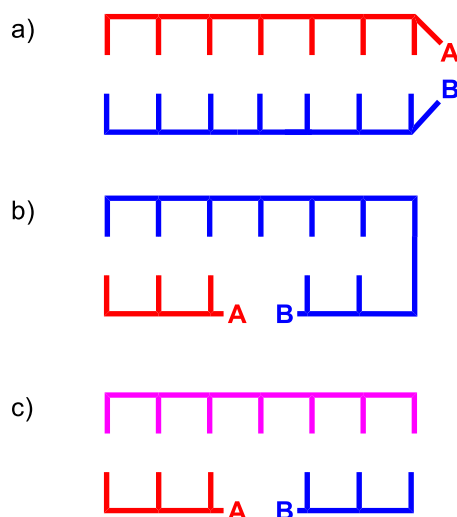
1.3. DNA-templatoitu synteesi

1.3.1. Yleistä DNA-templatoidusta synteesisistä

Yksi luonnon työkaluista reaktioiden säätelyyn ja ohjaamiseen soluissa on oligonukleotiditemplatoitu synteesi.⁵ Solut ovat kemiallisena ympäristönä monimutkaisia: ne sisältävät tuhansittain erilaisia kemikaaleja, konsentraatiot ovat usein pieniä ja reaktiot tapahtuvat vesiliuoksessa.³³ Nukleiinihapot voivat Watson-Crick-vetyisitoutumisen kautta ohjata erilaiset reaktantit oikeille paikoilleen, ja näin esimerkiksi solussa tapahtuu DNA-replikaatio, jossa DNA-kaksoiskierre hajoaa yksittäisiksi juosteikseen ja niihin syntetisoituvat uudet komplementaariset juosteet tumassa olevista nukleotideistä. Muita esimerkkejä nukleiinihappojen solussa katalysoimista reaktioista ovat muun muassa transkriptaasi ja RNA:n ohjaamat proteiinisynteesit.

Oligonukleotidien templatoimat synteetit perustuvat kaikki samaan periaatteeseen: oligonukleotidijuosteisiin on liitetty reaktiivisia ryhmiä, jotka oligonukleotidien hybridisoituessa hakeutuvat reaktion kannalta sopivalle etäisyydelle toisistaan ja hybridisaatio kasvattaa oligonukleotideihin sitoutuneiden reaktanttien efektiivistä konsentraatiota. Reaktantit voivat vaihdella yksittäisistä aktivoituista nukleotideistä tai nukleotidijohdannaisista aina pidempiin templaatin kanssa komplementaariisiin oligonukleotidiketjuihin. Pidemmät ketjut ovat selektiivisempiä erilaisten DNA- ja RNA-juosteiden kanssa, jota voidaan hyödyntää esimerkiksi lääkinnällisissä sovelluksissa.

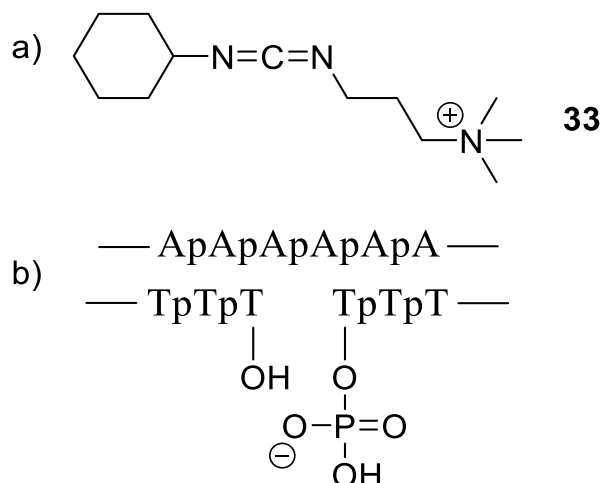
Kuvassa 5 on esitetty erilaisia mahdollisia arkkitehtuureja kahden oligonukleotidin väliselle templatoidulle reaktiolle. Punaisen ja sinisen oligonukleotidin päihin on liitetty toistensa kanssa reaktiiviset ryhmät, jotka on tarkoitus ohjata toistensa lähelle hyödyntämällä jotain näistä templatointistrategioista. Yksi mahdollisuus on tehdä oligonukleotideistä täysin komplementaarisia, jolloin reaktiiviset ryhmät ovat oligonukleotidin päissä ja näin oligonukleotidien hybridisoituessa asettuvat toistensa lähelle (Kuva 5a). Toinen mahdollisuus on hyödyntää hiusneulamallia, jossa toinen oligonukleotidi on osittain itsensä kanssa komplementaarinen ja ylitse jäävä häntäpää on toisen reaktantin kanssa komplementaarinen (Kuva 5b). Kolmas mahdollisuus on hyödyntää kolmatta erillistä pidempää templaattioligonukleotidia, joka ei osallistu reaktioon ollenkaan hybridisaation lisäksi (Kuva 5c).



Kuva 5. Yleiset arkkitehtuurit kahden oligonukleotidin väliselle templatoidulle ligaatioreaktiolle. A ja B ovat reaktiivisia ryhmiä.

Kemistejä DNA-templatoidussa oligonukleotidisynteesissä kiinnostaa sen kemialliset ja biologiset sovellukset kuten nukleinihappojen havaitseminen, sekvenssiselektiiviset DNA-modifikaatiot ja mahdollisuudet kombinatoristen kirjastojen syntetisointiin tai niiden merkitsemiseen. Solujen sisäiset reaktiot tapahtuvat useimmiten entsyymaattisesti, mutta kemistit pystyvät aktivoimaan reaktantit myös ei-entsyymaattisesti. Tämän ansiosta tuotteiden ei tarvitse sisältää tavallisia luonnossa esiintyviä nukleotidien välisiä fosfodiesterisidoksia tai edes niitä muistuttavia rakenteita, vaan on onnistuttu myös luomaan DNA-templatoidusti molekyyliä, joiden väliset sidokset eivät muistuta millään tavalla tavallista DNA-runkoa.³⁵⁻⁴² DNA-templatointi mahdollistaa reaktiot myös pienemmissä konsentraatioissa ja kasvattaa reaktionopeutta.

Naylor tutkimusryhmineen julkaisi ensimmäisen ei-entsymaattisen oligonukleotidien välisen DNA-templatoitun kemiallisen ligaation vuonna 1966.³⁴ Ligaatioreaktio oli tymidiiniheksanukleotidien välinen fosfodiesterisidoksen muodostuminen. Oligonukleotidien 3'-pään fosfaattiryhmä aktivoitiin vesiliuoksessa EDC:llä **33** (Kuva 6a). Tämän jälkeen aktivoitu fosfaatti reagoi toisen oligonukleotidin 5'-pään hydroksyyliiryhmän kanssa, muodostaen halutun fosfodiesterisidoksen.



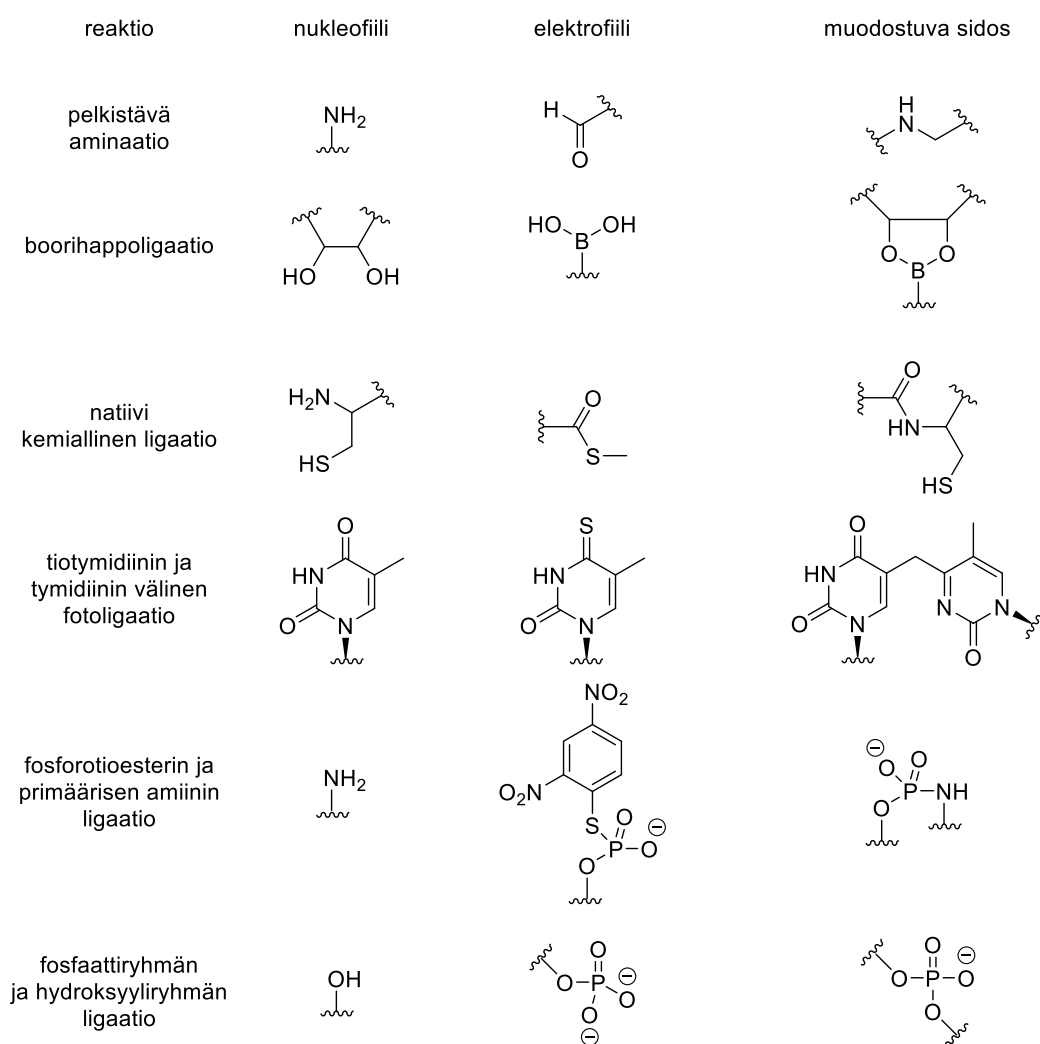
Kuva 6. a) Fosfaattiryhmän aktivointiin käytetty karbodi-imidi EDC **33**. b) polyadenylaatin ja tymidiinioligonukleotidien välinen Watson-Crick-pariutuminen.

Templaattina tutkimusryhmä käytti polyadenylaattia (Kuva 6b). Tymidiiniheksanukleotidi ja polyadenylaatti liuotettiin 1M natriumkloridin vesiliuokseen, jonka pH säädettiin kuuteen ja lämpötila -3 °C:een. Liuokseen lisättiin karbodidi-imidiä **33**, ja tymidiiniheksanukleotidien annettiin reagoida 4 päivää. Reaktioseoksesta eristettiin tuote, joka karakterisoitiin tymidiinidodekanukleotidiksi. Tuotetta saatiin 5% saannolla. Reaktio toistettiin vielä kahdesti sekä ilman polyadenylaattia että ilman EDC:tä, jolloin ligaatiota ei tapahtunut. Tämä osoittaa polyadenylaatin ja EDC:n katalyyttisen roolin reaktiossa. Lisäksi reaktio tehtiin myös tymidiinipentanukleotidia käyttäen, jolloin tuotteena saatiin tymidiinidekanukleotidi.

Luultavimmin alhaisen saannon syy on polyadenylaatin ja tymidiininukleotidien välisen Watson-Crick-pariutumisen epäspesifisyys. Osa tymidiininukleotideistä voi sitoutua polyadenylaattiin sellaisella tavalla, että ne ovat liian kaukana toisistaan reagoidakseen keskenään, tai vastaavasti liian lähelle toisiaan, jolloin reaktiolla ei ole tilaa tapahtua.

1.3.2. Esimerkkejä DNA-templatoidusta ligaatiosta oligomeerien synteesissä

Kuten mainittua, DNA-templatoinnin avulla voidaan syntetisoida oligonukleotidien välille monimuotoisia sidoksia, joiden ei tarvitse muistuttaa luonnollisten nukleotidien välisiä reaktioita millään tavalla. Tässä kappaleessa esitettävät reaktiot ja niiden oligonukleotidien välille muodostamat sidokset ovat esitetty lyhyesti kuvassa 7. Näistä reaktioista vain yhdessä esiintyy fosfodiesterisidos.

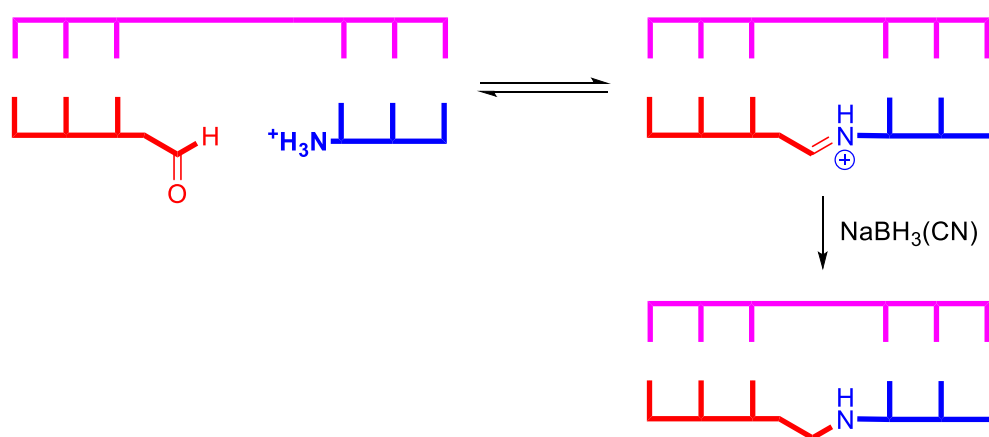


Kuva 7. Tässä kappaleessa esitettävät oligonukleotidien väliset ligaatioreaktiot³⁵⁻⁴³

Reversiibelien, dynaamisten ja ei-entsymaattisten nukleotidien välisen ligaatioreaktioiden on epäilty vaikuttaneen varhaisten biomolekyylien prebioottiseen molekulaariseen evoluutioon. Tällaiset varhaiset molekyylit olisivat pystyneet katkaisemaan ja muodostamaan uusia sidoksia erilaisten ympäristökijöiden kuten lämpötilan, pH:n tai samassa liuoksessa olevien molekyylien vuoksi. Näin syntyisi dynaaminen, ympäristöönsä mukautuva molekyyljärjestelmä.³⁵

Yksi esimerkki tällaisesta reversiibelistä reaktiosta on pelkistävä aminaatio. Lynn tutkimusryhmineen lähti tutkimaan tämän reaktion toimivuutta DNA-templaatin katalysoimana tavoitteenaan löytää sopiva reaktio DNA:n polymerisaation tutkimiseen.³⁶ Heidän tutkimustaan ennen DNA-templatoidun synteessin tutkimus oli keskittynyt enemmän irreversiibleihin reaktioihin oligonukleotidien välillä, jolloin niiden välinen reaktio tapahtuu kineettisellä kontrollilla. Reversiibeli reaktio mahdollistaisi templaatin ja reagoivien oligonukleotidien välisen termodynamiikan säätää reaktiota, koska termodynaamisesti epävakaampien tuotteiden välinen sidos voi katketa. Tämän vuoksi lopulta saadaan termodynaamisesti suosituin tuote, eikä esimerkiksi sattumalta templaatin kanssa ei-komplementaaristen reaktanttioligonukleotidien välisiä irreversiibelisti reagoineita tuotteita.

Tutkimuksessaan Lynn tutkimusryhmineen liitti DNA-trimeerin 3'-päähän allyyliryhmän ja toisen DNA-trimeerin 5'-päähän aminoryhmän. Allyyliryhmä muutettiin aldehydiksi OsO₄:llä ja NaIO₄:llä, ja reaktion ensimmäinen vaihe tapahtuu aldehydin ja amiinin välillä trimeerien kanssa komplementaarisen heksameerin toimiessa templaattina, muodostaen oligonukleotidien välille imiinisidoksen (Kaavio 12). Reaktion jälkeen muodostunut imiinisidos voidaan pelkistää esimerkiksi natriumsyanoborohydridillä ja näin lukita sidos irreversiibelisti amiinisidokseksi.



Kaavio 12. Lynnin tutkimuksen mukainen kahden trimeerin välinen pelkistävä aminaatio

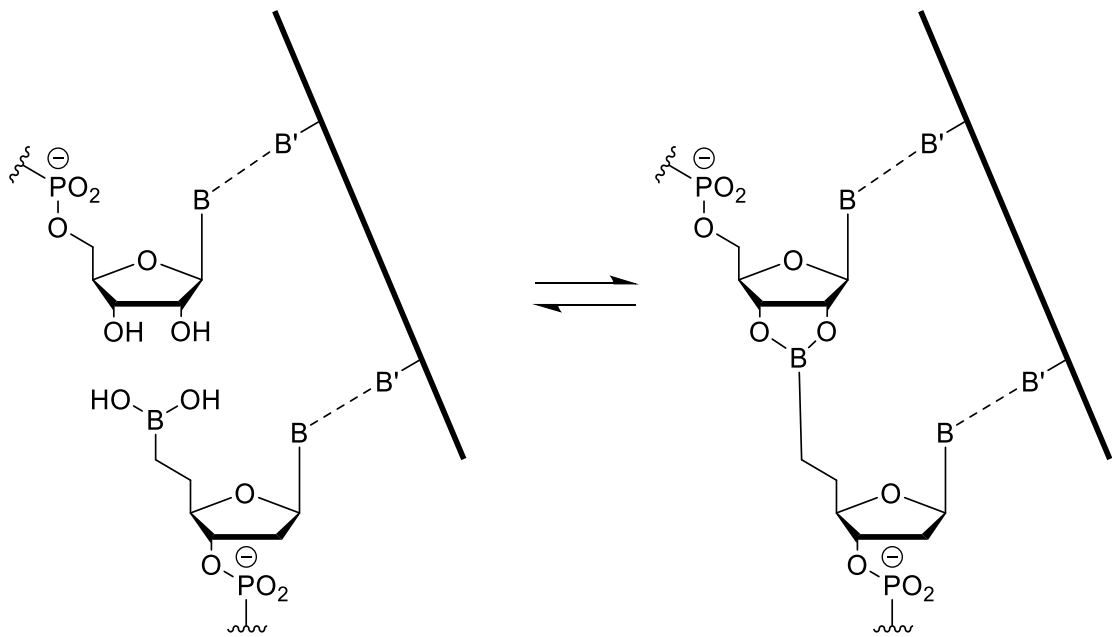
Tutkimusryhmä osoitti myös erikseen reaktion sekvenssiselektiivisyyden lisäämällä reaktioon templaatin kanssa ei-komplementaarista tetrameeriä, jonka 5'-päähän oli liitetty amiiniryhmä. 0 °C:ssä komplementaarista tuotetta muodostui yli 30-kertaisesti ei-komplementaariseen tuotteeseen verrattuna, kun kilpailevaa ei-komplementaarista

tetrameeriä oli yksi ekvivalentti verrattuna vastaavaan komplementaariseen 5'-aminotriimeeriin.

Myöhemmässä tutkimuksessa Lynn tutkimusryhmineen hyödynsi pelkistävää aminaatiota alkuperäisten tavoitteidensa mukaisesti mononukleotidien polymerisoinnissa DNA-templaattia mukailleen.³⁷ Monomeereinä he käyttivät 5'-amino-3'-formyylylimidiiniä, ja templaattina adenosiinioktameeriä. Monomeerien välisestä templatoidusta reaktiosta he saivat odotetun oktameerisen tuotteen yli 80 % saannolla. Tutkimusryhmä osoitti myös, että monomeerien välinen reaktio ei tapahdu ilman templaattia eikä ei-komplementaarisella templaatilla. Reaktio ei myöskään tuottanut templaattia pidempiä tuotteita.

Tämä tutkimus oli ensimmäinen, jossa haluttu monomeereistä syntetisoitu oligomeerituote muodostui näin hyvällä saannolla ja sekvenssiselektiivisyydellä.³⁰ Aikaisemmissa tutkimuksissa syntetisoidut oligonukleotidit olivat myös olleet lyhyempiä ja eivät hyödyntäneet koko templaatin mittaa reaktiossa. Tämän tutkimuksen perusteella DNA-templatoitu polymerisaatio on toimiva ja tehokas työkalu, jolla voidaan polymerisoida lyhyemmistä DNA-ketjuista sekvenssiselektiivisesti halutun pituisia DNA-oligomeerejä.

Reversiibelin reaktion ajatuksen pohjalta myös Vasseur tutkimusryhmineen esitti boorihapon ja diolin väliseen kondensaatioon perustuvan oligonukleotidien DNA-templatoitun kemiallisen ligaatiomenetelmän (Kaavio 13).³⁵ Reaktio on edellä kuvatun mukaisesti dynaaminen, reversiibeli ja ei-entsymaattinen. Reaktiossa toisen oligonukleotidin 5'-pää on korvattu sopivalla boorihapolla, joka syklisoituu oikeissa reaktio-olosuhteissa toisen oligonukleotidin 3'-pään ribonukleotidin diolin kanssa. Boorihapon tiedetään olevan heikko Lewisin happo, jonka vuoksi reaktiota voidaan kontrolloida pH:n muutoksilla. Emäksisessä pH:ssa tapahtuu boorihapon ja diolin välinen ligaatio, ja taas pH:ta laskiessa tarpeeksi muodostunut sidos hajoaa. Dupleksin sulamislämmön voidaan havaita nousevan ligaation tapahduttua.



Kaavio 13. Reversiibeli DNA-templatoitu boorihappoligaatio

Tästä reaktiosta mielenkiintoisen tekee nimenomaan DNA-templatoinnin mahdollistama oligomeerien itsejärjestäytyminen sekä reaktion kyky mukautua sen ympäristöön dynaamisesti riippuen esimerkiksi pH:sta. Tällaista reaktiota voidaan hyödyntää esimerkiksi dynaamisessa kombinatorisessa kemiassa, jossa dynaamisen ja reversiibelin reaktion avulla voidaan valikoida molekyylikirjastosta optimaalinen rakenne. Lisäksi tutkimus kertoo boorin mahdollisesta roolista prebioottisessa kemiassa.

Jatkoartikkelissa³⁸ tutkimusryhmä esitti tähän reaktioon perustuvan pH:n säätelämän DNA- ja RNA-templatoitujen bifunktionaalisten heksameerien itsejärjestäytymisen. Tarkoituksena oli tutkia alkuperäistä tutkimusta monimutkaisempaa itsejärjestäytyvää ligaatioarkkitehtuuria, ja tämän avulla tutkia boorin mahdollista roolia prebioottisessa kemiassa. Bifunktionaalisten heksameerien 5'-päässä on kuvatuslainen boorihappo ja 3'-päässä ribonukleotidi. Heksameerit polymerisoituvat oikeanlaiseen järjestykseen templaattiyksiköihin perustuen, ja vastaavasti hajoavat alkuperäisiksi boorihappoyksiköikseen pH:n mukaan. pH:ssa 5,5 boorihappoyksiköt hajoavat täysin heksameeriyksiköikseen, ja pH:n kasvaessa reaktio alkaa edetä. Artikkelissa reaktiot tehtiin pH:issa 7,5 ja 9,5. Tämä stabiloituminen mitattiin sulamislämmön kasvuna. Lisäksi boorihapporyhmien määrän lisääminen lisäsi stabiloitumista.

Lisäksi artikkelissa esiteltiin autotemplatoitu reaktio, jossa kaksi modifioitua heksameeriyksikköä templaatoivat toisiaan. Yksiköt olivat 5'-TCA GCrG ja 5'-TGA CGrC, joiden 5'-pää oli kaavion 12 tapaan boorihappomodifioitu. Yksiköt sitoutuvat

Watson-Crick-emäsparein toisiinsa sopivasti lomittain, jolloin vapaaksi jää aina muutama emäspari, joihin reaktion seuraava yksikkö pääsee sitoutumaan. Kontrollina käytettiin modifioimatonta heksameeriä, jonka 5'-päässä ei ollut boorihappoa. Kontrolliyksiköillä reaktiota ei tapahtunut ollenkaan, kun taas boorihappoyksiköillä tapahtui pH-riippuvainen dupleksin muodostuminen, joka nähtiin sulamislämpöä mittaamalla.

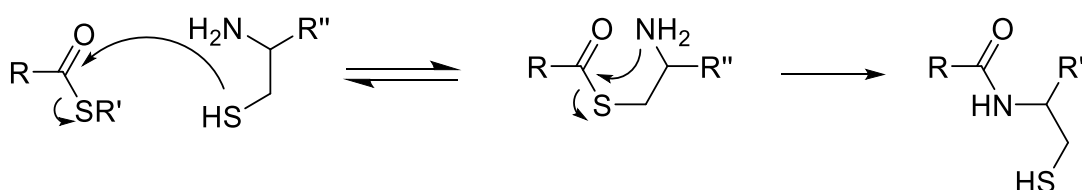
Tutkimuksessa kyettiin siis muodostamaan itsejärjestäytyviä lyhyitä oligomeerejä dynaamisesti ja reversiibelisti hyödyntämällä boorihapon ja diolin välistä ligaatiota, joka edelleen vahvistaa käsitystä boorin mahdollisesta prebioottisesta roolista molekulaarisessa evoluutiossa.

DNA-templaateilla voidaan syntetisoida DNA- ja RNA-juosteiden lisäksi myös täysin erilaisia oligonukleotidijohdannaisia. Seitz tutkimusryhmineen esittivät artikkelissaan³⁹ DNA-templatoitua PNA-ligaatiojärjestelmän, joka on herkkä emäspoikkeavuudelle templaattina toimivan oligonukleotidin ja PNA-oligonukleotidien emästen välillä. PNA eroaa DNA:sta ja RNA:sta siten, ettei sen runko koostu riboosiyksiköistä, vaan peptidistä, johon on kiinnitetty nukleoemäksiä. Sekvenssiselektiivisyys on olennainen ominaisuus geenidiagnostiikassa, ja kiinnostuksen kohteena ovat usein reaktiot, jotka hidastuvat merkittävästi jo yhden emäksen erosta. Aikaisemmat diagnostisiin ongelmiin kuten sekvenssiselektiivisyyteen ja ei-synteettisen DNA-templaatin käyttöön keskittyneet tutkimukset olivat keskittyneet luonnollisten oligonukleotidien synteisiin, kun taas epäluonnollisia oligonukleotideja käyttäneet tutkimukset eivät tarkastelleet mahdollisuuksia diagnostiikan kannalta ollenkaan. Ei-luonnollisilla oligonukleotideilla on monia toivottavia ominaisuuksia geenidiagnostiikkaa ajatellen, kuten parempi biostabiilius, hybridisaatioselektiivisyys ja havaitsemisen helppous ja tarkkuus. Biostabiilius johtuu siitä, ettei luonnollisia nukleiinihappoja hajottavat entsyymit yleensä kykene hajottamaan ei-luonnollisia sidoksia sisältäviä nukleiinihappoja.

Diagnostiikassa käytetään luonnollista DNA:ta, joka on siis dupleksimuodossaan. Tämä on haaste ei-entsyymaattiselle oligonukleotidien ligaatiolle, sillä luonnolliset juosteet ovat sitoutuneet toisiinsa melko vahvasti. Lisäksi tutkimuksessa käytetyt reaktantti-PNA-juosteet olivat melko lyhyitä, jonka vuoksi ne eivät muutenkaan hybridisoidu kovin vahvasti DNA:n kanssa. Tämä ongelma ratkaistiin kehittämällä homogeeninen järjestelmä, jossa PNA- ja peptidiligaatiokemian ansiosta nopeaa sekvenssianalyysiä voidaan tehdä PCR:llä monistetulla kaksoiskierteisillä DNA-templaateilla. Käytännössä tämä tapahtui nostamalla lämpötilaa tarpeeksi, että PCR-monistettu DNA denaturoitui yksittäisiksi juosteikseen. Käytetyn reaktion tulee siis kestää tämä DNA:n denaturointiin

vaadittu korkea lämpötila. Koska DNA:n denaturaation jälkeen dupleksin uudelleenmuodostuminen kilpailee templaatin ja reaktanttijuosteiden hybridisaation kanssa, systeemiin lisättiin avustavaa PNA:ta, jonka tarkoitus oli hankaloittaa alkuperäisen DNA-kaksoiskierteen uudelleenhybridisoitumista.

Ensin tutkimusryhmä yritti tehdä ligaatioreaktioita PNA-segmenttien välillä käyttämällä vesiliukoista karbodi-imidiä imidatsolia sisältävissä puskuriliuoksissa yhdisteiden aktivoinniksi. Tämä reaktio, vaikkakin sekvenssiselektiivinen, ei kuitenkaan toiminut DNA:n denaturointiin vaadituissa korkeammissa lämpötiloissa. Tämän vuoksi tutkimusryhmä siirtyi natiiviin kemialliseen ligaatioon, jossa PNA-aminohappotioesterit reagoivat PNA-kysteiniinikonjugaattien kanssa (Kaavio 14). Tällä saavutettiin samanlainen sekvenssiselektiivisyys, ja reaktion havaittiin toimivan myös halutuissa lämpötiloissa.

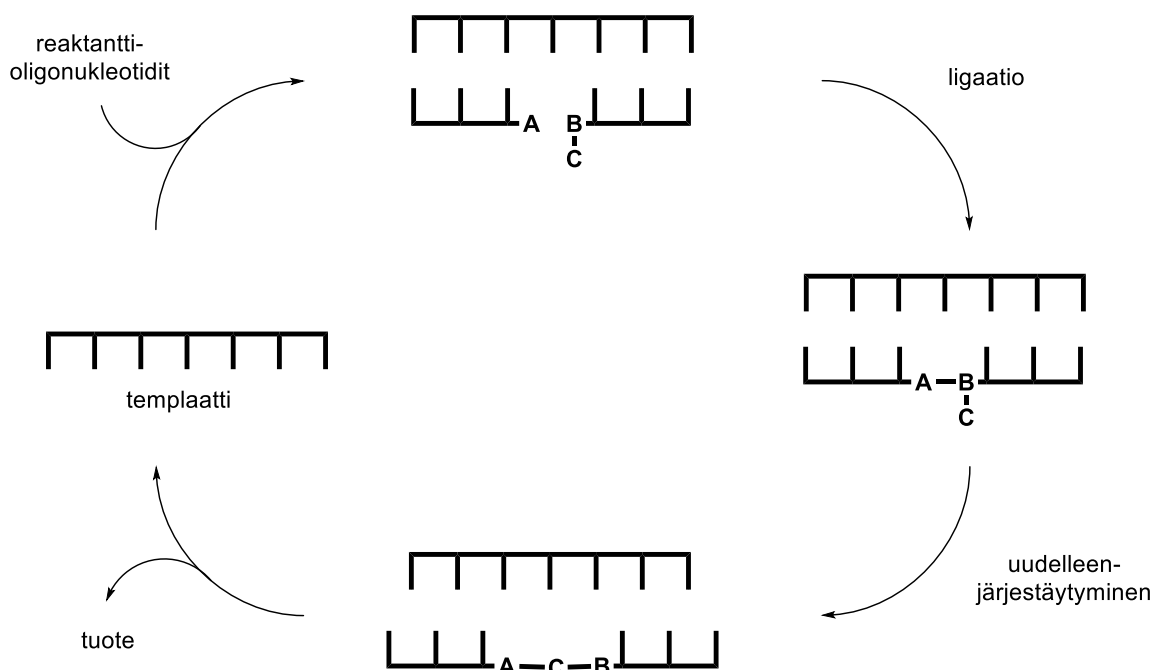


Kaavio 14. Natiivin kemiallisen ligaation mekanismi

Kuten mainittua, luonnossa DNA-templatoitua synteesiä katalysoivat usein entsyymit kuten DNA- ja RNA-polymeraasit. Ei-entsyymattisen synteesin ansiosta DNA-templatointia voidaan hyödyntää laajan molekyylikirjon synteesiin, eikä tuotteiden tarvitse muistuttaa millään tavalla luonnollisia nukleoemäsrakenteita. Eräs ongelma ei-entsyymattisissa DNA-templatoituissa ligaatioreaktioissa verrattuna entsyymattiseen ligaatioon on kuitenkin se, että templaattia vaaditaan usein stoikiometrinen määrä verrattuna reaktantteihin, sillä yleensä ligaatiotuote sitoutuu templaattiin reaktantteja paremmin. Tätä ongelmaa Seitz tutkimusryhmineen lähti tarkastelemaan PNA-ligaatioon keskittyvässä jatkotutkimuksessaan.⁴⁰ Tavoitteena oli löytää keino, jolla ligaatiotuote saadaan sen syntetisoinnin jälkeen sitoutumaan huonommin DNA-templaattiin.

Yleisesti toimivaksi ratkaisuksi tähän ongelmaan tutkimusryhmä esittää kaksivaiheisen reaktion (Kaavio 15), jossa ligaatiotuotteen muodostumisen jälkeen ligaatiotuotteessa tapahtuu intramolekulaarinen uudelleenjärjestäytyminen. Uudelleenjärjestäytyminen pidentäisi ligaatiotuotetta siten, että emäsparit eivät ole enää kohdakkain ja näin ligaatiotuotteen affiniteetti templaattiin laskisi. Koska emäsparien väliset vetysidokset eivät enää uudelleenjärjestäytymisen jälkeen tue dupleksia, templaatti irtoaa tuotteesta ja

voi näin jatkaa reaktion katalysointia. Tällöin templaattia ei vaadita kuin katalyyttinen määrä.



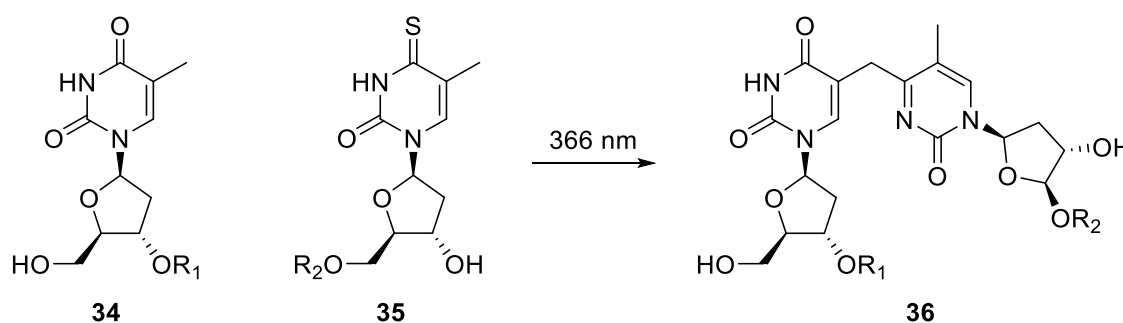
Kaavio 15. Yleiskaavio templatoidusta ligaatiosta, jossa ligaation jälkeen tuotteessa tapahtuu intramolekulaarinen uudelleenjärjestäytyminen ja emästen siirtymisen vuoksi templaatti vapautuu

Käytännössä tutkimusryhmä sovelsi edellä esitettyä PNA-ligaatiota. Alkuperäisessä reaktiossa natiivin kemiallisen ligaation jälkeen tuotteen emästen välillä on 12 sigmasidoksen pituinen väli, mikä tarkoittaa sitä, että se sitoutui templaattiin reaktanteja paremmin. Tässä tutkimuksessa kysteiini korvattiin isokysteiinillä, jonka ansiosta reaktion jälkeen tuotteessa emästen välin pituus on 13 sigmasidosta, joka on riittävä häiritsemään juosteiden hybridisaatiota.

Templatoitu reaktio isokysteiinin kanssa oli yhtä sekvenssiselektiivinen kuin kysteiinin kanssa, ja lisäksi se oli yhtä nopea. Kysteiini- ja isokysteiini-PNA-ligaatioille määritettiin niiden katalyyttistä aktiivisuutta mittaava vakio k_{cat} , joka oli isokysteiinin tapauksessa merkittävästi suurempi kaikilla mitatuilla konsentraatioilla. Reaktiota hyödynnettiin artikkelissa emäspoikkeavuuden havaitsemiseen käyttämällä fluoresenssiin perustuvaa FRET-menetelmää. PNA-oligonukleotideihin liitettiin sopivat kromoforit ja sammuttajat, ja komplementaarisen DNA-templaatin kohdatessaan näiden oligonukleotidien välillä tapahtuu ligaatio. Tällöin sammuttaja pääsee tarpeeksi lähelle kromoforia ja kromofori sammuu. Emäspoikkeavuus templaatin ja reaktanttien välillä on riittävä reaktion pysäyttämiseen, ja tällöin sammumista ei havaita.

Kun ligaatioreaktiota ei voida aktivoida kemiallisesti tai entsyymaattisesti, templaoitu fotoligaatio voi olla hyödyllinen vaihtoehto. Fotoligaatio on mielenkiintoinen tutkimuskohde, koska sillä on saattanut olla rooli elämän synnyssä, sillä ennen nykyisenlaista biologiaa entsyymejä tai oikeanlaista reaktiivisia ryhmiä ei välttämättä ollut. Lisäksi fotoligaatiota voidaan hyödyntää esimerkiksi reaktioissa, joiden tulee tapahtua solun sisällä. Esimerkiksi antisense- tai antigeenimenetelmiin perustuvat lääkkeet, joissa oligonukleotidit sitoutuvat solussa oleviin vapaisiin nukleiinihappoihin tai vasta-aineisiin, voisi olla yksi tällainen sovelluskohde.

Taylor tutkimusryhmineen tutki⁴¹ tätä mahdollisuutta käyttämällä tiotymidiinillä 5'-modifioitua DNA-oligonukleotidiä (**35**). UV-säteilyn (aallonpituus 366 nm) avustamana tämä oligonukleotidi reagoi templaoituna toisen DNA-oligonukleotidin (**37**) 3'-pään tymidiinin kanssa (Kaavio 16). DNA ja RNA eivät vahingoitu merkittävästi näin korkean aallonpituuden UV-säteilystä.



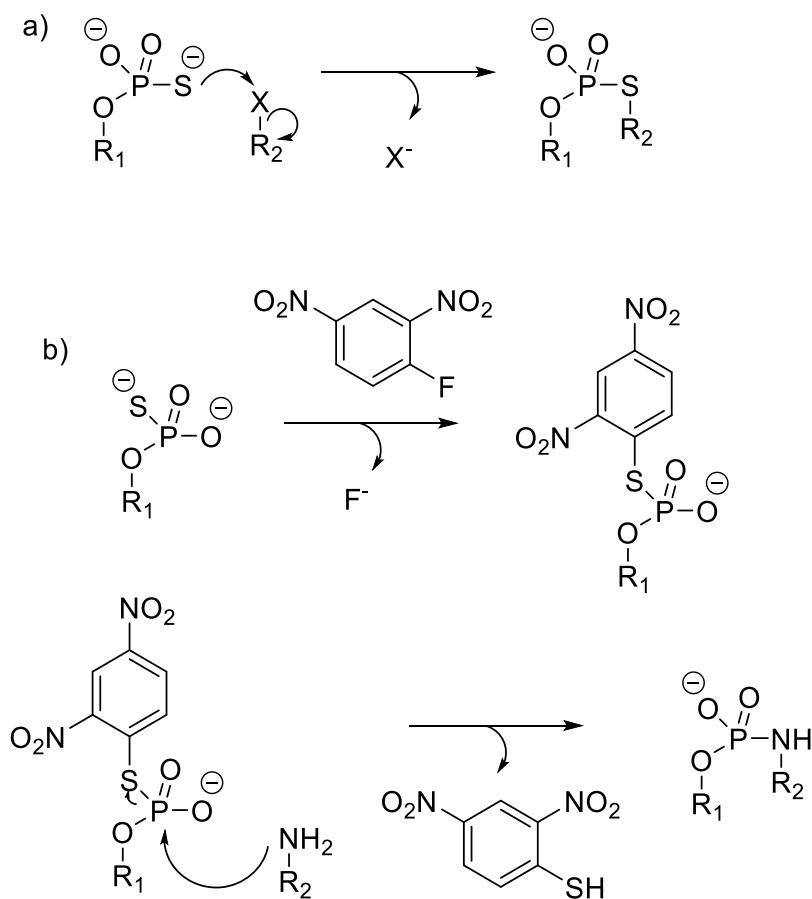
Kaavio 16. Tymidiinin 34 ja tiotymidiinin 35 välinen fotokemiallinen ligaatioreaktio. R₁ ja R₂ ovat oligonukleotideja.

Fotoligaatiota kokeiltiin sekä täysin komplementaarisella templaattilla sekä templaattilla, jossa oli yhden emäksen poikkeavuus. Reaktion havaittiin hidastuvan merkittävästi yhden emäksen eron vuoksi, mikä on hyödyllinen ominaisuus diagnostisten sovelluskohteiden kannalta.

Lisäksi tutkimusryhmä kokeili yksittäisten oligonukleotidijuosteiden päiden liittämistä toisiinsa hyödyntäen rengasrakenteista DNA-templaattia ja esitettyä fotoligaatioreaktiota. Tällöin tuotteena saadaan syklisiä oligonukleotideja, jotka ikään kuin lukitsevat templaattina toimineet sykliset DNA-juosteet. Tällä voi olla sovelluskohteita esimerkiksi antisensemenetelmiin perustuvissa lääkkeissä, jossa tarkoituksena on estää vapaiden oligonukleotidijuosteiden toiminta solussa. Käytännössä siis annettaisiin potilaalle oligonukleotidi, jossa 3'- ja 5'-päät ovat valmiina reagoimaan toistensa kanssa fotokemiallisesti. Tämän jälkeen odotetaan, että oligonukleotidi pääsee kohteeseensa ja

hybridisoituu kohteena olevan syklisen oligonukleotidin kanssa. Tämän jälkeen reaktio voidaan aktivoida UV-säteilyllä, ja kohteena olevan nukleiinihapon toiminta estyy.

Abe tutkimusryhmineen kehitti vastikään uudenlaisen DNA-templatoitun kemiallisen ligaatiomenetelmän, jossa hyödynnetään elektrofiilistä fosforotiooesteriä.⁴² Tarkoituksena oli kehittää vaihtoehtoinen menetelmä fosforotioaattiligaatiolle. Fosforotioaattimenetelmän etuna on se, ettei se vaadi ylimääräisiä reagensseja liuoksessa ja tuotteena muodostuneet oligonukleotidit muistuttavat luonnollisia oligonukleotidejä. Oligonukleotidien välisessä fosforotioaattiligaatiossa fosforotioaatti toimii nukleofiilinä (Kaavio 17a). Tilanteissa, joissa vaaditaan, ettei reaktioliuokseen lisätä ylimääräisiä reagensseja, fosforotioaattiligaatio on usein toimiva menetelmä. On kuitenkin tapauksia, joissa se ei toimi. Aben tutkimusryhmän tavoitteena muokata reaktiota tavalla, että reaktiosta saadaan toimimaan luotettavammin myös tällaisissa tilanteissa. Tällaisella uudella reaktiolla voi olla sovelluskohteita bioteknologiassa ja kemiallisessa biologiassa.



Kaavio 17. a) Nukleofiiliseen fosforotioaattiin perustuvan kemiallisen ligaation mekanismi. b) Elektrofiiliseen fosforotiooesteriin perustuva ligaation mekanismi. R_1 ja R_2 ovat oligonukleotideja.

Elektrofiilisen fosforotioesteriryhmän synteesiin käytettiin Sangerin reagenssia (1-fluoro-2,4-dinitrobensoeni), jonka avulla fosforotioaattiryhmä aktivoidaan ja siitä tulee elektrofiilinen. Tämän jälkeen voidaan toteuttaa reaktio 3'-aminomodifioidun oligonukleotidin kanssa, jolloin muodostuu fosforoamidaattisidos (Kaavio 17b). Reaktio toteutettiin myös toisinpäin, jolloin 3'-päähen syntetisoidaan fosforotioesteri ja 5'-päähen amiini. Nämä ligaatioreaktiot tapahtuvat huoneenlämmössä ja neutraalissa pH:ssa (7-8). Fosforotioesterimodifioidut oligonukleotidit kestävät myös eristämisen ja jäädytyksen, jos ligaatioreaktiota ei tehdä välittömästi.

Tähän asti esitellyissä reaktioissa templaatti on aina ollut yksittäinen oligonukleotidijuoste. Kuitenkin Dervan tutkimusryhmineen esitti artikkelissaan⁴³ DNA-sekvenssien ligaation, jossa templaattina toimi dupleksi-DNA. 15-meeriset pyrimidiiniligodeoksinukleotidisekvenssit sitoutuivat 37-meeriseen dupleksi-DNA:han Watson-Crick-emäspariutumisen sijaan Hoogsteen-emäspariutumisella, muodostaen kolmoiskierrerakenteen. Mielenkiintoista tässä reaktiossa on se, että muodostuva 30-meeri ei ole templaattiin nähden samanlainen tai Watson-Crick-emäsparien mukaisesti komplementaarinen, vaan näistä poikkeava oligonukleotidijuoste.

Toisen 15-meerin 5'-pää oli fosforyloitu hyödyntäen polynukleotidikinaasia, ja tämä fosfaattiryhmä aktivoitiin *in situ* BrCN:llä, imidatsolilla ja NiCl₂:lla. Reaktio eteni 9h huoneenlämmössä, jonka jälkeen tuote denaturoitiin dupleksi-DNA:sta ja karakterisoitiin halutuksi 30-meeriksi. Tuotetta saatiin 40% saannolla. Reaktio toistettiin ilman templaattia, jolloin tuotetta ei muodostunut. Reaktio toistettiin myös ilman fosforyloimatonta 15-meeriä, jolloin tuotetta ei myöskään muodostunut, osoittaen ettei fosforyloitu 15-meeri reagoi itsensä kanssa.

Kaksoiskierteisen DNA:n käyttö on usein haastavaa esimerkiksi diagnostisissa ei-entsymaattista DNA-templatointia hyödyntävissä sovelluskohteissa, kuten edellä esitetyssä PNA-ligaatiossa.³⁹ Tyypillisesti ongelma ratkaistaan nostamalla reaktioliuoksen lämpötilaa niin, että dupleksit hajoavat yksittäisiksi juosteikseen. Dervanin tutkimuksen⁴³ tulosten perusteella kuitenkin myös duplekseja voidaan hyödyntää templaatteina.

1.3.3. DNA-templatoinnin sovellukset

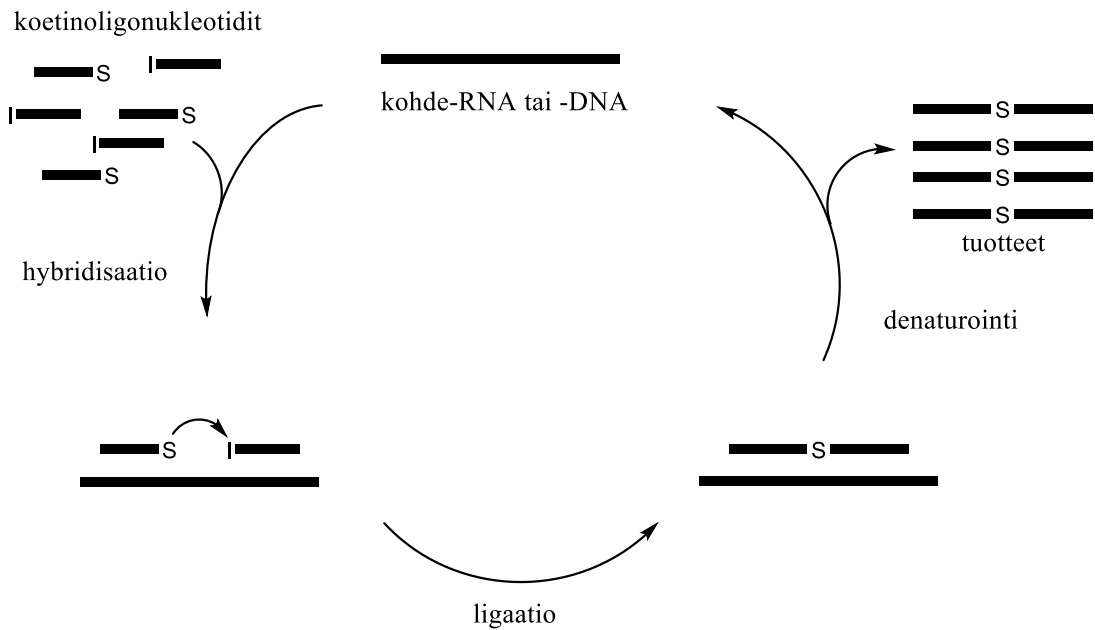
1.3.3.1. Nukleiinihappojen havaitseminen

PCR-monistus ei ole ainoa tapa havaita pieniä määriä DNA:ta tai RNA:ta liuoksessa, vaan myös DNA-templatointia voidaan hyödyntää havaitsemaan hyvinkin pieniä määriä oligomeerejä liuoksessa. Ito tutkimusryhmineen tutkivat tätä DNA-templatoinnin ominaisuutta.⁴⁴ Olennaisessa osassa tässä sovelluskohteessa on DNA:n luonnollinen kyky löytää ja hybridisoitua komplementtinsa kanssa hyvinkin pienissä konsentraatioissa. Tutkimusryhmän DNA-templatoitu amplifikaatio eroaa PCR:stä siten, että se on täysin ei-entsymaattinen, kun taas PCR-monistuksessa hyödynnetään polymeerasientsyymiä. Ei-entsymaattinen lähestymistapa on hyödyllinen tapauksissa, joissa PCR:n heikkoudet nousevat esiin. Ligaaseilla on esimerkiksi huono aktiivisuus RNA:n kanssa, ja ligaasientsyymit toimivat huonosti lyhyiden oligonukleotidien kanssa, vaikka nimenomaan lyhyillä oligonukleotideilla on paras sekvenssiselektiivisyys.

Koetineligonukleotidien välinen ligaatio oli fosforotioaatin ja jodiasetyylin välinen S_N2 -reaktio. Fosforotioaattioligomeeri suunniteltiin 5-7-meeriksi ja jodiasetyylioligomeeri 8-meeriksi. Tämä pituus on riittävä luomaan tilastollisesti ainutlaatuinen sekvenssi. Reaktio suoritettiin PCR:lle tarkoitettussa lämmittimessä. Reaktion tapahduttua tuotetta lämmitetään, jolloin se denaturoituu. Ligaation ja denaturaation jälkeen reaktio etenee uudestaan ja näin templaatti toimii katalyyttisesti muodostaen lisää tuotetta (Kaavio 18).

Denaturaation tarkoitus on vapauttaa tuote templaattina toimivasta kohdeoligonukleotidista, sillä muuten se estää koetineligonukleotideja sitoutumasta siihen. Nostamalla ja tiputtamalla reaktioliuoksen lämpötilaa reaktiota saadaan ajettua eteenpäin.

Jos reaktioliuoksessa havaitaan suuri määrä tuotetta, voidaan päätellä kohde-RNA:n tai DNA:n olevan läsnä. Reaktion havaittiin myös hidastuvan merkittävästi, kun koetineligonukleotidien ja kohdeoligonukleotidin välillä oli emäsepäsuhta, mikä on tärkeää oikean RNA:n tai DNA:n havaitsemisen varmistamiseksi. Lyhyillä oligonukleotidikoettimilla tämä oli odotettua. Kohdeoligonukleotidi kyettiin havaitsemaan 100-120 minuutin reagoinnin jälkeen.



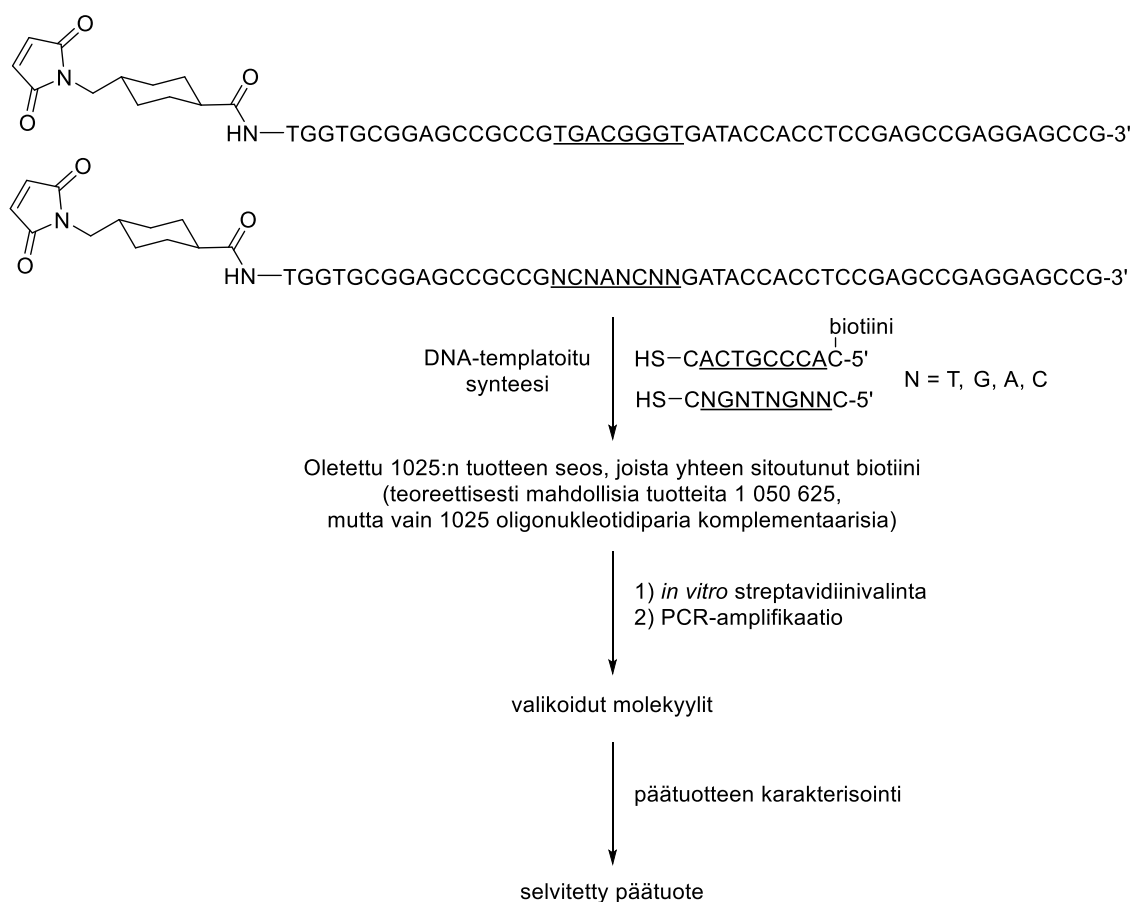
Kaavio 18. DNA- ja RNA-signaalien amplifikaatio DNA-templatoidulla kemiallisella ligaatiolla

1.3.3.2. Kombinatorinen kemia

DNA-templatoinnilla on monia erilaisia sovelluskohteita kombinatorisessa kemiassa. Kombinatorisessa kemiassa syntetisoidaan suuri kirjasto erilaisia molekyyliä, joka sisältää kaikki tai lähes kaikki mahdolliset yhdistelmät eri reagenssimolekyylien välillä.⁷ Tämän jälkeen kirjastosta valikoidaan jollain tavalla etsitty molekyyli. Valinta voi tapahtua esimerkiksi jonkinlaisen reaktiotuotetta sitovan proteiinin avulla, jolloin proteiini voidaan eristää ja siihen sitoutunut tuote karakterisoida. Tällä tavalla voidaan erittäin suuresta joukosta erilaisia molekyyliä löytää se, joka sitoutuu parhaiten haluttuun proteiiniin. DNA-templatointia voidaan hyödyntää esimerkiksi kombinatoristen kirjastojen synteessissä.⁷ Yksi DNA:n kätevistä ominaisuuksista kombinatorisen kemian kannalta on mahdollisuus monistaa hyvinkin pieni määrä DNA:ta PCR:llä.

Ensimmäisenä DNA-templatoidun synteessin käyttöä kombinatorisen kirjaston syntetisointiin tutkivat Liu ja Gartner.⁴⁵ Artikkelissaan Liu ja Gartner ottivat tavoitteekseen osoittaa, että suuresta DNA-kirjastosta voidaan DNA-templatoinnin avulla johtaa kirjasto synteettisiä molekyyliä, eikä suuri joukko erilaisia DNA-molekyyliä haittaa esimerkiksi yksittäisten DNA-templatoitujen reaktioiden sekvenssiselektiivisyyttä tai tehokkuutta. He lähestyivät ongelmaa syntetisoimalla 1025:n 2,5-pyrrolidiinidioniin kiinnitetyn templaattioligonukleotidin ja 1025:n tioliin päättyvän lyhyemmän

oligonukleotidin avulla 1025 tuotteen kirjaston (Kaavio 19). Yhteen lyhyemmistä oligonukleotideista oli kiinnitetty 5'-päähän biotiini. Yhtä suuri määrä kutakin näistä sekoitettiin samaan liuokseen, jonka kokonaiskonsentraatioksi saatiin 60 nmol L⁻¹.



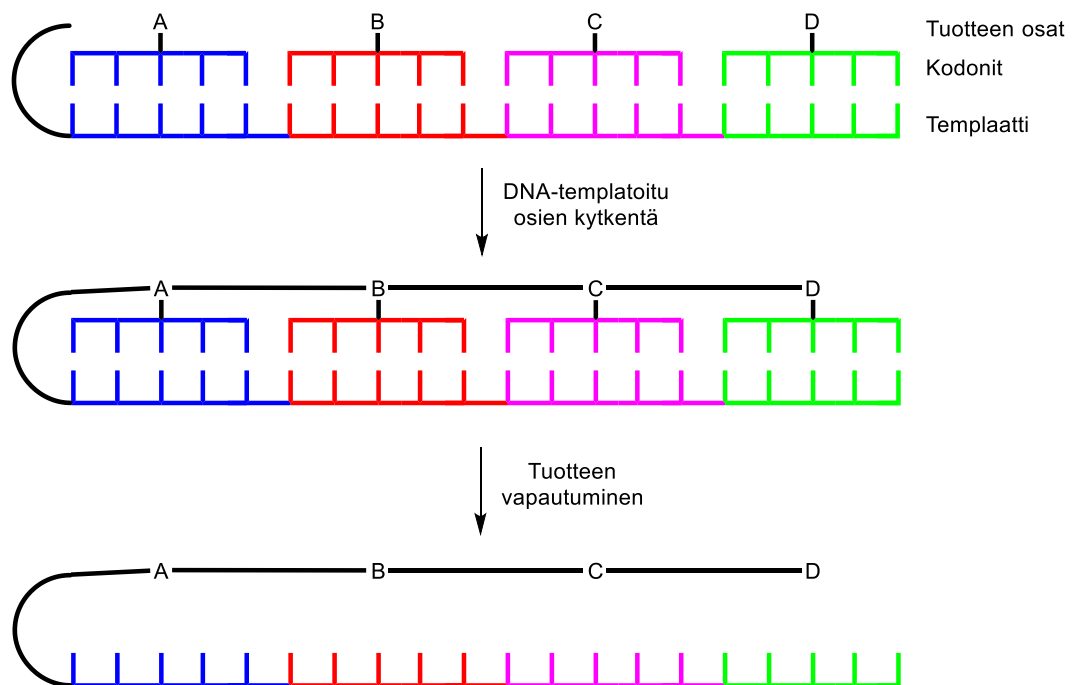
Kaavio 19. Esimerkki DNA-templatointia hyödyntävästä kombinatorisesta kemiasta. Liun ja Gartnerin esittämä DNA-templatoitua synteesiä hyödyntänyt kombinatorisen kirjaston synteesi, valinta ja päätuotteen karakterisointi.

Muodostetusta kirjastosta valikoitiin etsityt tuotteet sitomalla ne *in vitro* immobilisoituun streptavidiniin. Streptavidini on proteiini, jonka tiedetään sitoutuvan hyvin voimakkaasti biotiiniin.⁴⁶ Streptavidiniin sitoutuneet tuotteet amplifikoitiin PCR:llä, ja havaittiin että biotiinin sisältänyt oligonukleotidi esiintyi 1:1-suhteessa kaikkiin muihin oligonukleotideihin verrattuna. Tämä tarkoittaa, kuten odotettua, että biotiinin sisältänyt oligonukleotidi saatiin valikoitua kirjastosta, ja että DNA-templatoitu synteesi on toimiva lähestymistapa silloinkin, kun liuoksessa on suuri määrä toistensa kanssa ei-komplementaarisia templaatteja ja reagensseja. Tämän vuoksi DNA-templatoitu synteesi toimii kombinatorisessa kemiassa.

Kombinatoristen kirjastojen synteessin lisäksi DNA-templatointia voidaan hyödyntää kombinatorisessa kemiassa varsinaisen kirjaston pienmolekyylien merkitsemiseen.⁷

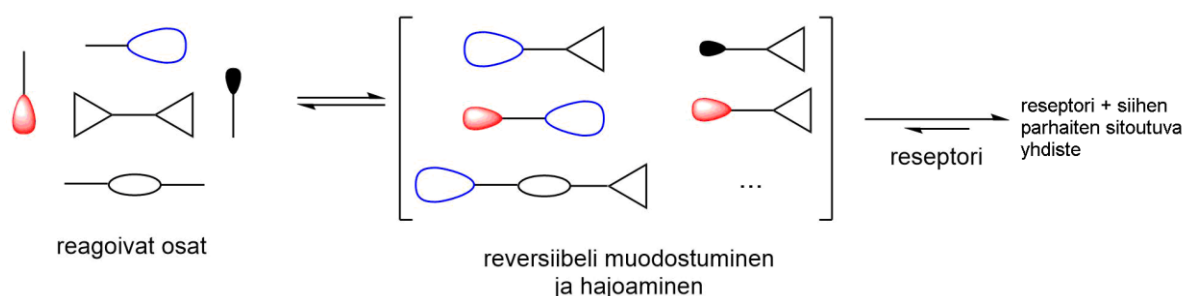
DNA toimii tällöin pelkästään leimana, eikä osallistu päätuotteen valintaan millään tavalla. Kirjaston synteesin jälkeen voidaan suorittaa valinta halutulla templaatilla, johon yhteen liitetyt pienmolekyylisosat sitoutuvat. Löydetty päätuote voidaan tunnistaa monistamalla siihen kiinnitetty DNA-juoste PCR:llä ja sekvensoimalla se. PCR-monistuksen herkkyyden ansiosta voidaan havaita merkittävästi pienempi määrä tuotetta kuin perinteisin analyysimenetelmin. Tällä tavalla DNA-sekvenssein merkityt kombinatoriset kirjastot tunnetaan DNA-merkittyinä molekyylikirjastoina (DECL). DECL:t ovat yhä enemmän käytössä uusien lääkkeiden kehityksessä.⁴⁷

DNA-merkittyjen molekyylikirjastojen alkuperäinen ajatus oli samalla syntetisoida sekä kirjaston pienmolekyylit että erillinen DNA-juoste kiinteälle kantajalle ja näin pitää kirjaa reaktioista, mutta myöhemmin kehitettiin myös muita menetelmiä. DNA-templatoitua synteesiä voidaan hyödyntää molekyylilyhdistelmien merkitsemiseen monin eri tavoin. Kaaviossa 20 on esitetty yksi esimerkki. Tuotteen osat on kiinnitetty templaatin kanssa hybridisoituihin kodoneihin, jotka hybridisoituessaan templaatin kanssa ohjaavat osat templaatin mukaiseen järjestykseen. Kytkenän jälkeen tuote vapautuu, ja näin saadaan lopullinen kirjaston jäsen, jonka rakenneosien järjestys voidaan selvittää tarvittaessa sekvensoimalla.



Kaavio 20. Esimerkki DNA-templatoitun synteesin hyödyntämisestä DNA-merkittyjen molekyylikirjastojen synteesissä. Tuotteen rakennusosat ovat kiinnitetty lyhyisiin kodonijuosteisiin, jotka hybridisoituessaan templaatin kanssa mahdollistavat osien kytkenän.

Kombinatorisen kemian alalajin dynaamisen kombinatorisen kemian peruseriaate on muodostaa dynaaminen kombinatorinen kirjasto erilaisia molekyyliä toistensa kanssa reagoivista osista.⁴⁸ Dynaamisuudella tarkoitetaan sitä, että kirjaston jäsenet muodostuvat ja hajoavat reversiibelisti. Tavoitteena on löytää tavallisen kombinatorisen kemian tavoin molekyyli, joka sitoutuu hyvin johonkin reseptoriin tai muuhun templaattiin. Tällöin reseptorin voidaan ajatella poistavan siihen sitoutuneen molekyylin liuoksesta, jolloin tämän tuotteen tasapaino siirtyy enemmän tuotteen puolelle. Tämän jälkeen liuoksen osat voidaan eristää ja parhaalla tavalla reseptoriin sitoutunut molekyyli voidaan karakterisoida. Näin voidaan selvittää hyvinkin laajasta kirjosta erilaisia molekyyliä se, joka sitoutuu haluttuun reseptoriin parhaiten (Kaavio 21).



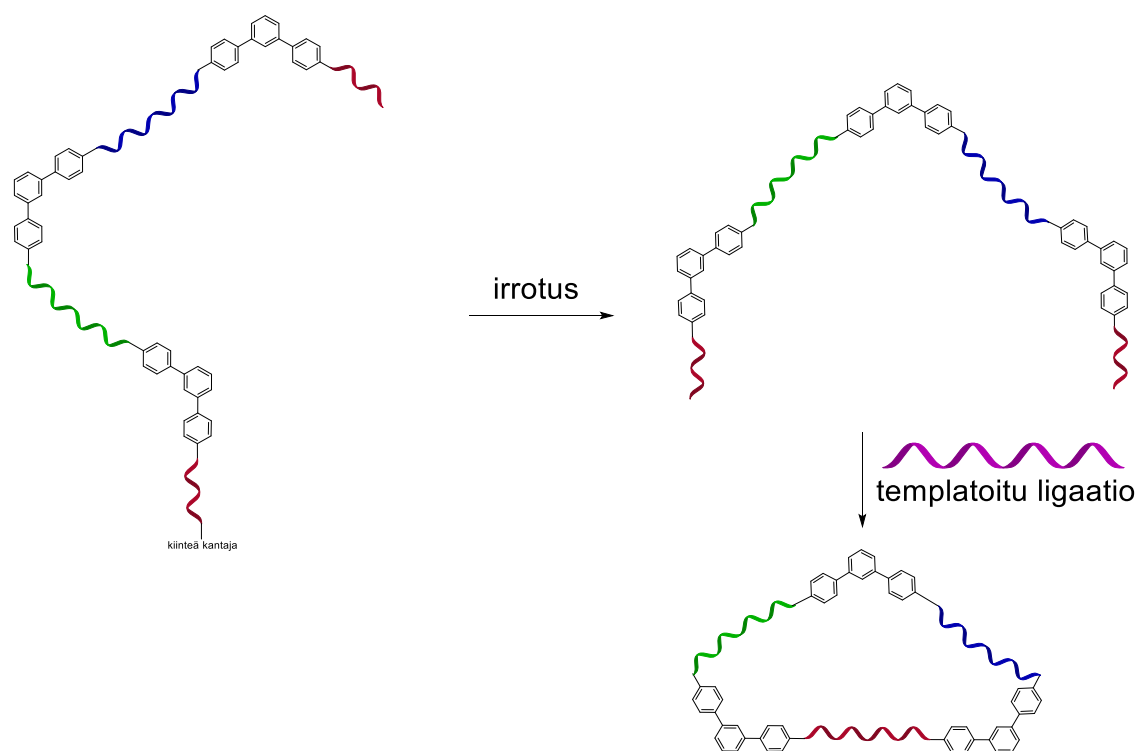
Kaavio 21. Dynaamisen kombinatorisen kemian peruseriaate. Ensin muodostetaan dynaaminen kombinatorinen kirjasto, joka sisältää laajan kirjon erilaisia molekyyliä, jonka jälkeen yksi niistä sitoutuu reseptoriin ja ajaa sitoutuneen molekyylin muodostaneen reaktion tasapainoa eteenpäin.

Dynaamisessa kombinatorisessa kemiassa käytetyn reaktion tulee täyttää tietyt kriteerit.⁴⁹ Sen täytyy olla reversiibeli järkevässä aikaskaalassa. Reversiibelin reaktion pitää olla yhteensopiva sitoutumisreaktion olosuhteiden kanssa, ja reaktio-olosuhteiden täytyy yleensäkin olla miedot esimerkiksi lämpötilan, paineen, pH:n ja konsentraation suhteen, etteivät ne häiritse haetun kirjaston jäsenen interaktiota reseptorin kanssa. Kaikkien muodostuneiden dynaamisen kombinatorisen kirjaston jäsenten pitää olla liukoisia reaktioliuoksen kanssa. Lisäksi reaktio pitäisi pystyä pysäyttämään siten, että kirjaston jäsenet ja reseptori kyetään eristämään ja analysoimaan. Lopulta kirjaston molekyylien muodostavien reaktioiden pitäisi olla suunnilleen yhtä suotuisia, ettei jokin kirjaston molekyyleistä esiinny ylimäärin, mikä voi haitata tasapainon siirtymistä. Tällaisten DNA-templatoitujen reaktioiden etsiminen on yksi mahdollinen tutkimuskohde.

1.3.3.3. Supramolekulaarinen kemia

DNA:lla on luonnollisesti itsejärjestäytymisominaisuus DNA-emäsparien muodossa. Myös muut DNA:n interaktiot, kuten π -pinoutuminen ja muut ei-kovalenttiset interaktiot ovat hyvin tunnettuja. DNA:n järjestäytyminen on hyvin ennalta-arvattavaa ja helposti ohjattavaa, ja yksittäinen DNA-juoste löytää komplementaarisen parinsa liuoksessa helposti. DNA:n kaltainen ennalta-arvattava järjestäytyminen on harvinaista itsejärjestäytyvien rakenteiden kemiassa, ja sen takia sitä onkin hyödynnetty laajalti itsejärjestäytyvien supramolekulaaristen rakenteiden synteesissä.⁶ DNA:n kaksoiskierre on hyvin tunnettu ja rakenteellisesti yhtenäinen rakenne, jonka avulla voidaan ohjata suurempien rakenteiden synteesiä.

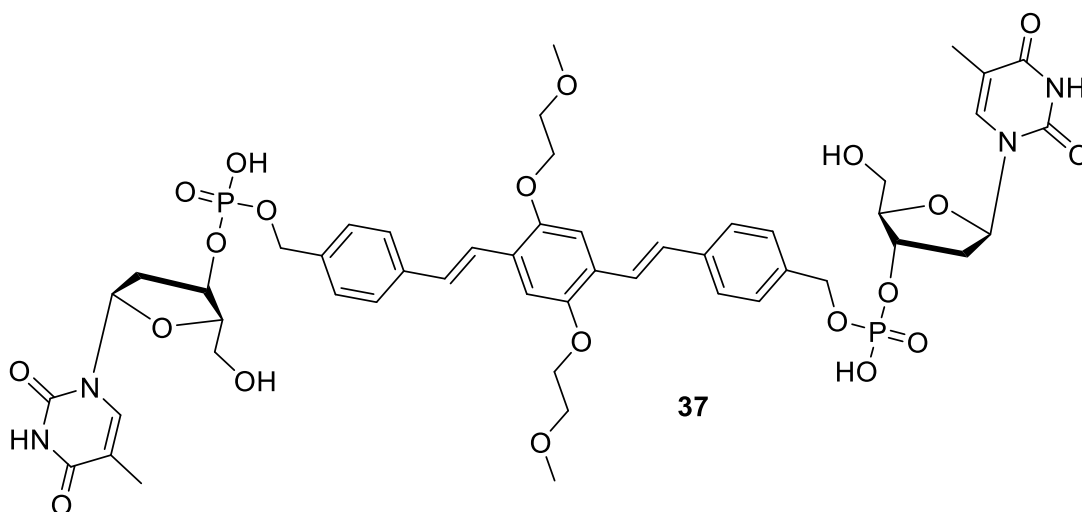
Sleiman tutkimusryhmineen käytti DNA-templatoitua ligaatiota DNA-monikulmioiden synteesiin yksijuosteisesta DNA:sta.⁵⁰ Tavoitteena oli valmistaa templaatteja kultananopartikkeleiden järjestämistä varten. Monikulmioiden sivut koostuivat DNA-juosteesta, kun taas kulmat olivat jäykkiä *m*-terfenyyilirakenteita. DNA-juoste syntetisoitiin kiinteällä kantajalla. Synteesin jälkeen DNA irrotettiin kiinteältä kantajalta, ja päiden välille muodostettiin fosfodiesterisisidos templaattia hyödyntämällä. Kaaviossa 22 on esitetty DNA-kolmion synteesi, mutta tutkimusryhmä valmisti yksijuosteisesta DNA:sta myös neliöitä, viisikulmioita ja kuusikulmioita.



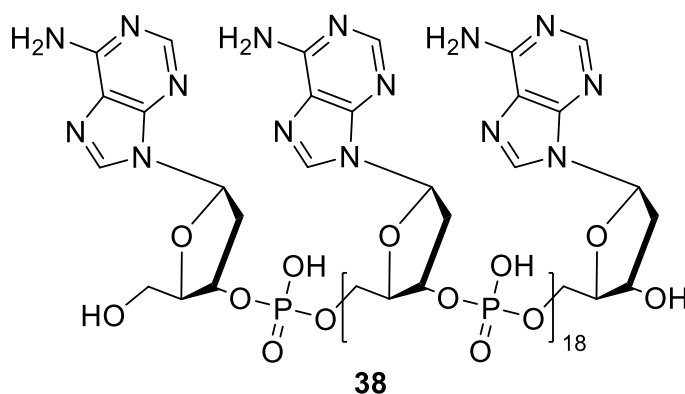
Kaavio 22. Yksijuosteisen DNA-kolmion synteesi.

Tällaisia monikulmioita voidaan hyödyntää templaatteina eri materiaalien järjestämiseen hybridisaation avulla. Tutkimusryhmä hyödynsi niitä tutkimuksessaan kultananopartikkelien muovauksessa erilaisiin muotoihin. Kultananopartikkeleilla on mielenkiintoisia ominaisuuksia materiaalina muun muassa optisten, elektronisten ja katalyyttisten sovelluskohteiden kannalta. Niistä on kuitenkin hankala valmistaa systemaattisesti haettuja rakenteita. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella kultananopartikkeliosat voitaisiin merkata oikeanlaisella DNA:lla ja edellä valmistettua templaattia hyödyntäen ohjata ne oikeille paikoilleen.

Shimizu et al. hyödynsivät DNA-templatoitua synteesiä oligo(*p*-fenyleenivinyleenin) (OPV) itsejärjestäytymisessä.⁵¹ He syntetisoivat *p*-fenyleenivinyleenin sisältävän molekyylin, joka on liitetty tymidiini-3'-monofosfaatteihin (**37**) (Kuva 8). Tämän yksittäisen rakenneosan itsejärjestäytymistä ohjaavana templaattina toimi syntetisoitu yksinkertainen yksijuosteinen 20-meerinen oligodeoksiadenyylihappo (**38**) (Kuva 9).



Kuva 8. Syntetisoitu kahteen tymidiini-3'-monofosfaattiin liitetty *p*-fenyleenivinyleeni.



Kuva 9. Syntetisoitu templaattina toimiva 20-meerinen oligodeoksiadenyylihappo.

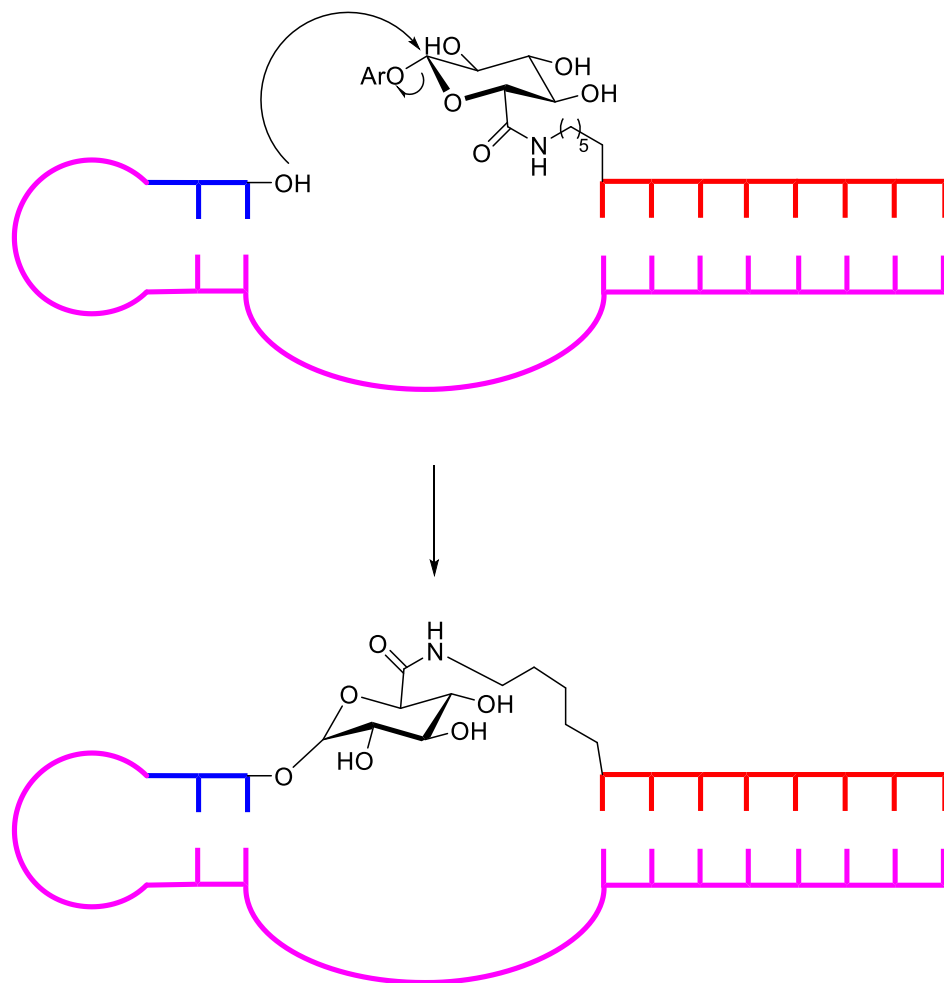
Itsejärjestäytyminen tehtiin vesiliuoksissa ja sitä seurattiin atomivoimamikroskooppisesti, CD:llä ja UV-vis-spektroskooppisesti, jolloin havaittiin muodostuvan pitkä, kierteinen pinorakenne. Kun adeniinin ja tymidiinin määrä oli stoikiometrisesti yhtä suuri, yhden kierteen pituudeksi havaittiin 60 nm ja kierteisen pinon pituudeksi yli 15 μm . Kierre oli oikeakätinen. Kierteen rakenne oli riippuvainen tymidiinin ja adeniinin välisestä stoikiometriasta, ja se esimerkiksi lyheni, kun tymidiinin määrä kaksinkertaistettiin. Kokeet suoritettiin myös käyttäen ei-komplementaarista 20-meeristä oligotymidiini-3'-monofosfaattia. Tällöin muodostui 10-30 nm:n leveitä aggregaatteja. Tämä vahvisti sen, että A-T-emäspariutumisen vaaditaan kierteen muodostamiseen.

1.4. DNA-templatoitu *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio

1.4.1. Yleistä DNA-templatoidusta *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiosta

DNA:n katalysoima glykosylaatio ei ole ideana uusi. Esimerkiksi Silverman tutkimusryhmineen esitti vuonna 2016 aryyiliglykosideja käyttävän DNA-katalyyttisen glykosylaatioreaktion.⁵² Käytetyt aryyiliglykosidit olivat D-glukoosin johdannaisia. Akseptorina reaktioissa toimii DNA-oligonukleotidin 3'-OH-ryhmä. Akseptorit olivat liitetty kovalenttisesti satunnaisiin 40:n nukleotidin sekvensseihin (Kaavio 23). Tässä tutkimuksessa tavoitteena oli hyödyntää donoria katalyyttisesti aktiivisten DNA-sekvenssien löytämiseen satunnaisten oligonukleotidien joukosta.

Tämä reaktio on kuitenkin irreversiibeli, kun taas moniin hyödyllisiin sovelluskohteisiin kuten edellä esitettyihin itsejärjestäytyviin supramolekulaarisiin DNA-rakenteisiin, dynaamisiin kombinatorisiin kirjastoihin ja itsensä kopioivien systeemien mallintamiseen vaaditaan dynaamista, reversiibeliä reaktiota. Bio-ortogonaalisuus, eli reaktion kyky tapahtua elimistössä häiritsemättä normaalia biologista toimintaa, on myös haluttu ominaisuus. Lisäksi kyky aktivoida reaktio jäljettömästi esimerkiksi pH:n muutoksella, hapetuksella tai UV-säteilyllä voisi olla hyödyllinen. Yksi esimerkki tällaisesta reaktiosta on aikaisemmin esitelty DNA-templatoitu boorihappoligaatio (Kaavio 13).³⁵



Kaavio 23. DNA:n katalysoima glykosylaatio hyödyntäen β -D-glukoosi-aryyliglukosididonorina.

Myös *N*(Me)-alkoksiglykosylaatio täyttää nämä vaatimukset. Reaktio on dynaaminen, reversiibeli ja tapahtuu alhaisessa pH:ssa. Se on myös lähes bio-ortogonaalinen ja reaktiotuotteena muodostuvat *N*-alkoksiamiiniglykosylaatit ovat käytännössä stabiileja neutraalissa pH:ssa. Sitä ei oltu kuitenkaan käytetty ennen DNA-templatoituissa reaktioissa. Tämän vuoksi erikoistyössä tutkittiin, voisiko *N*(Me)-alkoksiglykosylaatiota hyödyntää DNA-templatoituna reaktionä.

1.5. Yhteenveto

Perin ja Dumyn esittämä alkyyli-alkoksiamiiniglykosylaatio on ollut merkittävä työkalu bioaktiivisten glykosidijohdannaisten kehittämisessä. Reaktio on erittäin monikäyttöinen, ja toimii mitä erilaisimmilla hiilihydraatti- ja hydroksyyliamiiniosilla monissa eri

liuottimissa ilman tarvetta suojaryhmille. Sitä tullaan varmasti käyttämään myös tulevaisuudessa erilaisten bioaktiivisten neoglykosidien synteesissä.

DNA-templatointia käyttäen voidaan ohjata monenlaisia eri reaktioita DNA:n kanssa hybridisoituvien osien välillä. Ala on kehittynyt sen muutaman vuosikymmenen olemassaolon aikana merkittävästi, ja sitä hyödyntävien reaktioiden laajuus on kasvanut merkittävästi yksinkertaisista nukleotidien välisten fosfodiesterisidosten muodostamisesta mitä erilaisimpiin reaktioihin. DNA-templatoitu synteesi tulee tulevaisuudessakin olemaan tärkeä osa esimerkiksi esitettyjen kombinatoristen kirjastojen osana ja itsejärjestäytyvien supramolekulaaristen rakenteiden suunnittelussa. Tulevaisuudessa tullaan varmasti myös löytämään lisää reversiibeilitä ja dynaamisia DNA-templatoituja reaktioita, kuten tässä tutkielmassa esiteltyt boorihappoligaatio ja *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio.

Edellä esiteltyjen syiden vuoksi Perin ja Dumyn neoglykosylaatioon ja DNA-templatointiin perustuva ligaatiomenetelmä otettiin erikoistyössä tutkinnan kohteeksi. Tavoitteena oli kehittää reversiibeli ja dynaaminen DNA-templatoitu ligaatioreaktio, ja neoglykosylaatio on sopiva valinta tällaiseen oligonukleotidien väliseen ligaatioon. Tulevaisuudessa DNA-templatoitun *N*(Me)-glykosylaation kannalta mahdollisia tutkimuskohteita ovat edellä esitetyt mahdolliset sovelluskohteet kuten dynaamisten kombinatoristen kirjastojen kehitys sekä itsejärjestäytyvien supramolekulaaristen rakenteiden suunnittelu, joihin erikoistyön aikana ei perehdytty. Lisäksi reaktion kinetiikkaa ja muita ominaisuuksia voidaan tutkia käyttämällä erikoistyön hiusneula-arkkitehtuurista poikkeavia DNA-arkkitehtuureita.

KOKEELLINEN OSA

2.1. Johdanto

Erikoistyön tarkoituksena oli määrittää *N*(Me)-alkoksiamiiniglykolysaation soveltuvuus DNA-templatoituna reaktiona. Tätä varten syntetisoitiin komplementaarisia oligonukleotideja, jotka sisälsivät reaktioon vaadittavat toistensa kanssa reagoivat ryhmät. Oligonukleotidien sitoutuessa toisiinsa spesifisen emäspariutumisen kautta nämä reaktiiviset ryhmät saadaan toistensa läheisyyteen nostaan paikalliskonsentraatiota siten, että reaktio nopeutuu huomattavasti verrattuna vastaavien monomeerien reaktioon. Näin reaktion nopeus ei riipu liuoksessa olevien reaktanttien konsentraatiosta ja muistuttaa kinetiikaltaan enemmän intramolekulaarista reaktiota.

Tutkittu *N*(Me)-oksiamiiniglykosylaatio on tunnettu reaktio, jota on käytetty erilaisten glykokonjugaattien valmistukseen.^{4,28-31} Reaktio on lähes bio-ortogonaalinen ja etenee reversiibelisti lievästi happamissa olosuhteissa. Muodostuva *N*-glykosidinen sidos on lisäksi suhteellisen pysyvä emäksisissä olosuhteissa (pH > 7).

Nämä ominaisuudet tekevät *N*(Me)-oksiamiiniglykosylaatiosta houkuttelevan vaihtoehdon DNA-templatoituun ligaatioon. Erytisesti itsejärjestäytyvissä DNA:han perustuvissa supramolekulaarisissa rakenteissa, dynaamisissa kombinatorisissa kirjastoissa ja itseään kopioivien systeemien malleina reversiibelit ja dynaamiset reaktiot ovat kiinnostavia. Lisäksi reaktion bio-ortogonaalisuus ja reaktion pH-riippuvuus ja siis kyky käynnistää se jäljettömästi lievällä pH:n muutoksella ovat ominaisuuksia, joita haetaan.

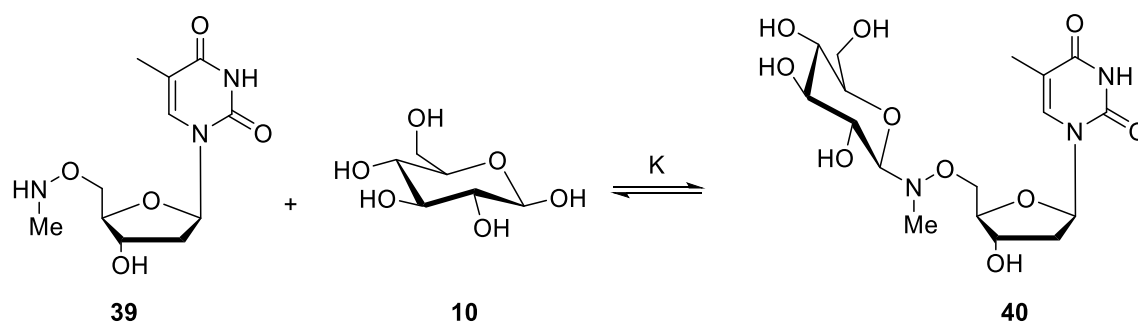
2.2. Tulokset ja niiden tarkastelu

DNA-templatoinnin mahdollisuutta lähdettiin tutkimaan⁸ aloittaen monomeerien välisestä reaktiosta (Taulukko 2). 5'-*O*-metyyliamiinolla modifioidun tymidiinin (**39**) ja D-glukoosin välisen reaktion havaittiin toimivan. Lisäksi reaktion huomattiin suosivan β -anomeerituotetta selektiivisesti. Odotetusti reaktio hidastui pH:n noustessa, mutta yhtä aikaa tuotteen saanto tasapainotilanteessa kasvoi. Samalla määritettiin myös tasapainovakiot.

Erikoistyöhön vaadittavat synteetit aloitettiin jo syventävässä työssä syntetisoimalla 5'-*O*-(metyyliamiini)tymidiinin fosforamidiitti, joka vaadittiin tämän modifioidun nukleotidin sisältävien oligonukleotidien synteeseihin. Lisäksi tarvittiin sokerikantajaa, joka tuli vielä erikoistyössä valmistaa liittämällä aikaisemmin syntetisoitua 1-*O*-tert-

butyyliidimetyylisilyyli-6-*O*-(4,4-dimetoksitriityyli)- β -D-glukopyranoosi LCAA-CPG-kantajaan.

Taulukko 2. 5'-*O*-metyyliaminotymidiinin **39** ja *D*-glukoosin **10** välinen reaktio. 5,0 mmol L⁻¹ modifioitua tymidiiniä ja 10 mmol L⁻¹ *D*-glukoosia 0,3 mol L⁻¹ natriumasetaatti- tai 2-(*N*-morfolino)etaanisulfonaattipuskurissa, $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl), $T = 24 \text{ }^\circ\text{C}$

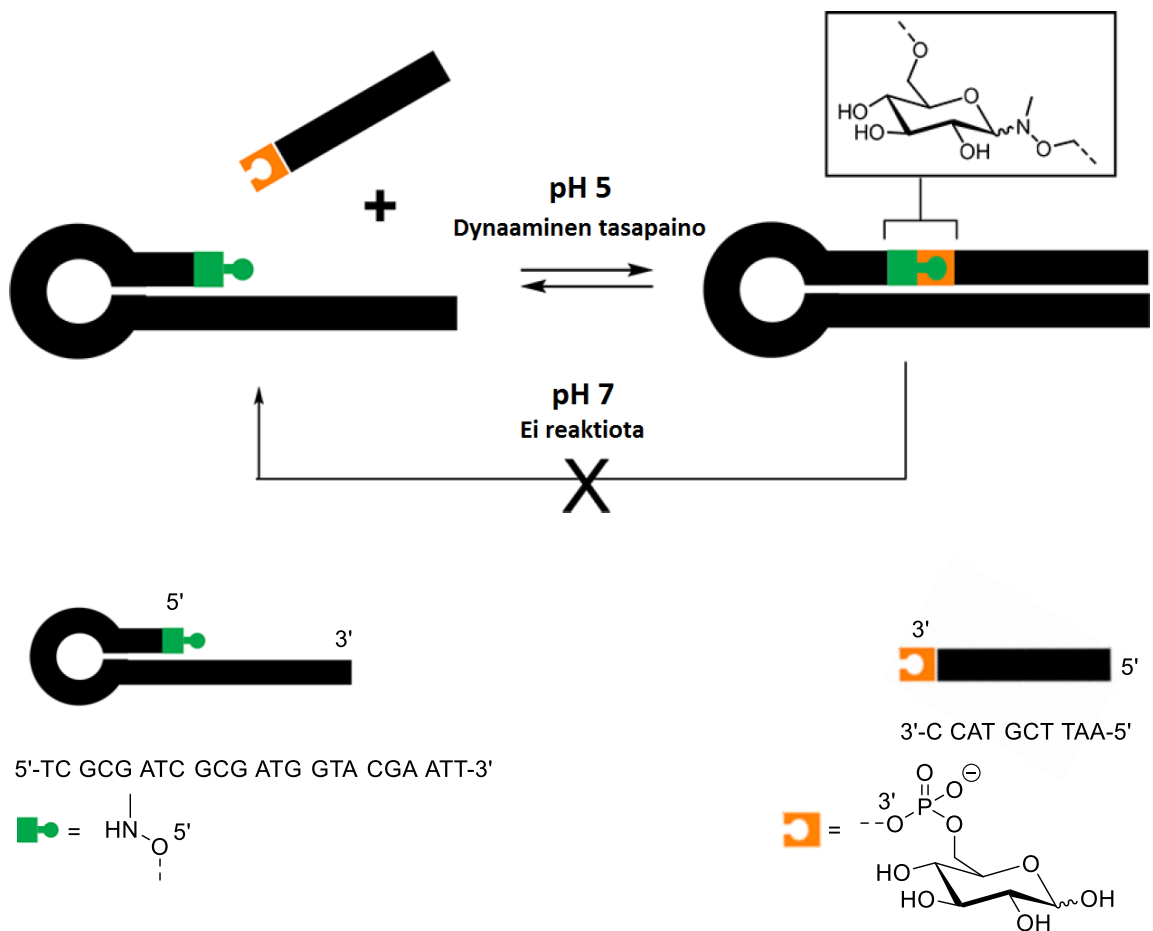


pH	$t_{1/2}$	Tuotteen saanto tasapainossa	$\beta/\alpha:n$ suhde	K (L mol ⁻¹)
4	30,8 ± 0,8 h	25,0 %	1:0	38,1
5	223 ± 8 h	35,1 %	1:0	65,6
6	95,6 ± 4,0 d	41,6 %	1:0	89,9

Kun vaadittavat rakennusosat oltiin saatu syntetisoitua, seuraava askel oli kehittää itse reaktio. Ensimmäinen idea oli valmistaa neljä oligonukleotidia, joista yksi oli tavallisista DNA-blokeista valmistettu templaattioligonukleotidi, yksi lyhyempi templaatin kanssa komplementaarinen oligonukleotidi jonka 5'-pään hydroksyyliiryhmä oli modifioitu metyyliaminoryhmällä, ja kaksi lyhyempää templaatin kanssa komplementaarista oligonukleotidia, joiden 3'-päässä oli glukoosi. Näillä reaktiota ei kuitenkaan havaittu. Luultavasti tässä arkkitehtuurissa oligonukleotidit eivät vain tavalla tai toisella ohjautuneet oikeille paikoilleen. Syy tälle ei ollut aivan selvä. Mahdollisia selityksiä ovat esimerkiksi, että reagoivat oligonukleotidit saattoivat jäädä liian kauaksi toisistaan hybridisoituessaan templaatin kanssa, tai reaktiivisten ryhmien välinen kulma oli liian suuri.

Toimivaksi rakenteeksi havaittiin lopulta kaavion 24 mallinen arkkitehtuuri, jossa pidempi oligonukleotidi on hiusneulamallisesti osittain itsensä kanssa komplementaarinen, ja toinen oligonukleotidi on ylijäävän osan kanssa

komplementaarinen. Pidemmän hiusneulaoligonukleotidin päähän oli liitetty 5'-*O*-metyyliaminomodifioitu tymidiini, ja lyhyemmän oligonukleotidin 3'-päähän D-glukoosi (Kaavio 24).



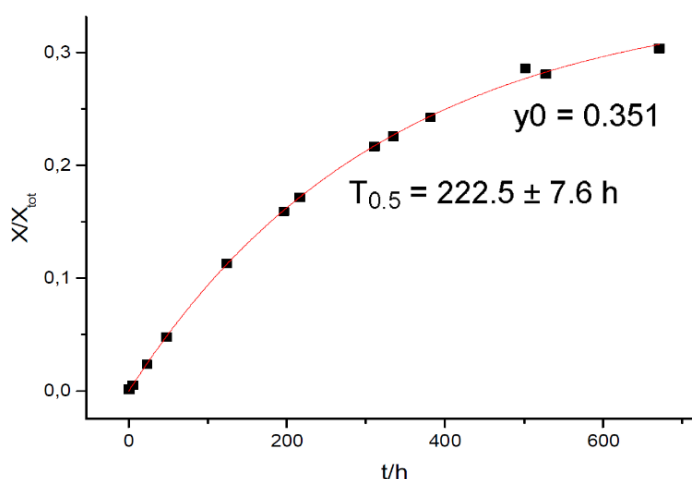
Kaavio 24. DNA-templatoitu *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio

Oligonukleotidien väliset ligaatioreaktiot tehtiin Eppendorf-putkissa huoneenlämmössä. Liuoksena käytettiin pH 5 natriumasetaatipuskuria, johon syntetisoidut oligonukleotidit olivat liuotettu $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ konsentraatioon. Oligonukleotidien konsentraatioiden annettiin olla alhaisia verrattuna aiempiin monomeerien väliseen reaktioon, koska DNA-templatoinnin ansiosta reaktion pitäisi tapahtua hyvin pienilläkin konsentraatioilla. Reaktiota seurattiin ioninvaihtokromatografisesti. Kuten odotettua, reaktio nopeutui merkittävästi verrattuna monomeerien väliseen reaktioon.

Lopulta varmistettiin myös reaktiotuotteen pysyvyys. Reaktiotuote eristettiin ioninvaihtokromatografisesti ja annettiin olla liuenneena kaksi viikkoa huoneenlämmössä pH 7 puskurissa, jonka jälkeen se analysoitiin uudestaan ioninvaihtokromatografisesti. Tuotteessa ei ollut havaittavissa minkäänlaista hajoamista, joten sen voidaan sanoa olevan pysyvä neutraaleissa olosuhteissa, kuten odotettiin. Tuote eristettiin myös pH

5 puskuriin, jolloin se hajosi takaisin tasapainotilaansa lähtöaineikseen puoliintumisajalla $11,8 \pm 1,0$ h.

Tuloksia voidaan verrata edellä esitettyyn 5'-O-metyyliaminotymidiinin **39** ja D-glukoosin **10** väliseen reaktioon ilman DNA-katalyyttiä. Kuten odotettua, reaktio nopeutui DNA-templatoituna ja toimi myös pienemmilläkin konsentraatioilla. Lisäksi monomeerien välisessä reaktiossa saanto tasapainossa pH:ssa 5 oli 35,1%, jota saatiin parannettua käytettäessä 23-meeristä hiusneulaoligonukleotidia. 31-meerisellä oligonukleotidilla saanto tasapainossa oli kuitenkin pienempi.



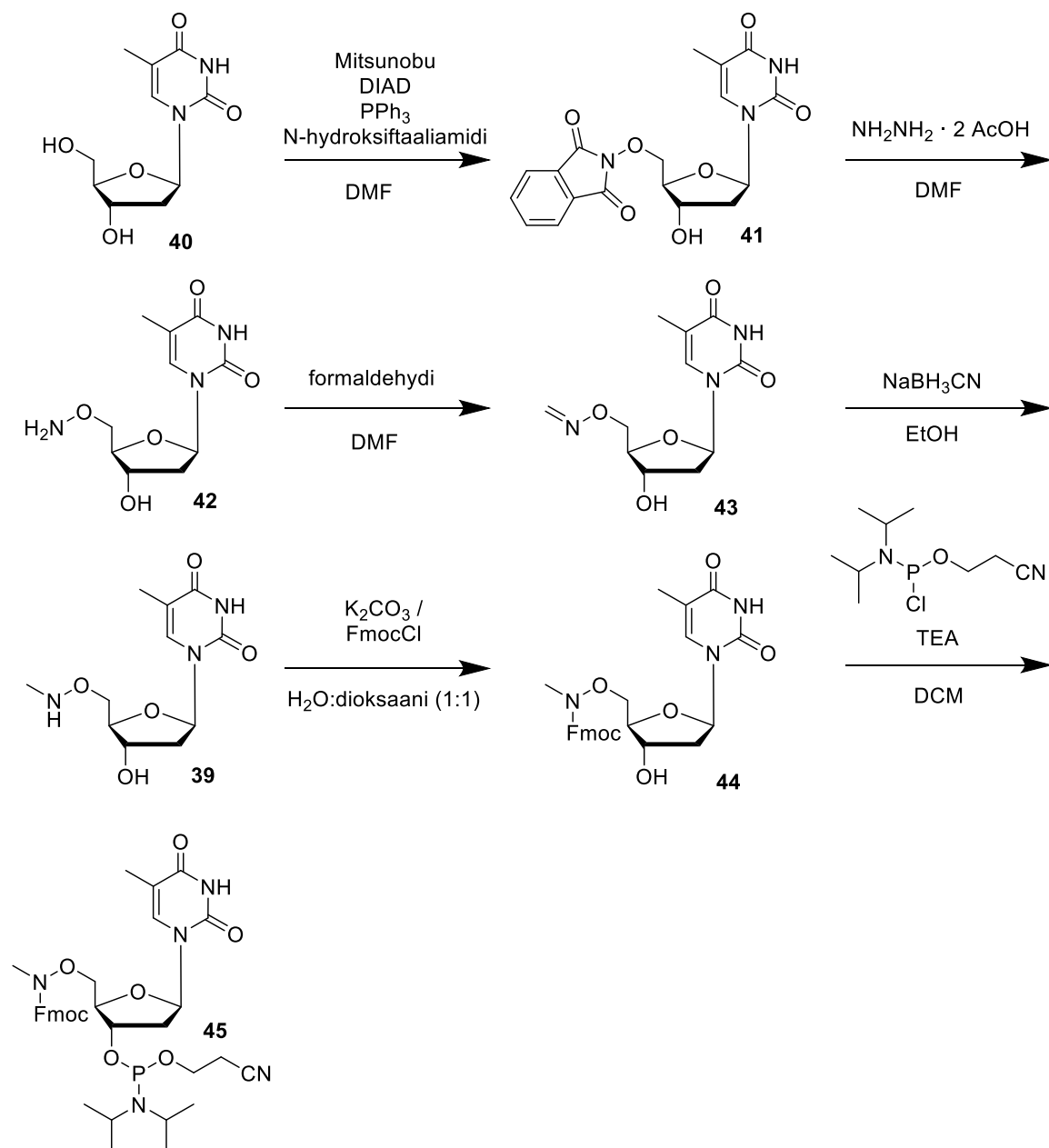
Kuva 10. 5'-O-(metyyliamino)tymidiinin ja D-glukoosin välisen reaktiotuotteen muodostuminen pH:ssa 5.

2.2.1. Kokeelliset menetelmät

2.2.1.1. Yleiset menetelmät

NMR-spektrit mitattiin Bruker 500 MHz-spektrometrillä. Oligonukleotidien synteesiin käytetyt fosforamidiitit ja kantajat kuivattiin vakuumieksikkaattorissa yön yli ennen käyttöä. Kuivat liuottimet kuivattiin 3 Å:n molekyylliseuloilla lukuun ottamatta kuivaa TEA:a, joka kuivattiin CaH₂:lla. Syntetisoitujen oligonukleotidien puhdistuksessa käytettiin käänteisfaasi-HPLC:tä (analyttinen HPLC-kolonne C18, 250 × 5,0, 4,5 μm). Gradientti 0-50 % MeCN 0,1 mol L⁻¹ trietyyliammoniumasetaatissa 0 – 30 min, virtausnopeus 1,0 ml/min, detektio 260 nanometrin aallonpituudella).

2.2.1.2. 5'-O-(metyyliamino)tymidiinin fosforamidiitin synteesi



Kaavio 25. 5'-O-(metyyliamino)tymidiinin fosforamidiitin (**9**) synteesi

2.2.1.2.1. Mitsunobu-reaktio

Tymidiini (**40**) (3,01 g, 12,4 mmol), trifenyylifosfiini (3,39 g, 12,9 mmol) ja *N*-hydroksiftaaliamidi (2,28 g, 14,0 mmol) liuotettiin noin 30 ml:aan DMF:a. Liuokseen lisättiin 2,45 ml DIADia (2,50 g, 12,4 mmol) injektioneulalla septumin läpi noin tunnin ajan. Liuoksen väri ei juurikaan muuttunut lisäyksen aikana, joten reaktion annettiin edetä yön yli. Reaktiota seurattiin ohutkerroskromatografisesti (DCM:MeOH 90:10) (*v/v*). Reaktio oli yön aikana edennyt loppuun. Liuos haihdutettiin mahdollisimman kuivaksi. Liuoksen jäännös liuotettiin noin 30 ml:aan DCM:a ja kaadettiin noin 150 ml:aan kylmää

vettä. Syntyi saostuma, joka suodatettiin talteen. Ohutkerroskromatografisesti karakterisoimalla varmistettiin, että saostuma oli puhdasta tuotetta **41**. Tymidiinin R_f oli 0,2; kun taas tuotteen **41** R_f oli 0,5. Tuotteen saanto oli 4,71 g (98 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektrometrisesti.

^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO): 11,29 (1H, s, NH), 7,89–7,84 (4H, m, ftaali-imidi), 7,58 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H6), 6,22 (1H, dd, $J = 6,5$ Hz ja 7,8 Hz, H1'), 5,47 (1H, d, $J = 4,2$ Hz, H3'), 4,40–4,36 (3H, m, H4', H5' ja OH), 4,10 (1H, dd, $J = 4,5$ Hz ja 7,4 Hz, H5''), 2,17–2,08 (2H, m, H2' ja H2''), 1,81 (3H, d, $J = 1,2$ Hz, MeThy)

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO): 164,2 (C4); 163,5 (CNO); 150,9 (C2); 136,3 (C6); 135,3 (ftaali-imidi); 129,0 (ftaali-imidi); 123,7 (ftaali-imidi); 110,3 (C5); 84,8 (C4'); 84,5 (C1'); 78,2 (C5'); 71,2 (C3'); 39,3 (C2'); 12,6 (MeThy)

2.2.1.2.2. Hydratsinolyysi ja oksimaatio formaldehydillä

Tuote **41** (4,71 g, 12,2 mmol) liuotettiin DMF:iin, johon lisättiin 1,20 g hydratsiinia (12,2 mmol). Reaktion nopeuttamiseksi lisättiin myöhemmin 0,64 g (6,51 mmol) lisää hydratsiinia. Reaktiossa muodostui välituote **42**. Reaktiota seurattiin ohutkerroskromatografisesti (DCM:MeOH 90:10) (v/v). Reaktion edettyä sopivan pitkälle, lisättiin 1,1 ml (0,92 g, 31 mmol) formaldehydiä. Liuos haihdutettiin kuiviin ja muodostunut tuote **43** puhdistettiin silikageelikromatografisesti (DCM:MeOH 90:10) (v/v). Saanto oli 2,77 g (88 %). $R_f = 0,5$. Tuote karakterisoitiin massa- ja NMR-spektrometrisesti.

^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 11,29 (1H, s, NH), 7,36 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H6), 7,13 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, $\text{H}_2=\text{N}$), 6,65 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, $\text{H}_2=\text{N}$), 6,19 (1H, dd, $J = 6,5$ Hz ja 7,4 Hz, H1'), 4,25 (1H, dd, $J = 4,0$ Hz ja 11,5 Hz, H3'), 4,25–4,23 (1H, m, H5'), 4,18 (1H, dd, $J = 5,7$ Hz ja 11,1 Hz, H5''), 3,95–3,92 (1H, m, H4'), 2,17 (1H, ddd, $J = 6,4$ Hz, 7,6 Hz ja 13,5 Hz, H2'), 2,08 (1H, ddd, $J = 3,5$ Hz, 6,3 Hz, 13,5 Hz, H2''), 1,78 (3H, d, $J = 1,1$ Hz, MeThy)

^{13}C NMR δ_{C} (125 Mhz, CDCl_3): 164,1 (C4); 150,9 (C2); 139,6 (C=N); 139,6 (C6); 110,1 (C5); 84,9 (C4'); 84,3 (C1'); 74,1 (C5'); 70,9 (C3'); 39,1 (C2'); 12,7 (MeThy)

ESI-MS($[\text{M}-\text{H}]^-$): m/z 268,0936; laskettu 268.0933.

2.2.1.2.3. Pelkistys

Pelkistykseen käytettiin 0,95 g (3,7 mmol) tuotetta **43**, joka liuotettiin 22 ml:aan absoluuttista etanolia. Liuokseen lisättiin 0,22 g natriumsyanoboorihydriidiä (3,5 mmol). Reaktioon annettiin edetä noin 2 tuntia. Reaktiota seurattiin ohutkerroskromatografisesti (DCM:MeOH 90:10) (v/v). Reaktio ei edennyt odotetun lailla, joten siihen lisättiin yhteensä 3 ekvivalenttia natriumsyanoboorihydriidiä. Reaktioon annettiin edetä useamman yön yli, jonka jälkeen päätettiin kokeilla reaktioliuoksen pH:n laskemista vetykloridilla. pH:n laskettua noin neljään reaktio eteni täysin loppuun. Liuos neutraloitiin (pH = 7-8) NaOH-liuoksella. Muodostunut tuote **39** puhdistettiin silikageelikromatografisesti (DCM:MeOH 90:10) (v/v). Saanto oli 1,12 g (saanto oli yli 100 %, mikä johtuu todennäköisimmin liuotinjäämistä). Tuote haihdutettiin kaksi kertaa kuivasta pyridiinistä. Tuote karakterisoitiin massa- ja NMR-spektrometrisesti. $R_f = 0,2$.

^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 7,55 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H6), 6,68 (1H, s), 6,19–6,16 (1H, dd, kytkeytymisvakio ei laskettavissa, H1'), 4,21 (1H, m, H3'), 3,93–3,90 (1H, m, H4'), 3,78 (1H, dd, $J = 4,0$ Hz ja 11,2 Hz, H5'), 3,69 (1H, dd, $J = 5,4$ Hz ja 11,2 Hz, H5''), 2,55 (3H, s, MeNO), 2,13 (1H, ddd, $J = 1,7$ Hz, 7,5 Hz ja 13,4 Hz, H2'), 2,07 (1H, ddd, $J = 3$ Hz, 6,3 Hz ja 10,2 Hz, H2''), 1,80 (3H, d, $J = 1,1$ Hz, MeThy)

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3): 164,2 (C4); 150,9 (C2); 136,4 (C6); 110,0 (C5); 85,1 (C4'); 84,3 (C1'); 73,3 (C5'); 71,2 (C3'); 39,3 (C2'); 39,0 (MeNO); 12,6 (MeThy)

ESI-MS($[\text{M}-\text{H}]^-$): m/z 270,1081; laskettu 270,1090.

2.2.1.2.4. Fmoc-suojaus

Tuote **39** (0,24 g, 0,88 mmol), K_2CO_3 (0,1297 g, 0,9385 mmol) ja FmocCl (0,2390 g, 0,9239 mmol) liuotettiin veden ja dioksaanin seokseen (10 ml, 1:1) (v/v). Reaktioon annettiin edetä noin 1–2 h, jonka jälkeen varmistettiin tuotteen **7** kuluneen loppuun ohutkerroskromatografisesti (DCM:MeOH 90:10) (v/v). $R_f = 0,4$. Fmoc-suojattu tuote **44** uutettiin vesifaasista lisäämällä liuokseen noin 20 ml kylläistä natriumvetykarbonaattiliuosta ja uuttamalla sitä neljästi noin 10–20 ml:lla DCM:a. Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuivaksi. Saatu tuote puhdistettiin vielä silikageelikromatografisesti (DCM:MeOH 95:5) (v/v). Saanto oli 0,16 g (38 %). Tuote karakterisoitiin massa- ja NMR-spektrometrisesti.

^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 7,79 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, Fmoc), 7,59 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,42 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,36–7,32 (3H, m, Fmoc ja H5), 6,30 (1H,

dd, $J = 6,6$ Hz ja $7,1$ Hz, H1'), 4,64 (2H, m, Fmoc), 4,35 (1H, s, H4'), 4,25 (1H, t, $J = 5,8$ Hz, Fmoc), 4,00–3,95 (1H, m, H5'), 3,9 (1H, m, H5''), 3,86–3,80 (1H, m, H3') 3,15 (1H, s, HN(Me)O), 2,31 (1H, ddd, $J = 3,4$ Hz ja 6 Hz ja $13,7$ Hz, H2'), 2,1 (1H, m, H2'') 1,9 (3H, s, MeThy)

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3): 163,8 (C4); 157,3 (Fmoc); 150,4 (C2); 143,5 (Fmoc); 141,4 (Fmoc); 135,6 (C6); 127,9 (Fmoc); 127,2 (Fmoc); 124,7 (Fmoc); 120,1 (Fmoc); 111,0 (C5); 85,0 (C4'); 84,2 (C1'); 73,5 (C5'); 71,7 (C3'); 67,5 (Fmoc); 47,2 (Fmoc); 40,3 (C2'); 36,5 (ONMe); 12,5 (MeThy)

ESI-MS($[\text{M}+\text{Na}]^+$): m/z 516,1730; laskettu 516,1747.

2.2.1.2.5. Fosfitylointireaktio

Tuote **44** (0,15 g, 0,30 mmol) liuotettiin typpikaapissa 5 ml:aan DCM:a. Liuokseen lisättiin trietyyliamiinia (77 μl , 1,3 eq) ja 2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyyliklorofosforamidiittia (88 μl , 1,2 eq). Reaktiota seurattiin ohutkerroskromatografisesti (DCM:MeOH 90:10) (v/v). Reaktion nopeuttamiseksi liuokseen lisättiin myöhemmässä vaiheessa vielä 50 μl sekä TEA:a että 2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyyliklorofosforamidiittia. Reaktion kuluttua loppuun tuote **45** puhdistettiin silikageelikromatografisesti (ajoliuoksena etyyliasettaatti + 2 % TEA). Tuote haihdutettiin vielä kerran asetonitrilistä. Saanto oli 0,195 g (94 %). Tuote karakterisoitiin massa- ja NMR-spektrometrisesti.

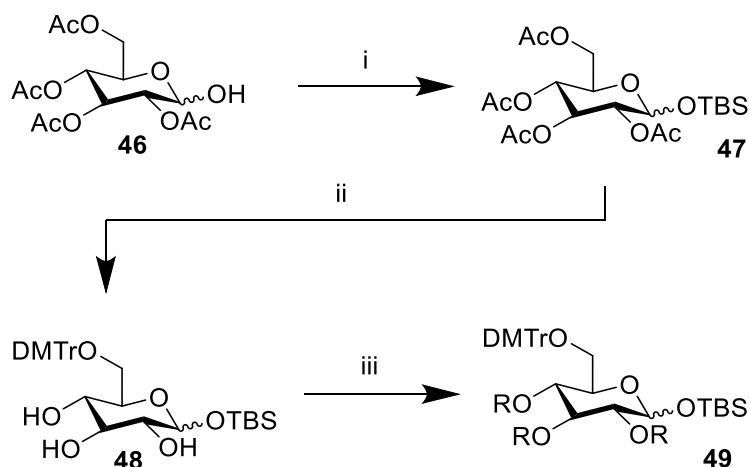
^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 7,84–7,81 (2H, m, Fmoc), 7,67–7,64 (2H, m, Fmoc), 7,46–7,39 (3H, m, Fmoc ja H6), 7,36–7,31 (1H, m, Fmoc), 6,25 (1H, dd, $J = 4,1$ Hz ja $7,9$ Hz, H1'), 4,58–4,52 (2H, m, Fmoc), 4,50–4,46 (1H, m, Fmoc), 4,31–4,28 (1H, m, H4'), 4,20–4,13 (1H, m, H3') 4,01–3,90 (2H, m, H5' ja H5''), 3,85–3,66 (2H, m, POCH_2), 3,66–3,58 (2H, m, $\text{N}(\text{CH}(\text{Me})_2)_2$), 3,10 (3H, d, $J = 9,5$ Hz), 2,69–2,64 (2H, m, CH_2CN), 2,40–2,29 (1H, m, H2'), 2,21–2,13 (1H, m, H2''), 1,80 (3H, s, MeThy), 1,24–1,14 (12H, m, iPr)

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3): 164,0 (C4); 157,1 (Fmoc); 150,6 (C2); 143,9 (Fmoc); 141,3 (Fmoc); 141,2 (Fmoc); 136,0 (C6); 127,7 (Fmoc); 127,2 (Fmoc); 118,6 (CN); 117,3 (C5); 110,4; 84,9 (C1'); 83,6 (C4'); 73,9 (C5'); 73,7 (C3'); 67,4 (Fmoc); 58,5 (POCH_2); 47,1 (Fmoc); 43,1 (iPr); 38,7 (C2'); 36,1 ($\text{N}(\text{Me})\text{O}$); 24,0 (iPr); 20,0 (CH_2CN); 11,6 (MeThy)

^{31}P NMR δ_{P} (200 MHz, CDCl_3): 148,3

ESI-MS([M+K]⁺): m/z 732,2589: laskettu 732.2565.

2.2.1.3. Sokerikantajan synteesi



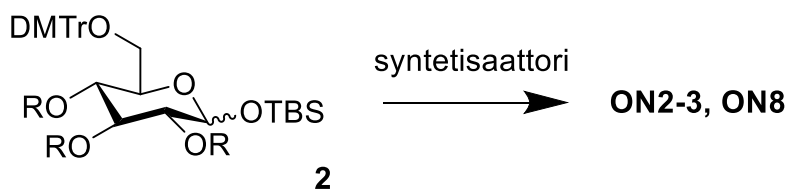
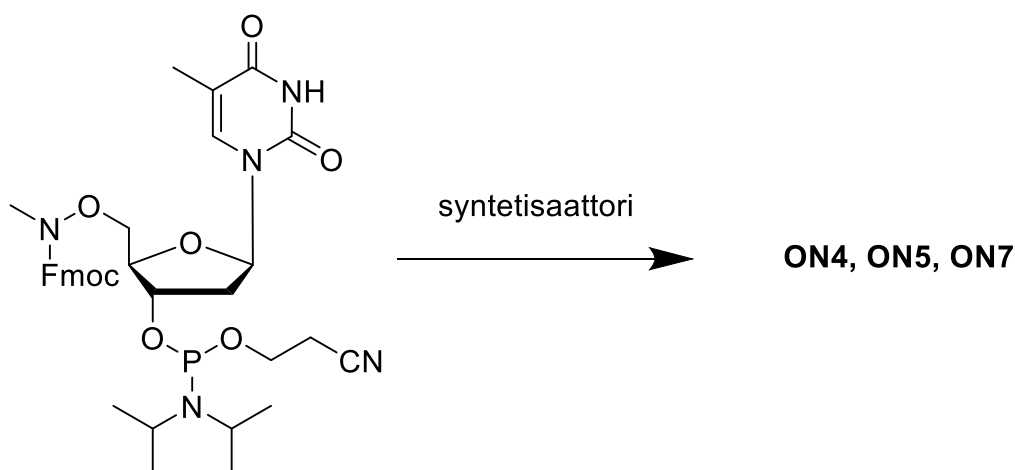
R = yksi kiinni LCAA-CPG-kantajassa, loput Ac

Kaavio 26. Sokerikantajan synteesi. i) TBSCl, imidatsoli, DMF (50 °C), ii) 1. 0,01 M NaOMe/MeOH, 2. DMTrCl, pyridiini, iii) 1. meripihkahappoanhydridi, DMAP, pyridiini, 2. PyBOP, DIEA, LCAA-CPG, 3. Ac₂O, lutidiini, 1-metyyli-imidatsoli, THF

Yhdisteet **46**, **47** ja **48** syntetisoitiin kaavion 26 mukaisesti ennen erikoistytöä. **48** (16 mg, 27 μmol), meripihkahappoanhydridi (2.7 mg, 27 μmol) ja katalyyttinen määrä DMAP:ia liuotettiin 0,2 ml:aan kuivaan pyridiiniin, ja liuosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Tämän jälkeen seos haihdutettiin pyöröhaihduttimella kuivaksi. Jäännös liuotettiin 0.5 ml:aan DMF:a ja suspentoitiin 150 mg:n LCAA-CPG-kantajan kanssa. Liuokseen lisättiin PyBOP (27 μmol) ja DIEA (54 μmol) ja suspensiota sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä. Kantaja suodatettiin, pestiin DMF:llä, MeOH:lla ja DCM:lla, ja tämän jälkeen kantaja asetyloitiin altistamalla se etikkahappoanhydridin, lutidiinin, *N*-metyyli-imidatsolin ja THF:n sekoitukselle (5:5:8:82 v/v/v/v) huoneenlämmössä. Asetyloitu kantaja (**49**) suodatettiin, pestiin THF:llä ja dikloorimetaanilla ja kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. 10 mg kantajaa käytettiin DMTr-kationimääritykseen 3 % dikloorietikkahapon DCM-liuoksessa, jonka perusteella kantajalla olevan glukoosin määräksi saatiin 20 μmol g⁻¹. DMTr-kationimäärityksessä kantajasta otettiin 10 mg:n näyte, joka suspentoitiin tunnettuun tilavuuteen 3% diklorometaanin ja trikloroetikkahapon liuokseen. Vapautuneen trityyli-kationin konsentraatio määritettiin UV-spektrofotometrillä, jonka perusteella laskettiin kantajaan sitoutuneen glukoosin määrä.

2.2.1.4. Oligonukleotidien synteesi

Kaikki syntetisoidut oligonukleotidit valmistettiin automatisoidulla DNA/RNA-syntetisaattorilla käyttäen standardeja DNA-fosforamidiitteja, tymidiinikantajaa, fosforamidiittia **45** ja kantajaa **49** (Kaavio 27). Bentsyylitiotetratsolia käytettiin aktivaattorina. **ON3** valmistettiin 0,5 mikromoolin skaalassa, kun taas muut oligonukleotidit valmistettiin 1 mikromoolin skaalassa.

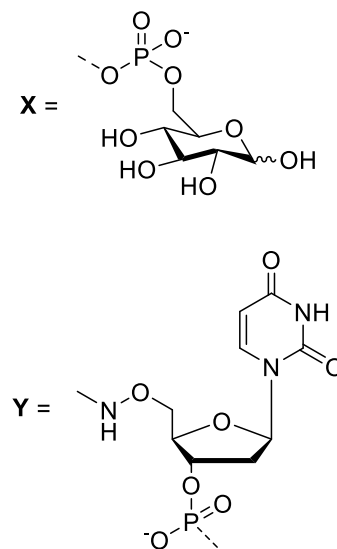


R = yksi kiinni LCAA-CPG-kantajassa, loput Ac

Kaavio 27. Modifioitujen oligonukleotidien synteesi.

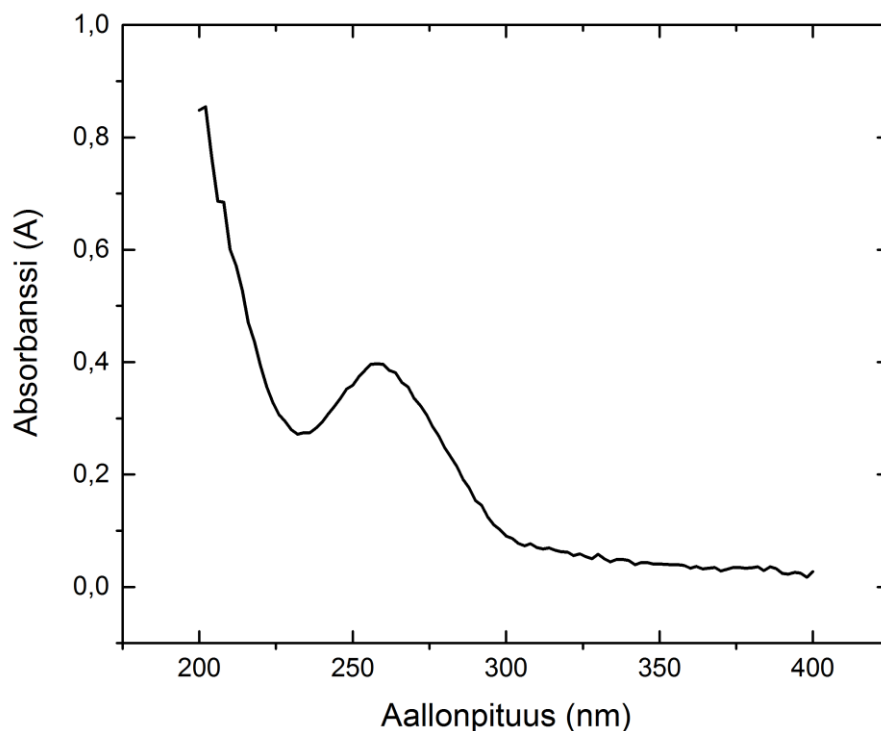
Taulukko 3. Syntetisoidut oligonukleotidit.

ON1	CCA ACC AAG AGA GAG-5'
ON2	5'-GGT TGG X
ON3	5'-GGT TGG TX
ON4	YC TCT TGG-3'
ON5	YTC GCG ATC GCG ATG GTA CGA ATT-3'
ON6	C CAT GCT TAA-5'
ON7	Y CGC GAG CGT ACG CTC GCG ATG GTA CGA ATT-3'
ON8	XC CAT GCT TAA-5'



Standardeille fosforamidiiteille käytettiin 20 sekunnin kytkentäaikaa ja **45**:lle 600 sekunnin. Synteesin jälkeen oligonukleotidit altistettiin 33 % ammoniakkin vesiliuokselle ja laitettiin 55 °C-asteiseen lämpökaappiin (**ON1-7**: 5 h, **ON6**: 1 h). Tämän jälkeen suspensiot suodatettiin ja suodokset haihdutettiin kuivaksi. **ON8**-jäännös liuotettiin trietyylitrihydrofluoridin (75 µl), trietyyliamiinin (60 µl) ja DMSO:n (115 µl) sekoitukseen (2 h, 50 °C). Liuokseen lisättiin 0,1 M NaOAc:ta (10 ml) ja sekoitus applikoitiin käänteisfaasikolonniin. Käänteisfaasikolonnia eluotettiin 0,1 M Et₃N⁺AcO⁻:n vesiliuoksella (6.0 ml, pH = 7,0) ja tämän jälkeen 60 % asetonitriilin vesiliuoksella, jolloin saatiin tuote kolonnista ulos. Asetonitriilifaasit haihdutettiin kuivaksi. Oligonukleotidien jäännökset haihdutettiin veteen ja puhdistettiin käänteisfaasi-HPLC:llä.

Homogenisoidut oligonukleotidit kylmäkuivattiin, liuotettiin 200 µl:aan Milli-Q-vettä ja karakterisoitiin massaspektrometrisesti (ESI-TOF). Lopullinen saanto määritettiin spektrofotometrisesti mittaamalla UV-absorbanssia aallonpituudella 260 nm (**ON1**: 47 %, **ON2**: 23 %, **ON3**: 11 %, **ON4**: 19 %, **ON5**: 12 %, **ON6**: 36 %, **ON7**: 11 %, **ON8**: 25 %). Liitteinä HPLC-kromatogrammit ja massaspektrit.



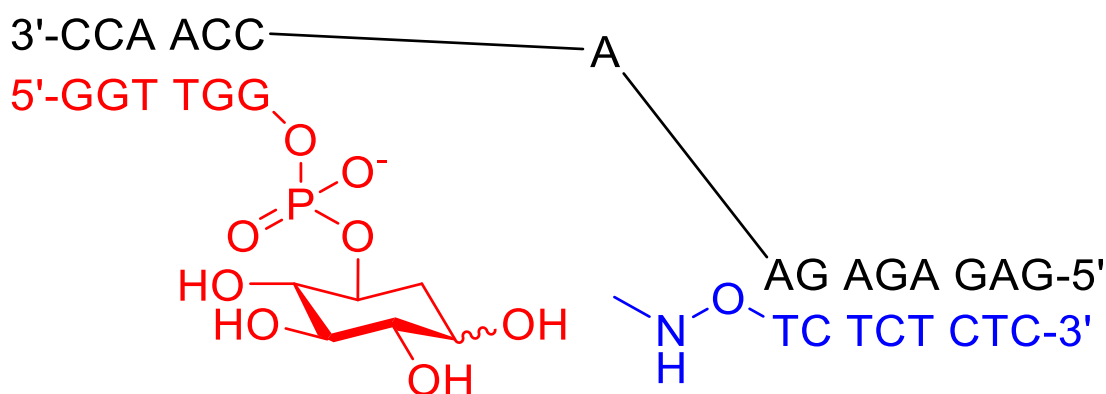
*Kuva 11. Tyypillinen esimerkki mitatusta oligonukleotidin UV-absorbanssista, tässä kuvassa **ON5**:n laimennos. Mitattujen spektriin huiput olivat välillä 255-265 nm.*

Taulukko 4. Modifioitujen oligonukleotidien laskettu massa ja havaittu massa

Oligonukleotidi	Laskettu massa (Da)	Havaittu massa (Da)
ON2	2104,4	2104,5
ON3	2409,6	2409,7
ON4	2420,6	2341,4
ON5	7412,9	7109,1
ON7	9581,3	9581,9
ON8	3228,9	3228,1

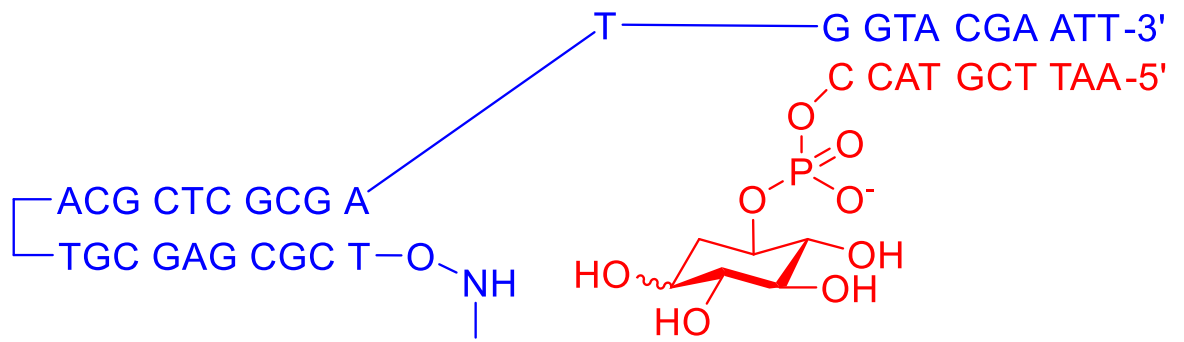
2.2.1.5. DNA-templatoitun *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaation seuraaminen

Oligonukleotideista **ON1**, **ON2** ja **ON4** valmistettiin puskuroitu liuos (pH = 5,0, 10 μ M kutakin oligonukleotidia, t = 24 $^{\circ}$ C), jota seurattiin ioninvaihto-HPLC:llä (analyttinen monoliittinen ioninvaihtokolonni, virtaus 1,5 ml min⁻¹, detektio aallonpituudella 260 nm, gradientteluointi 40 $^{\circ}$ C:ssä 17-200 mmol L⁻¹ NaClO₄:ää 20 mM:ssa Tris-puskuria, 0-30 min). Reaktiota ei havaittu. Syyksi epäilen epäsopivaa reaktiogeometriaa. Esimerkiksi reaktiiviset ryhmät saattoivat jäädä liian kauaksi toisistaan, tai niiden välinen kulma oli liian suuri tai muuten reaktion kannalta huono.

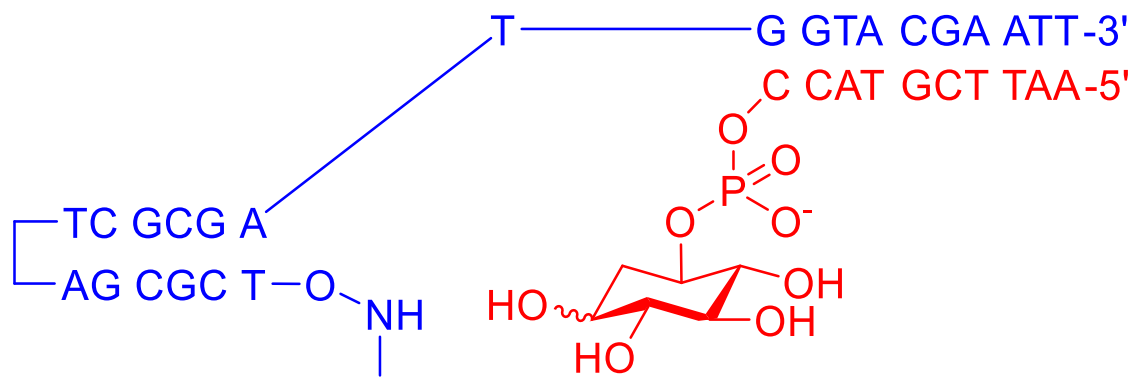


Kuva 12. **ON1:n**, **ON2:n** ja **ON4:n** hybridisaatio.

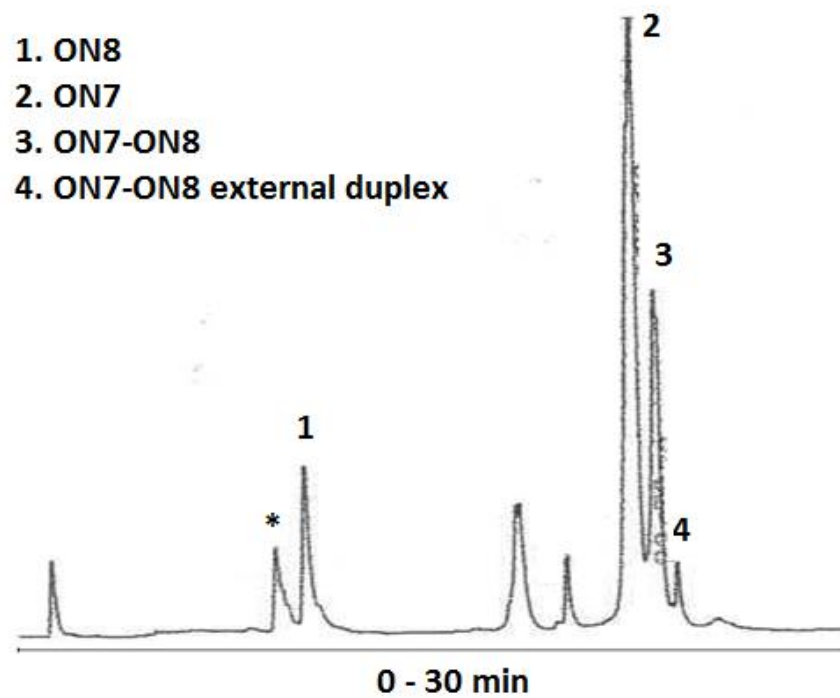
Oligonukleotideista **ON5** ja **ON8** sekä **ON7** ja **ON8** valmistettiin puskuroitu liuos (pH = 5,0; 10 μ l **ON5** ja 20 μ l **ON6**, t = 24 $^{\circ}$ C, pH = 5,0; 10 μ l **ON7** ja 10 μ l **ON8**, t = 24 $^{\circ}$ C), josta injektointiin 10 μ l:n näyte ioninvaihto-HPLC:hen (analyttinen monoliittinen ioninvaihtokolonni, virtaus 1,5 ml min⁻¹, detektio aallonpituudella 260 nm, gradientteluointi 40 $^{\circ}$ C:ssä 17-200 mmol l⁻¹ NaClO₄:ää 20 mM:ssa Tris-puskuria 0-30 min).



Kuva 13. **ON5:n** ja **ON8:n** välinen hybridisaatio.

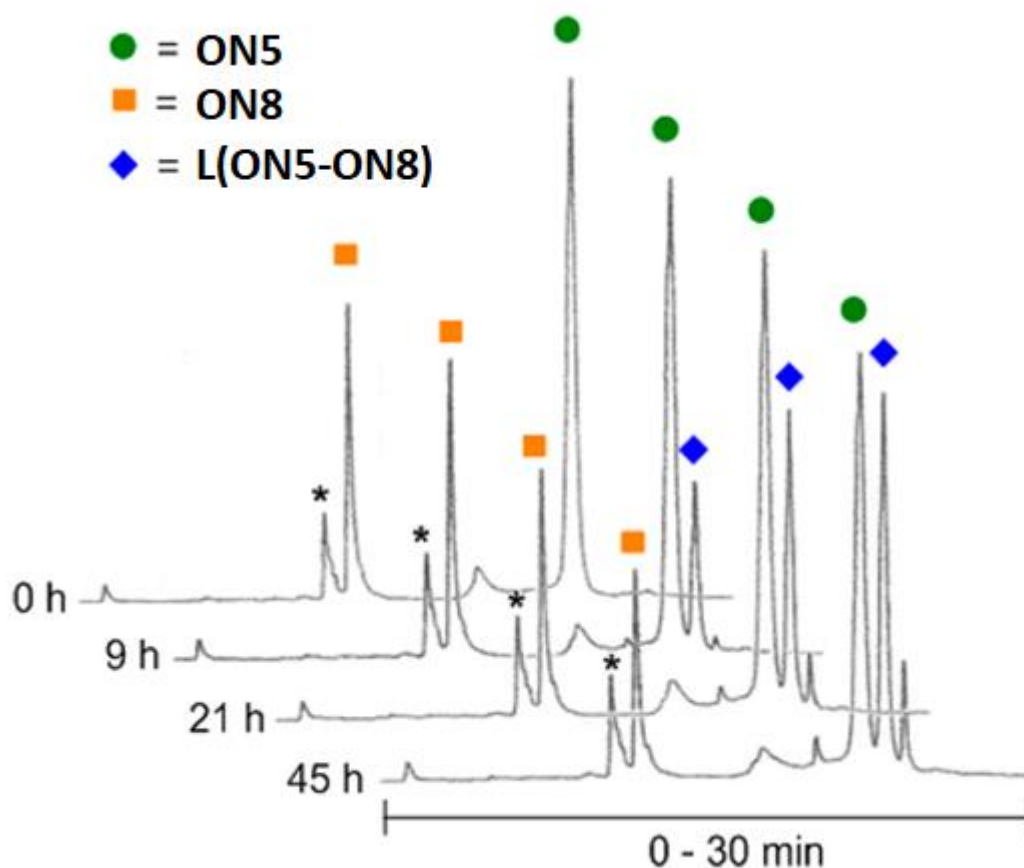


Kuva 14. **ON7:n** ja **ON8:n** välinen hybridisaatio.



Kuva 15. **ON7-ON8**-liuoksen ioninvaihto-HPLC-kromatogrammi reaktion edettyä loppuun, reagoinut 73 h. Tähdellä merkitty piikki on **ON8**-oligonukleotidiin liittyvä sivutuote.

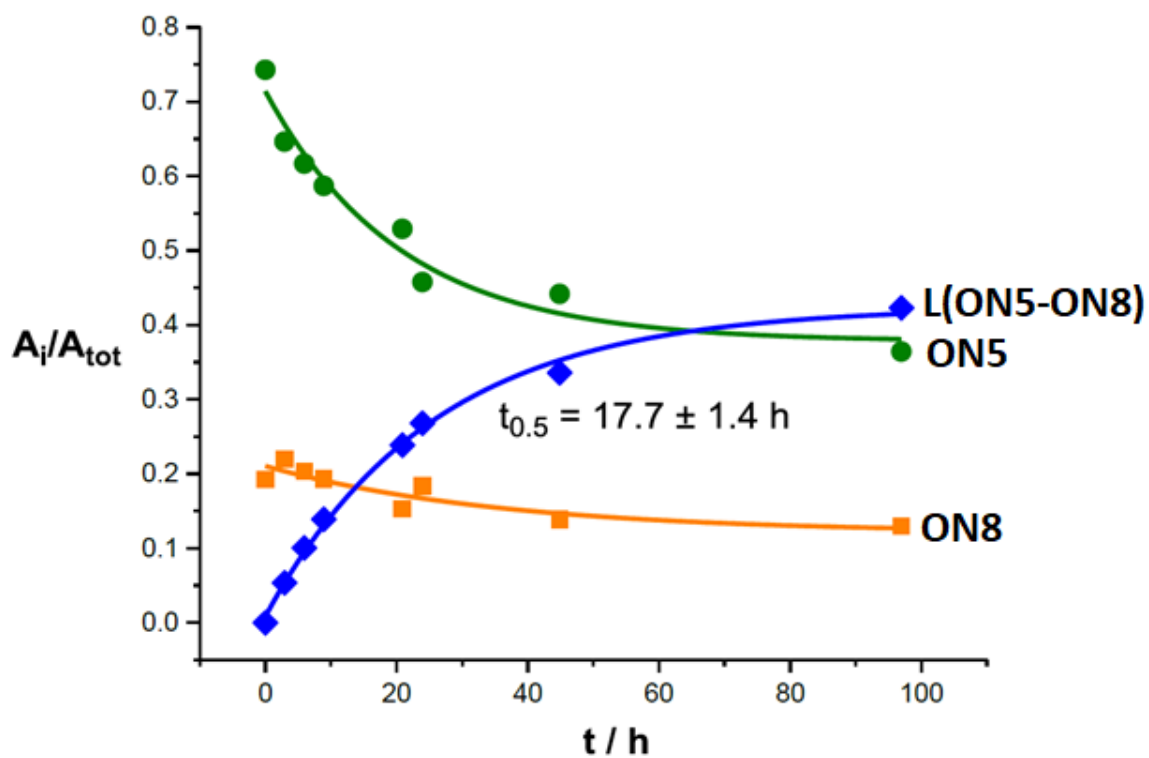
Toinen identtinen puskuroitu **ON5-ON8**-liuos valmistettiin, ja sitä seurattiin ioninvaihto-HPLC:llä injektoiden 10 µl:n näyte parin tunnin välein. Ligaatioreaktion puoliintumisajaksi saatiin $17,7 \pm 1,4$ h, mikä oli huomattava nopeutuminen vastaavien monomeerien väliseen reaktioon. Lisäksi valmistettiin toinen **ON7-ON8**-liuos, jonka avulla seurattiin **ON7-ON8**-glykosylaatiota. Reaktion puoliintumisajaksi saatiin $9,8 \pm 1,1$ h. **ON7-ON8**-glykosylaation puoliintumisaika oli lyhyempi, mutta tuotetta muodostui tasapainossa pienemmällä saannolla kuin **ON5-ON8**-glykosylaatiossa. Syy ei ole selvä, mutta koska **ON5**:n ja **ON7**:n ainoa ero on hiusneulakäännöksen suuruus, sen täytyy jollain tavalla vaikuttaa reaktion kulkuun. **ON7**:n suurempi hiusneularakenne voi mahdollisesti toimia jonkinlaisena esteenä reaktion etenemiselle.



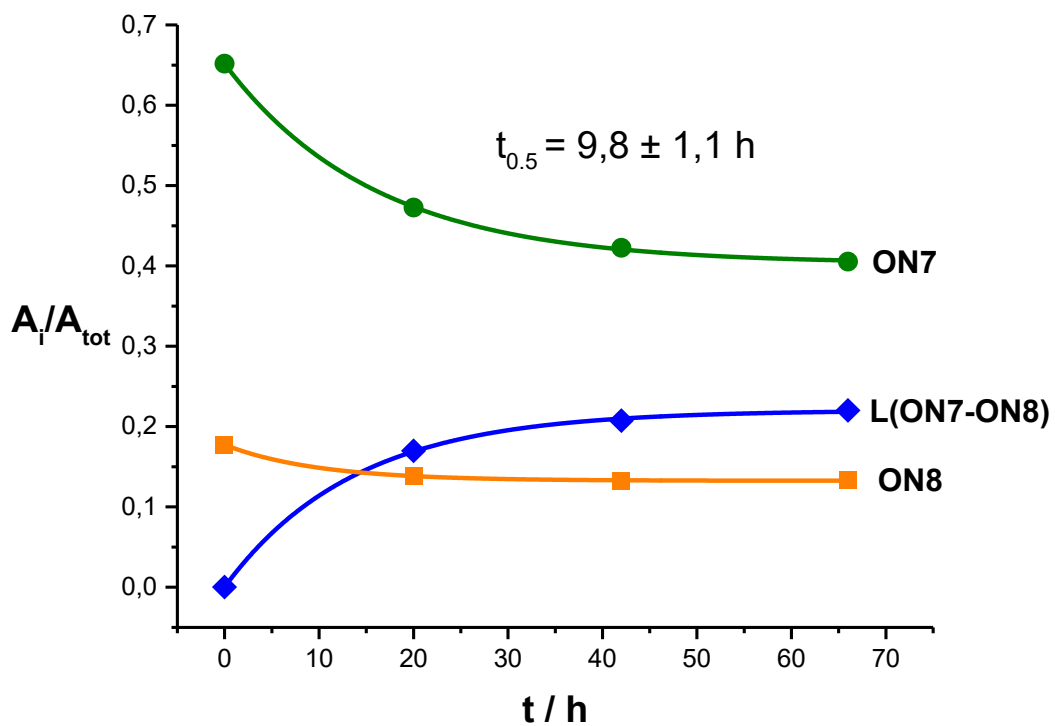
Kuva 16. **ON5-ON8**-liuoksen ioninvaihto-HPLC-kromatogrammit reaktion edetessä 0 – 45 h. Tähdellä merkitty piikki on **ON8**-oligonukleotidiin liittyvä sivutuote.

Lopulta todettiin myös, että reaktiotuote **L(ON5-ON8)** on pysyvä pH:ssa 7 seuraamalla puskuriliuokseen liuotettua reaktiotuotetta kahden viikon ajan. Eristetyssä tuotteessa ei ollut havaittavissa minkäänlaista hajoamista, joten *N*-glykosidisen sidoksen voidaan sanoa olevan pysyvä neutraalissa pH:ssa. Lisäksi **L(ON5-ON8)**:n hajoamista seurattiin pH:ssa 5, jolloin sen puoliintumisajaksi saatiin $11,8 \pm 1,0$ h, eli reaktio todettiin myös

reversiibeliksi. Nämä ominaisuudet ovat olennaisia mahdollisten sovelluskohteiden suunnittelussa.



Kuva 17. ON5-ON8-liuoksen ligation reaktioprofili



Kuva 18. ON7-ON8-liuoksen ligation reaktioprofili

2.3. Sovelluskohteet

Edellä esitetyn mukaisesti dynaamiseen kombinatoriseen kemiaan soveltuvan reaktion vaatimuksiin lukeutui muun muassa dynaamisuus ja reversiibeliys, reversiibeliys järkevässä aikaskaalassa, miedot olosuhteet ja kyky pysäyttää reaktio jollain tavalla. Kehitetty DNA-templatoitu *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio täyttää nämä kriteerit. Se on reversiibeli ja tuotteen havaittiin hajoavan lähtöaineikseen puoliintumisajalla $11,8 \pm 1,0$ h. Lisäksi reaktio tapahtuu lievästi happamissa olosuhteissa ja on lähes bio-ortogonaalinen. Reaktio voidaan pysäyttää helposti ja jäljettömästi neutralisoimalla reaktioliuos. Tämän vuoksi *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio on varteenotettava reaktio dynaamisen kombinatorisen kemian kannalta.

Yksi mahdollinen sovelluskohde voisi olla yksittäisen emäspoikkeavuuden eli SNP:n detektoiminen DNA-juosteessa. Tarkemmin sanottuna SNP:llä tarkoitetaan geneettistä vaihtelua, jossa kaksi tai useampi alleeli esiintyy ihmispopulaatioissa. Tyypillisesti näiden detektointiin on käytetty entsyymaattisia menetelmiä, mutta myös ei-entsyymaattisia menetelmiä on kehitetty. Vastikään on kehitetty myös dynaamista kombinatorista kemiaa hyödyntävä menetelmä.⁵³ Tässä menetelmässä syntetisoitiin PNA-juoste, jossa tutkittavaa emäspoikkeavuutta vastapäätä oleva nukleoemäs oli poistettu. DNA/PNA-juosteen annettiin hybridisoitua, jonka jälkeen liuokseen lisättiin neljä aldehydymodifioitua nukleoemästä. Tutkittavaan emäspoikkeavuuteen sopiva nukleoemäs asettui tällöin PNA:n tyhjää kohtaa vastapäätä, ja sen aldehydiosa reagoi tällöin reversiibelisti PNA:n sekundäärisen amiinin kanssa. Reaktio voidaan pysäyttää pelkistämällä, ja tämän jälkeen tuotteesta voidaan massaspektrometrisesti päätellä, mikä emäs tutkittavassa DNA-juosteessa oli.

N(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiota hyödyntävässä SNP:n havaitsemismenetelmässä reversiibeli reaktio olisi oligomeerien välillä tapahtuva ligaatio. Vain komplementaarinen oligomeeri reagoisi templaatin kanssa ja ajaisi näin kyseisen reaktion tasapainoa eteenpäin. Tällä tavalla dynaamisen kombinatorisen kemian avulla laajasta kirjastosta voidaan löytää komplementaarinen juoste.

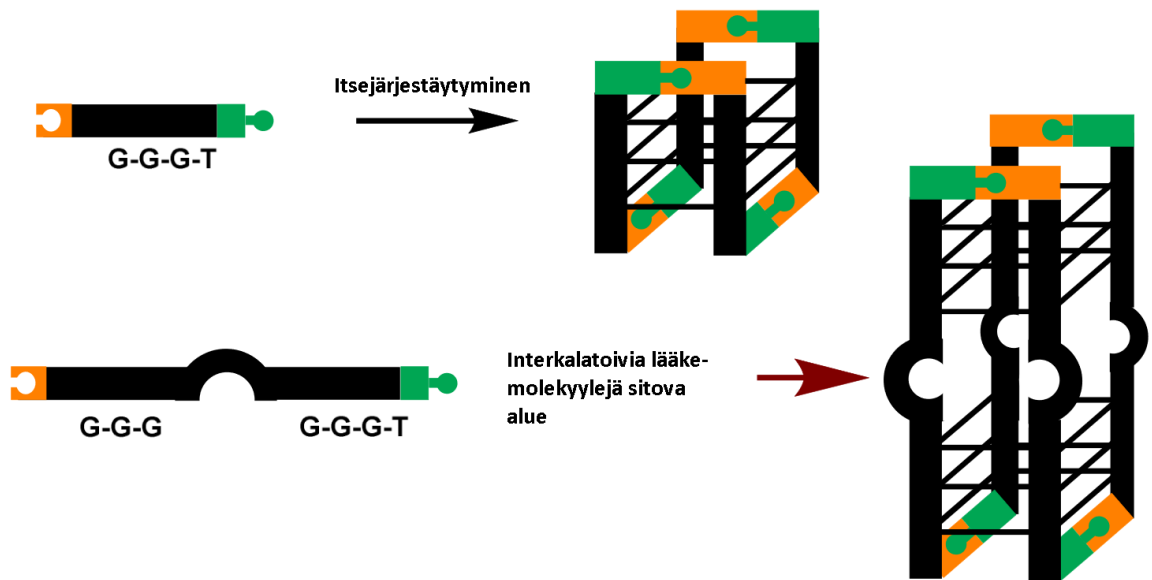
Toinen mahdollinen sovelluskohde on supramolekulaaristen rakenteiden synteesi. Yksi mahdollisuus olisi itsejärjestäytyneet G-kvadrupleksirakenteet. G-kvadruplekseilla tiedetään olevan monia mielenkiintoisia sovelluskohteita.⁵⁴ Niitä on hyödynnetty esimerkiksi lääkeaineiden kuljetuksessa.⁵⁵

G-kvadrupleksit ovat nelijuosteisia DNA:n sekundäärirakenteita, jotka muodostuvat paljon guanosiinia sisältävistä juosteista, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa syklisesti Hoogsteen-emäspariutumisen tavallisen DNA:n Watson-Crick-emäspariutumisen sijaan.⁵⁶ Nämä neliömäiset rakenteet ovat pinoutuneet itse G-kvadrupleksiksi, joka on tyypillisesti kalium- tai natriumkationin stabiloima. G-kvadruplekseja esiintyy luonnollisesti ihmiselimistössä esimerkiksi telomeereissä. G-kvadrupleksit voivat muodostua yhdestä DNA-juosteesta, joka ikään kuin pujottelee edestakaisin muodostaen sille ominaisen pinoutuneiden tasomaisten neliöiden rakenteen, tai useammasta erillisestä DNA-juosteesta, jotka ovat liittyneet toisiinsa.

Esimerkiksi Wang et al. ovat hyödyntäneet G-kvadrupleksien lääkkeidenkuljetusominaisuutta tutkimuksessaan.⁵⁷ Siinä he käyttivät 5,10,15,20-tetrakis-(1-metyyli-4-pyridyyli)-21*H*,23*H*-porfiinia eli TMPyP4:ä lääkkeenä. Se on valoherkiste, joka tietylle valon aallonpituudelle altistettuna muodostaa solussa reaktiivisia happiyhdisteitä, jotka ovat myrkyllisiä solulle. TMPyP4:n tiedettiin myös interkalatoituvan G-kvadrupleksirakenteiden kanssa, kuten porfyriinirakenteille on ominaista. Tavoitteena oli siis kehittää menetelmä, jolla TMPyP4 saataisiin kuljetettua elimistöön ja kohdistettua syöpäsoluihin.

Tämän he saavuttivat syntetisoimalla kaksifunktionaalisen DNA-rakenteen, joka koostuu lääkeainetta kuljettavasta G-kvadrupleksista ja DNA-aptameerista, joka toimii kohdistusmolekyylinä. Käytetyn aptameerin Sgc8:n tiedettiin sitoutuvan hyvin CCRF-CEM solujen kanssa, jotka ovat ihmisen akuutin lymfaattisen leukemian prekursori. Tutkimuksessa Sgc8-aptameeriin liitettiin TTGT-tetrameeri, jonka jälkeen oligomeerien havaittiin itsejärjestäytyvän halutuksi G-kvadrupleksirakenteeksi puskuriliuoksessa. Lopulta tutkittiin lääkkeen spesifisyyttä, ja havaittiin että muodostettu G-kvadrupleksi-Sgc8-rakenne kohdisti lääkkeen selektiivisesti tutkittuihin kohdesoluihin, ja minimoi myrkyllisyyden verrokkina käytetyissä soluissa.

Kuvassa 19 on esitetty mahdollisia DNA-templatoitua *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiota itsejärjestäytymiseen hyödyntäviä DNA-pohjaisia G-kvadrupleksirakenteita, joilla voi olla samankaltaisia mielenkiintoisia lääkeaineiden kuljetukselle hyödyllisiä ominaisuuksia. Kuvan esimerkeissä hyödynnettäisiin neljää erillistä guanosiinirikasta oligomeeriä, joiden päihin on liitetty *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiolle ominaiset 3'-pään glukoosi ja 5'-pään *N*(Me)-modifikaatio.



Kuva 19. Kovalenttiset ristikytännät DNA-pohjaisten itsejärjestäytyvien rakenteiden muodostamisessa.

2.4. Yhteenveto

Erikoistyön tavoitteena oli kehittää DNA-templatoitu $N(\text{Me})$ -alkoksiamiiniglykosylaatioreaktio, ja tässä onnistuttiin. DNA-templatoitu reaktio hiusneulamallilla osoitettiin vakuuttavasti toimivaksi ja nopeammaksi kuin monomeerien välinen reaktio pH:ssa 5. Alkuperäisellä kolmen oligonukleotidin mallilla, jossa yksi templaatti ohjaa kahta erillistä oligonukleotidia, ei kuitenkaan havaittu reaktiota. Varmuutta tämän syystä ei ole, mutta luultavasti se liittyy jotenkin oligonukleotidien geometriaan. Kenties templaattiin sitoutuneet oligonukleotidit ovat liian lähellä toisiaan, tai väärässä kulmassa toisiinsa reaktion kannalta.

Oligonukleotidien synteesiin vaadittavien reagenssien synteesi sujui ongelmitta ja hyvillä saannoilla. Itse oligonukleotidien synteesi sujui myös ilman suuria ongelmia. Oligonukleotidien synteesissä oli kuitenkin huomattavaa se, miten paljon pienempi saanto saatiin aikaiseksi modifioituilla reagensseilla verrattuna kaupallisiin reagensseihin. Esimerkiksi **ON1**:n saanto oli melkein 50 %, kun modifioitua Me-NH-5' - O -tymidiiniä sisältäneiden oligonukleotidien saanto oli 10-20 %. Tymidiinin modifikaatio saattaa hankaloittaa liitääntä, tai mahdollisesti fosforamidiitti oli ehtinyt hajota tai muuten ollut epäpuhdasta. Saannot olivat kuitenkin riittävät tehtyihin reaktioihin.

Tutkittu reaktio käyttäytyi odotetun lailla. Kuten alkuperäinen glykosylaatioreaktio, reaktio on pH-riippuvainen. Reaktiotuotteen pysyvyys varmistettiin neutraalissa pH:ssa,

ja se todettiin myös hajoavan alhaisessa pH:ssa, kuten oli odotettu. Tämänlainen dynaaminen, reversiibeli reaktio on olennainen monien sovelluskohteiden kannalta. Lisäksi reaktion havaittiin nopeutuvan merkittävästi verrattuna monomeerien väliseen reaktioon, kuten DNA-katalyyttiseltä reaktiolta odotettiin. Lisäksi reaktio tapahtui hyvin pienissä konsentraatioissa – tämän tutkimuksen tapauksessa 10 μM :n konsentraatioilla – mikä on tyypillistä DNA-templatoituille reaktioille, sillä DNA-templatointi kasvattaa paikallista konsentraatiota.

Huomattavaa oli se, kuinka **ON7-ON8**-ligaation tasapainosaanto jäi merkittävästi pienemmäksi kuin **ON5-ON8**-ligaation. Syy tähän ei ole selvä, mutta koska ainoa ero **ON5:n** ja **ON8:n** välillä on hiusneulakierteen pituus, sen täytyy vaikuttaa reaktioon jollain tavalla. Pidempi hiusneularakenne saattaa toimia jollain tavalla joko steerisenä esteenä reaktiolle, tai se vaikuttaa hiusneulaoligonukleotidin geometriaan jotenkin reaktiota haittaavalla tavalla.

Tulevaisuudeksi tämän reaktion kannalta tutkittavaksi jäivät sovelluskohteet, kuten dynaamiset kombinatoriset kirjastot ja itsejärjestäytyvät supramolekulaariset DNA-rakenteet. Kehitetyllä reaktiolla tiedetään olevan näihin sovelluskohteisiin vaadittavat ominaisuudet, kuten tutkimuksessa osoitettiin. Lisäksi reaktiokinetiikkaan ja -geometriaan liittyvät auki jääneet kysymykset ovat tutkimisen arvoisia. Erilaisia DNA-arkkitehtuureita hyödyntäen voitaisiin optimoida tässä erikoistyössä esiteltyä hiusneulamallia entisestään, ja samalla selvittää tarkemmin, miten oligonukleotidin rakenne vaikuttaa reaktion tasapainoon.

3. Lähteet

- [1] Moradi, S. V.; Hussein, W. M.; Varamini, P.; Simerska, P.; Istvan, T. *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 2492-2500.
- [2] Adamczyk, B.; Tharmaligam, T.; Rudd, P. M. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 1347–1353.
- [3] Peri, F.; Dumy, P.; Mutter, M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12269–12278.
- [4] Langenhan, J. M.; Endo, M. M.; Engle, J. M.; Fukumoto, L. L.; Rogalsky, D. R.; Slevin, L. K.; Fay, L. R.; Lucker, R. W.; Rohlfing, J. R.; Smith, K. R.; Tjaden, A. E.; Werner, H. M. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 2663–2676.
- [5] Percivalle, C.; Bartolo, J.; Ladame, S. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 16–26.
- [6] McLaughlin, C. K.; Hamblin, G. D.; Sleiman, H. F. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4647–5656.
- [7] O'Reilly, R. K.; Turberfield, A. J.; Wilks, T. R. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (10), 2496–2509.
- [8] Österlund, T.; Korhonen, H.; Virta, P. *Org. Lett.*, **2018**, *20*, 1496–1499.
- [9] Brito-Arias, M. *Synthesis and Characterization of Glycosides* Springer: New York, 2007.
- [10] Nature <https://www.nature.com/subjects/glycosides> (viitattu 30.10.2018)
- [11] Aebi, M.; Schwarz, F. *Curr Opin Struct Biol.* **2011**, *21*, 576–582.
- [12] Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. E *Essentials of Glycobiology* Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2009.
- [13] Weerapana, E.; Imperiali, B. *Glycobiology* **2006**, *16*, 91R–101R.
- [14] Koeller, K. M.; Wong, C. *Chem Rev.* **2000**, *100*, 4465–4493.
- [15] Solá, R. J.; Griebenow, K. *BioDrugs*, **2010**, *24*, 9–21.
- [16] Nicolas, C.; Martin, O. R. *Molecules*, **2018**, *23*, 1612.

- [17] Germain, D.; Giugliani, R.; Hughes, D.; Mehta, A.; Nicholls, K.; Barisoni, L.; Jennette, C.J.; Bragat, A.; Castelli, J.; Sitaraman, S.; Lockhart, D. J.; Boudes, P. F. *Orphanet J. Rare Dis.* **2012**, *7*, 91.
- [18] Scott, L. J. *Drugs*, **2000**, *59*, 521–549.
- [19] Compain, P.; Chagnault, V.; Martin, O.R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 672–711.
- [20] Bosco, M.; Bisseret, P.; Constant, P.; Eustache, J. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 153–157.
- [21] Ioannou, Y. A.; Zeidner, K. M.; Grace, M. E.; Desnick, R. J. **1998**, *332*, 789–797.
- [22] Dalziel, M.; Crispin, M.; Scanlan, C. N.; Zitzmann, N.; Dwek, R. A. *Science* **2014**, *343*, 1235681.
- [23] Buskas, T.; Thompson, P, Boons, G. *Chem. Commun.* **2009**, *28*, 5335–5349.
- [24] Thorson, J. S.; Goff, R. D; *Medchemcomm* **2014**, *5*, 1036–1047.
- [25] Kölmel, D. K.; Kool, E. T. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10358–10376.
- [26] Thygesen, M. B.; Much, H.; Sauer, J.; Cló, E.; Jorgensen, M. R.; Hindsgaul, O.; Jensen, K. J. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1752–1755.
- [27] Langenhan, J. M.; Engle, J. M.; Slevin, L. K.; Fay, L. R.; Lucker, R. W.; Smith, K. R.; Endo, M. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 670–673.
- [28] Langenhan, J. L.; Peters, N. R; Guzei, I. A.; Hoffman, F. M.; Thorson, J. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 12305–12310.
- [29] Teze, L.; Dion, M.; Daligault, F.; Tran, V.; André-Miral, C.; Tellier, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 448–451.
- [30] Bohorov, O; Andersson-Sand, H.; Hoffmann, J.; Blixt, O. *Glycobiology* **2006**, *16*, 21C–27C.
- [31] Huang, M. L.; Cohen, M.; Fisher, C. J.; Schooley, R. T.; Gagneux, P.; Godula, K. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5326–5329.
- [32] Calderón-Montaña, J. M.; Burgos-Morón, E.; Orta, M. L.; Maldonado-Navas, D.; García-Domínguez, I; López-Lázaro, M. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 794930.
- [33] Liu, D.; Li, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848–4870.

- [34] Naylor, R.; Gilham, P. T. *Biochemistry*, **1966**, *5*, 2722–2728.
- [35] Martin, A. R.; Barvik, I.; Luvino, D.; Smietana, M.; Vasseur, J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 4193–4196.
- [36] Goodwin, J. T.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9197–9198.
- [37] Li, X.; Lynn, D. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4567–4569.
- [38] Barbeyron, R.; Vasseur, J.; Smietana, M. *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 542–547.
- [39] Ficht, S.; Mattes, A.; Seitz, O. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9970–9981.
- [40] Dose, C.; Ficht, S.; Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 5369–5373.
- [41] Liu, J.; Taylor, J. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 3300–3304.
- [42] Maruyama, H.; Oikawa, R.; Hayakawa, M.; Takamori, S.; Kiumar, Y.; Abe, N.; Tsuji, G.; Matsuda, A.; Shuto, S.; Ito, Y.; Abe, H. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *12*, 7042–7048.
- [43] Luebke, K.; Dervan, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8733–8735.
- [44] Abe, H.; Kondo, Y.; Jinmei, H.; Abe, N.; Furukawa, K.; Uchiyama, A.; Tsuneda, S.; Aikawa, K.; Matsumoto, I.; Ito, Y. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 327–333.
- [45] Liu, D. R.; Gartner Z. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961–6963.
- [46] Chivers, C. E.; Koner, A. L.; Lowe, E. D.; Howarth, M. *Biochem J.* **2011**, *435*, 55–63.
- [47] Durai, C. R. S.; Harding, M. M. *Aust. J. Chem.* **2011**, *64*, 671–680.
- [48] Goodnow, R. A.; Dumelin, C. E.; Keefe, A. D. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2017**, *16*, 131–147.
- [49] Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. *Chem Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711.
- [50] Aldaye, F. A.; Sleiman, H. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4130–4131.
- [51] Iwaura, R.; Hoeben, F. J. M.; Masuda, M.; Schenning, A. P. H. J.; Meijer, E. W.; Shimizu, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13298–13304.
- [52] Hesser, A. R.; Brandsen, B. M.; Walsh, S. M.; Wang P.; Silverman, S. K. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9259–9262.

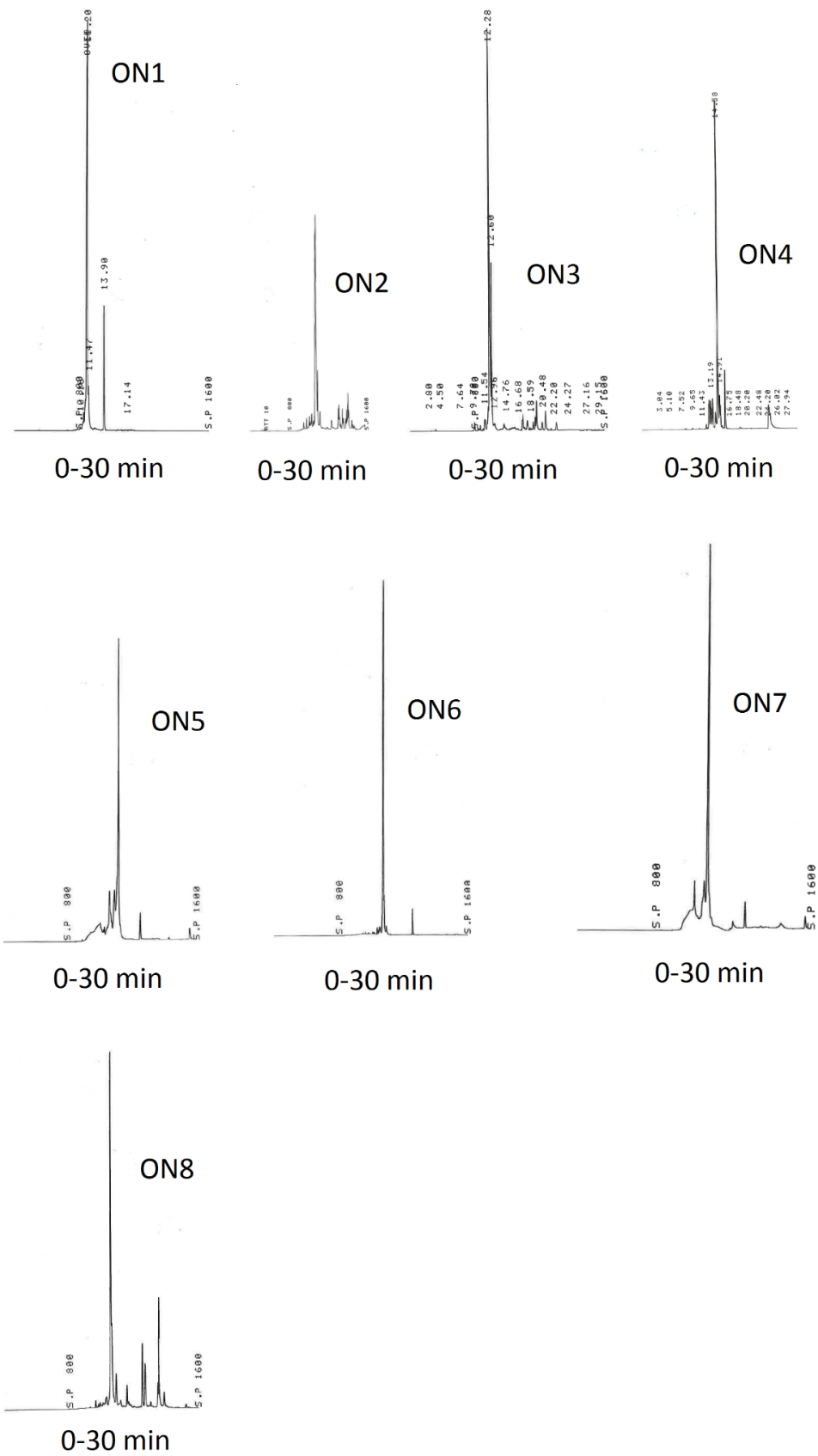
- [53] Bowler, F. R.; Diaz-Mochon, J. J.; Swift, M. D.; Bradley, M. **2010**, *49*, 1809–1812.
- [54] Davis, J. T.; Spada, G. P. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 296–313.
- [55] Tian, T.; Xiao, H.; Zhou, X. *Curr. Top. Med Chem.* **2015**, *15*, 1988–2001.
- [56] Yang, D.; Okamoto, K. *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 619–646.
- [57] Wang, K.; You, M.; Chen, Y., Han, D., Zhu, Z.; Huang, J.; Williams, K.; Yang, C. J.; Tan, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6098–6101.

4. Liitteet

Liite 1. Oligonukleotidien raakapuhdistuksien HPLC-kromatogrammit

Liite 2. Syntetisoitujen modifioitujen oligonukleotidien massaspektrit

Liite 1. Oligonukleotidien raakapuhdistuksien HPLC-kromatogrammit



Liite 2. Syntetisoitujen modifioitujen oligonukleotidien massaspektrit

