

^{19}F -NMR-oligonukleotidikoettimet ja niiden sovellukset

Turun Yliopisto
Kemian Laitos
Orgaaninen kemia ja kemiallinen biologia
Pro gradu -tutkielma
Antti Äärelä
Toukokuu 2019

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkistettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

ANTTI ÄÄRELÄ: ^{19}F -NMR-oligonukleotidikoettimet ja niiden sovellukset

Pro Gradu -tutkielma

Orgaaninen kemia ja kemiallinen biologia

Toukokuu 2019

^{19}F NMR-spektroskopiolla on osoittanut tehokkaaksi työkaluksi erityisesti proteiinien ja nukleinihappojen sekundäärirakenteiden transitioiden sekä niihin liittyvän dynamiikan ja pienligandi- ja makromolekyylivuoroaikutusten tutkimisessa. Erilaisia ja eri tartarkoituksiin sopivia leimaryhmiä tunnetaan kymmeniä, mikä mahdollistaa ^{19}F NMR-spektroskopian käytön useissa DNA:n ja RNA:n sekundäärirakenteisiin liittyvissä sovelluksissa. Menetelmä perustuu oligonukleotideihin, joihin on kovalenttisesti liitetty fluorileima. NMR-spektroskopian avulla voidaan saada tietoa oligonukleotidien sekundäärirakenteiden paikallisista muutoksista.

Tutkielman kirjallinen osa käsittelee ^{19}F NMR-oligonukleotikoettimissa käytettyjä erilaisia leimaryhmiä, niiden ominaisuuksia ja sovelluskohteita. Lisäksi käsitellään fluorattujen koettimien valmistamista ja verrataan NMR-spektroskopiaa muihin detektioinstrumentteihin, kuten UV-, CD- ja fluoresenssispektroskopiaan. ^{19}F -NMR-spektroskopiaan perustuvilla koettimilla on sovelluspotentiaalia erityisesti diagnostisissa sovelluksissa. Useita oligonukleotidien sekundäärirakenteisiin liittyviä ilmiöitä on pystytty tutkimaan *in vivo*, ja fluorileimaan perustuvien koettimien toimivuus on todennettu myös biologisesti merkittävässä pitoisuuksissa. Liittämällä hybridisaation muita kemiallisia ilmiöitä, voidaan fluorattujen koettimien herkkyttä kasvattaa entisestään. Lisäksi lukuisat leimaryhmät mahdollistavat laajan kirjon erilaisia kohdesekvenssejä.

Kokeellisessa osassa valmistettiin kaksi fluorattua C-nukleosidianalogia, joita on mahdollista käyttää leimaryhmänä ^{19}F -NMR-oligonukleotidikoettimessa. Lisäksi tutkittiin koettimien soveltuvuutta elohopeavälitteisen emäspariutumisen tutkimiseen. Toisen nukleosidi analogin todettiin monomeeritasolla merkuroituvan. Tästä nukleosidista valmistettiin fosforamidiittirakenneyksikkö, jota voidaan käyttää ^{19}F -NMR-oligonukleotidikoettimen valmistamiseen. Kyseisellä koettimella voidaan tutkia organometallivälitteisestä emäspariutumista ^{19}F -NMR-spektroskopisesti.

Asiasanat: ^{19}F -NMR, RNA, DNA, PNA, nukleotidi, kahtaispysyvä, kolmoiskierre, nukleosidianalogi, sekundäärirakenne

Sisällysluettelo

Lyhenteen ja symbolit

KIRJALLINEN OSA: ¹⁹F-NMR-oligonukleotidikoettimet ja niiden sovellukset	1
1. Johdanto.....	2
1.1. Fluori NMR-spektroskopiassa.....	2
1.2. NMR spektroskopia nukleiinihappojen tutkimuksessa	3
2. Fluorattujen oligonukleotidikoettimien valmistaminen	4
2.1. Entsymaattinen leimaus.....	4
2.2. Kemiallinen synteesi.....	6
3. Fluorileimatut modifikaatiot	7
3.1. Emäsmodifikaatiot	7
3.2. Sokerimodifikaatiot	9
3.3. Muita modifikaatioita	10
4. ¹⁹F-NMR-koettimien käyttökohteita	11
4.1. Lyhyet oligonukleotidit.....	11
4.2. G-kvadrupleksit	16
4.3. DNA-kolmoiskierre	22
4.4. Ribokytkimet	27
4.5. Nukleiinihappojen vuorovaikutukset proteiinien kanssa	30
4.6. Hammerhead-ribotsyymi	35
4.7. Trans-aktivointivaste-elementti.....	36
4.8. Peptidinukleiinihappojen ja ribonukleiinihappojen vuorovaikutukset.....	38
4.9. Hybridisaatiokoettimet	40
5. Yhteenveto	43

KOKEELLINEN OSA: Organometallivälitteiseen emäspariutumiseen perustuvan ¹⁹F-NMR-koettimen valmistaminen	45
1. Johdanto.....	47
2. Tulokset ja niiden tarkastelu	47
3. Kokeelliset menetelmät	50
3.1 Yleiset menetelmät.....	50
3.2 Synteetit	50
3.2.1 6-fluoro-3-[3,5- <i>O</i> -bis(toluoyyli)-2-deoksi- α/β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]-tolueeni (1)	50
3.2.2 6-fluoro-3-[2-deoksi- α/β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]tolueeni (2)	51
3.2.3 6-fluoro-3-[5- <i>O</i> -(4,4'-dimetoksitriityyli)-2-deoksi- α/β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]tolueeni (3).....	51
3.2.4 6-fluoro-3-[2-deoksi- β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]tolueeni (4)	52
3.2.5 6-trifluorometyyli-4-[3-okso-2-deoksi- α/β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]aniliini (5)	52
3.2.6 6-trifluorometyyli-4-[2-deoksi- α/β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]aniliini (6).....	53
3.2.7 6-trifluorometyyli-4-[2-deoksi- α/β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]- <i>N</i> -trifluoroasetyylianiliini (7)	53
3.2.8 6-trifluorometyyli-4-[5- <i>O</i> -(4,4'-dimetoksitriityyli)2-deoksi- β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]- <i>N</i> -trifluoroasetyylianiliini 8	53
3.2.9 6-trifluorometyyli-4-{3- <i>O</i> [-(2-syanoetoksi)(<i>N,N</i> -di-isopropyyliamino)-fosfinyyli]5- <i>O</i> -(4,4'-dimetoksitriityyli)-2-deoksi- β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]- <i>N</i> -trifluoro-asetyylianiliini (9).....	54
3.3.1 2-fluoro-5-[2-deoksi- α/β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]tolueenin merkurointi	55
3.3.2 6-trifluorometyyli-4-[2-deoksi- α/β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyyli]aniliinin merkurointi	55
4. Yhteenveto	55
Viitteet	55

Lyhenteet ja symbolit

A	adenosiini
ABOX	aminobentsoksatsolyyli-fluorofenylyli
Ac ₂ O	etikkahappoanhydridi
ADP	adenosiinidifosfaatti
ATP	adenosiinitrifosfaatti
B	nukleoemäs
C	sytosiini
CD	circular dichroism, sirkulaaridikroismi
dB	deoksiriboosinukleoemäs
dB	deoksinulkeosidi
dBDP	deoksinulkeosididifosfaatti
dBMP	deoksinukleosidimonofosfaatti
dBTP	deoksinukleosiditrifosfaatti
DCM	dikloorimetaani
DMTr	4',4''-dimetoksitriityyli
DNA	deoksiribonukleiinihappo
ds	double strand, kaksoisjuoste
EDC	1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidi
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
<i>eno</i>	enolaasi
ESI	electrospray ionization, sähkösumutus-ionisaatio
G	guanosiini
HIV	human immunodeficiency virus, ihmisen immuunipuutosvirus
HOBt	Hydroksibentsotriatsoli
K _d	dissosiaatiovakio
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization, matriisiavusteinen laser-desorption/ionisaatio
NMR	nuclear magnetic resonance, ydinmagneettinen resonanssi
ODN	oligodeoksiribonukleotidi
ON	oligonukleotidi
ORN	oligoribonukleotidi
Pac	fenoksiasetyyli
PCR	polymerase chain reaction, polymeraasiketjureaktio
pK _a	happovakio
<i>plsA</i>	adenylaattikinaasi
PNA	peptidinukleiinihappo
<i>prsA</i>	5-fosfo- <i>D</i> -ribosyyli- α -1-pyrofosfaatti
<i>pyrF</i>	pyruvaattikinaasi
<i>pyrH</i>	nukleosidimonofosfaattikinaasi
RBD	RNA binding domain, RNA:a sitova domaini
<i>rbsK</i>	ribokinaasi
RNA	ribonukleiinihappo
ss	single strand, yksöisjuoste
T	tymiini
TAP	2,2,2-trifluoroasetofenoni
TAR	trans activation response, transaktivaatiovaste
TBA	trombin binding aptamer, trombiinia sitova aptameeri
TEA	trietyyliamiini
TFA	trifluoroetikkahappo

TFAA	trifluoroetikkahapoanhydridi
TFPNA	kolmoiskiirteenmuodostava peptidinukleiinihappo
THF	tetrahydrofuraani
T_m	sulamispiste
TOF	time of flight, lentoaika
Tris-HCl	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani-vetykloridi -puskuri
U	urasiili
<i>uraP</i>	fosforibosyyli transferaasia
UV	ultravioletti
<i>yipO</i>	3-fosfoglyseraattimutaasi

KIRJALLINEN OSA:

¹⁹F-NMR-oligonukleotidikoettimet ja niiden sovellukset

1. Johdanto

1.1. Fluori NMR-spektroskopiassa

Fluori-19 ydinmagneettisella resonanssispektroskopialla (^{19}F -NMR) on useita sovelluskohteita kemiallisessa biologiassa.¹ ^{19}F -NMR spektroskopia on osoittanut tehokkaaksi työkaluksi erityisesti proteiinien ja nukleiinihappojen sekundäärirakenteiden muutosten sekä niihin liittyvän dynamiikan ja pienligandi- ja makromolekyyliuorovaikutusten tutkimisessa.² Fluori esiintyy luonnossa 99,98 %:sti ^{19}F -isotooppina, joka on magneettisesti aktiivinen. Fluorin herkkyys NMR-spektroskopiassa on 83% vedyn herkkyydestä, joten fluoria sisältäviä yhdisteitä on mahdollista havaita jopa nanomolaarisissa konsentraatioissa.³ Verrattuna NMR-spektroskopiassa yleisesti käytettyihin spin-leimoihin (hiili-13 ja typpi-15) fluori-19 on 100 – 200 kertaa herkempi NMR ydin (Taulukko 1). Johtuen fluorin luontaisesti runsaasta magneettisesta isotoopista, erillistä rikastusvaihetta ei myöskään vaadita.

^{19}F -NMR-spektroskopiaan perustuvien koettimien huonona puolena voidaan pitää sitä, että kohdeyhdisteet pitää leimata sopivalla fluorileimalla. Tämä voi johtaa kemiallisten ja biologisten ominaisuuksien muutokseen. Tämän vuoksi leimaryhmän vaikutusta tarkasteltavaan systeemiin on tutkittava tarkasti mallin luotettavuuden takaamiseksi. Toisaalta fluorin kemialliset ja biologiset ominaisuudet ovat hyödyllisiä pienten yhdisteiden farmakologisten ominaisuuksien muokkaamiseen.⁴

Fluorin kemiallinen siirtymä on erittäin herkkä ympäristönsä muutoksiin jakaantuen huomattavan laajalle siirtymäalueelle (700 ppm). Kovalenttisesti sitoutuneen fluorin van der Waals -säde on 0,14 nm, mikä ei eroa juurikaan vedyn van der Waals -säteestä (0,12 nm). Yksittäisen vetyatomien korvaaminen fluorilla ei siis juurikaan vaikuta yhdisteen steerisiin tekijöihin.^{2,5}

Fluorileimaryhmien herkkyyttä voidaan parantaa lisäämällä magneettisesti ekvivalenttien fluoriatomien määrää, joka on toteutettavissa esimerkiksi trifluorimetyloiduilla leimarakenteilla. Lisäksi signaalin leviämistä aiheuttava (ja herkkyyttä alentava) fluorin ja vedyn välinen kytkeytyminen voidaan tarkoituksellisesti estää. Tämä on teknisesti mahdollista useimmissa NMR-laitteissa, mutta tämä voidaan saada aikaan myös sopivalla ^1H - ^{19}F -kytkeytymisen estävällä ryhmällä. Kytkeytymisesteeksi sopii esimerkiksi alkyyni, thioetteri tai aryyli-ryhmä.⁶

Spektrofotometriin menetelmiin, kuten UV-⁷, CD-^{8,9}, ja fluoresenssi-spektroskopiaan^{10,11} verrattuna NMR-spektroskopia on vähemmän herkkä ja vaatii suurempia analyytin konsentraatioita. NMR-spektroskopialla voidaan kuitenkin saada

yksityiskohtaista tietoa paikallisen tason muutoksista ja samanaikaisesti esiintyvien rakenteiden tasapainosta.¹² ¹⁹F NMR-spektroskopiolla saatavaa dataa täydennetään usein muilla spektroskopisilla menetelmillä.^{12,13} Fluoresenssi- ja NMR-leimat voivat olla jopa samassa koettimessa.¹⁴

Taulukko 1 Eräiden magneettisten ydinten ominaisuuksia.¹⁵ Taulukko on uudelleenjulkaistu kustantajan Elsevier luvalla.

Ydin	Spin	Gyromagneettinen suhde (10 ⁻⁷ rad s ⁻¹ T ⁻¹)	Esiintyvyys luonnossa (%)	Suhteellinen herkkyys	Kemiallisen siirtymän vaihteluväli
¹ H	1/2	26,7519	99,98	1	10
² H	1	4,117	0,015	0,0096	10
¹³ C	1/2	6,726	1,1	0,015	340
¹⁵ N	- 1/2	-2,711	0,4	0,001	620
¹⁷ O	- 5/2	-3,627	0,037	0,029	850
¹⁹F	1/2	25,167	100	0,83	700
³¹ P	1/2	10,829	100	0,066	960

1.2. NMR spektroskopia nukleiinihappojen tutkimuksessa

Biologista ympäristöä jäljiteltäessä tarkasteltavan nukleiinihapon tulisi olla suhteellisen alhaisessa pitoisuudessa (< 100 μmol L⁻¹). Tämä asettaa ehdot käytettävän spin-leiman herkkyydelle. Vaikkakin ¹⁵N NMR:llä voidaan saada mielenkiintoista tietoa nukleiinihappojen sekundaarirakenteista^{16,17}, ¹H ja ¹⁹F ytimien 1000-kertainen herkkyys mahdollistaa nukleiinihappojen tutkimisen biologisesti relevanteissa pitoisuuksissa (Taulukko 1). ¹⁵N-leimaukseen verrattuna ¹⁹F-leimauksen etuna on magneettisen isotoopin runsas esiintyvyys, minkä vuoksi spin-leimausta varten fluoria ei tarvitse rikastaa. ¹H NMR-spektroskopiaa käytettäessä tarkastellaan yleensä iminoprotonien signaaleja, jolloin saadaan arvokasta tietoa Watson-Crick emäsparien vetysitoutumisesta.¹⁸ Tällöin ongelmaksi muodostuu usein assignoitavien protonien suuri määrä sekä signaalien päällekkäisyys kapealla kemiallisen siirtymän alueella (10-15 ppm). ¹⁹F NMR-spektroskopian perustuvilla koettimilla havaitseminen perustuu usein vain yhden signaalin kemiallisen siirtymän muutokseen. Lisäksi taustasignaalien osuus on olematon. ¹⁹F NMR-spektrin yksinkertaisuudesta huolimatta, se voi sisältää kuitenkin runsaasti informaatiota.¹⁵ Yksittäisten signaalien muutoksen avulla voidaan saada tietoa

esimerkiksi nukleiinihappojen intra- ja intermolekulaarisista tasapainorakenteiden suhteista¹⁹⁻²¹, niiden muutoksista ja dynamiikasta.¹⁵

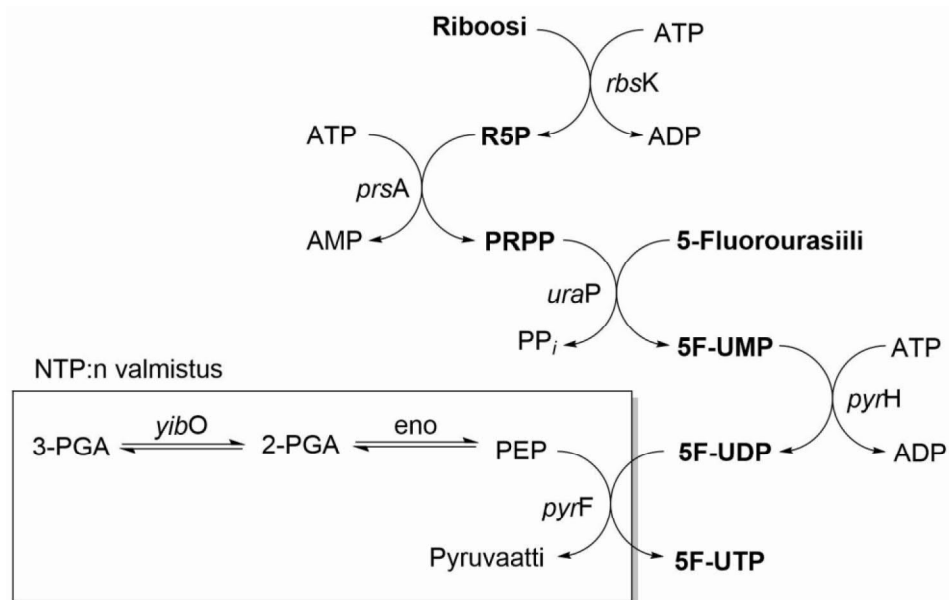
2. Fluorattujen oligonukleotidikoettimien valmistaminen

Fluorileiman lisääminen nukleiinihappokoettimiin voidaan yleisesti tehdä kahdella tapaa; kemiallisesti käyttämällä fluorattuja fosforamidiittirakenneyksiköitä osana automatisoitua kiinteän kantajan DNA-synteesiä tai entsyymaattisesti käyttämällä rakenneyksiköinä fluorileimattuja nukleosiditriofosfaattien analogeja. Entsyymaattisen synteesin etuna on mahdollisuus valmistaa pidempiä juosteita, mutta tuotteena saadaan eri kohdista leimattujen juosteiden seos.³ Kemiallisessa synteesissä fluorileima on mahdollista saada haluttuun kohtaan juostetta.^{3,22,23}

2.1. Entsyymaattinen leimaus

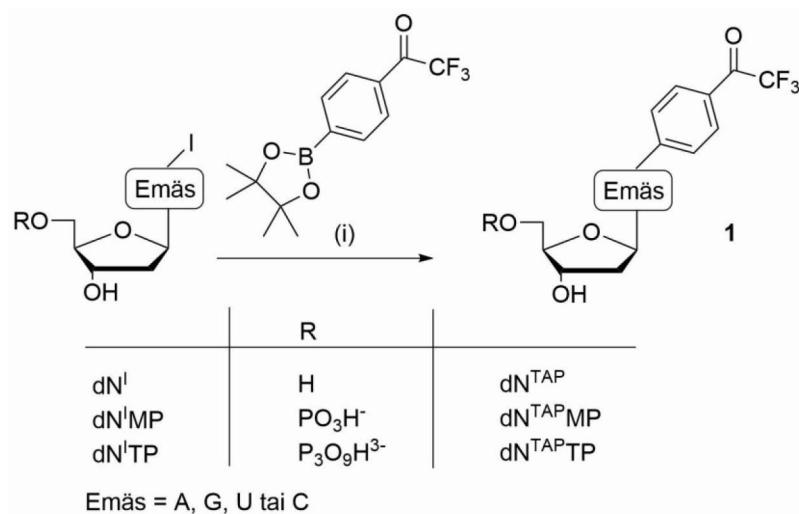
Entsyymaattiseen fluorikoettimien synteesiin on käytetty T7 RNA –polymeraasia.^{22,23} Jotta varsinainen oligonukleotidi voidaan kasata polymeraasin avulla, on fluoratuista nukleosideista valmistettava trifosfaattianalogeja, joiden valmistus voi niinkään olla entsyymaattinen. Hennig ja kollegat käyttivät 5-fluorourasiilia substraattina ja entsyymeinä ribokinaasia (*rbsK*), 5-fosfo-*D*-ribosyyli- α -1-pyrofosfaattia (*prsA*), fosforibosyyli transferaasia (*uraP*), nukleosidmonofosfaattikinaasia (*pyrH*), adenylaattikinaasia (*plsA*), pyruvaattikinaasia (*pyrF*), 3-fosfoglyseraattimutaasia (*yipO*) ja enolaasia (*eno*). Reaktio tehtiin 37 °C:ssa ja reaktioaika oli 110 tuntia. Reaktion mentyä loppuun reaktioseos haihdutettiin kuiviin, minkä jälkeen se liuotettiin trietyyliammoniumbikarbonaattiin. Liuosta inkuboitiin 12 tuntia 4 °C:ssa, millä saatiin ylimääräiset suolat ja proteiinit sakkaamaan. Liuos sentrifugoitiin, minkä jälkeen supernatantti dekantoiitiin ja haihdutettiin kuiviin. Kiinteää 5-fluorouridiini-5'-trifosfaattia saatiin näin 80% saannolla.

Varsinainen koetinoligonukleotidi valmistettiin hyödyntämällä T7 RNA polymeraasia *in vitro* –transkriptiossa (Kaavio 1).²² Reaktioliuos sisälsi 40 mM Tris-HCl:a (pH 8,1), 1 mM spermiidiiniä, 10 mM ditiotreitolia, 0.01% Triton X-100:a, 80 mg / L polyetylaeniglykolia 17 mM MgCl₂:a, 2 mM jokaista nukleotiditriofosfaattia, 0,3 μ M templaatti-DNA:ta, 0,3 μ M promootteri-DNA:ta, 2 yksikköä /mL epäorgaanista pyrofosfataasia, 80 yksikköä / mL RNase-inhibiittoria, ja 3000 yksikköä/mL T7 RNA polymeraasia. Liuosta inkuboitiin 4 tuntia 37 °C:ssa, minkä jälkeen reaktio lopetettiin lisäämällä reaktioliuokseen 0,5 M EDTA-liuosta (pH 8,0). RNA puhdistettiin denaturoivalla geelielektroforeesilla.



Kaavio 1 Kaaviokuva 5-fluorouridiini-5'-trifosfaatin entsymaattisesta valmistuksesta.²⁴ Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

Entsyaattiseen oligonukleotidien valmistukseen tarvittavia nukleosidien trifosfaattianalogeja voidaan valmistaa myös kemiallisesti (Kaavio 2).^{3,14} Olszewska kollegoineen valmisti 2,2,2-trifluoroasetofenoni-modifioituja (TAP) (Kaavio 2, 1) nukleosideja Suzuki-Miyara-kytkentäreaktiolla.³ Lähtöaineina käytettiin 7-jodopuriini- ja 5-jodopyrimidiini-2'-deoksinukleosideja sekä 4-(trifluoroasetyyli)fenyyliboronihapon pinakoliesteriä. Mono- ja trifosfaattinukleotidit valmistettiin vastaavista jodatuista nukleosidimono- ja trifosfaateista käyttäen samoja reaktio-olosuhteita. Nukleosidien trifosfaattianalogien kemiallisen valmistuksen ongelmana on fosfaattiryhmien välisten sidosten hydrolysoituminen synteessin aikana.

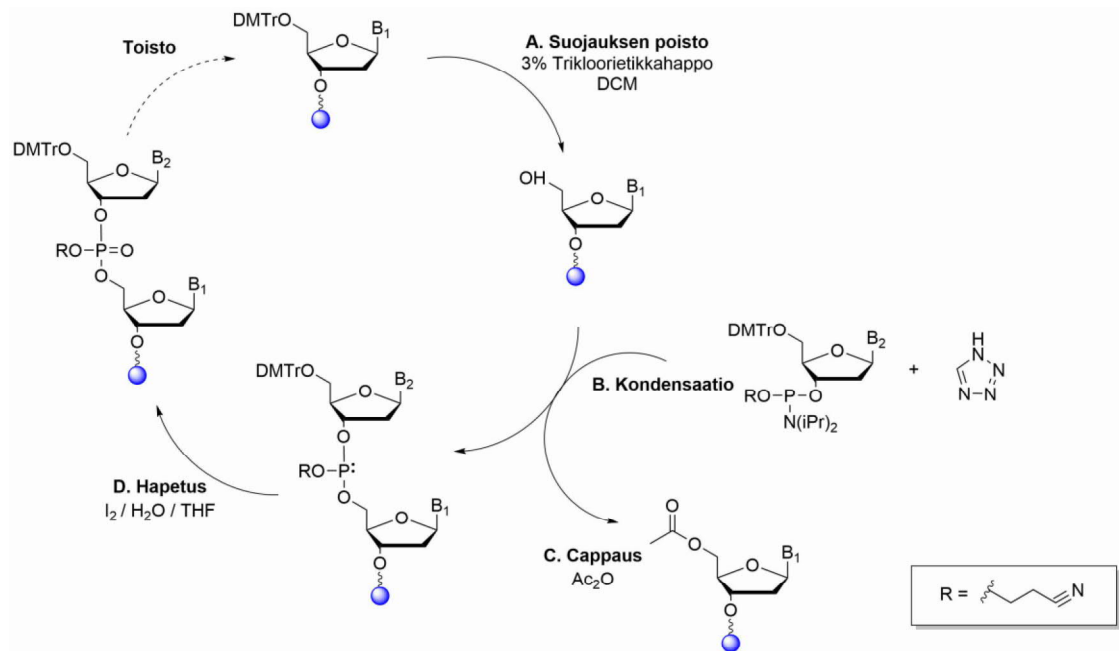


Kaavio 2 Fosfatoitujen nukleosidien valmistus kemiallisesti. Reaktio-olosuhteet. (i) Pd(OAc)₂ (4 mol%), trifenyylifosfiini-3,3',3''-trisulfonihapon trinitriumsuola (8 mol%), K₂CO₃ (3 ekv.), MeCN/H₂O.³ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

Olszewska kollegoineen käytti fluorattuja nukleosiditrifosfaatteja kolmen eri termostabiilin DNA-polymeraasin (KOD XL, Vento (ekso-) tai Pwo) substraattina valmistettaessa 19-31 nukleotidia pitkiä oligonukleotideja. Polymeraasireaktioiden toimivuus todettiin geielektroforeesi-mittauksilla ja polymeraasituotteiden rakenne varmistettiin MALDI-TOF-analyysillä. Kaikki muut nukleosiditrifosfaatit paitsi **dG^{TAPT}TP**, toimivat myös polymeraasiketjureaktion (PCR) substraatteina ja niitä voitiin käyttää luonnollisten nukleotidien joukossa jopa 339 nukleotidia pitkän oligonukleotidin valmistamiseen.

2.2. Kemiallinen synteesi

Yleisin tapa valmistaa fluorileimattuja oligonukleotidikoettimia on fosforamidiittikemiaan perustuva kiinteän kantajan synteesi.²⁵ Tähän tarkoitukseen on kyettävä valmistamaan fosforamidiitti-rakenneyksikkö, joka sisältää halutun fluorileiman. Lisäksi rakenneyksikön kytkentätehokkuuden on oltava riittävä ja sen on kestävä automatisoidussa synteesissä käytetyn synteesisyklin reaktio-olosuhteet (Kaavio 3).

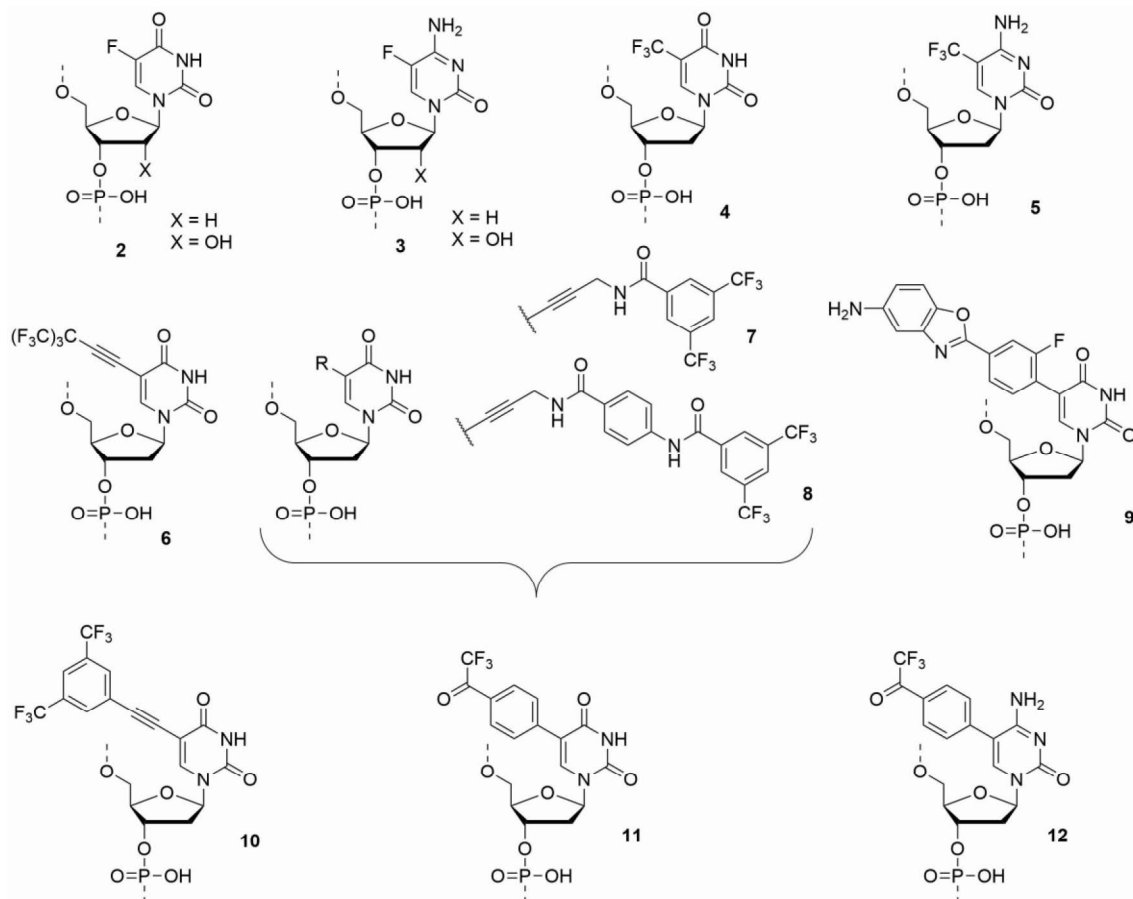


Kaavio 3 Fosforamidiittikemia.²⁶ Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan MDPI luvalla.

3. Fluorileimatut modifikaatiot

3.1. Emäsmodyfikaatiot

Pyrimidiininukleosidien C5-asema on yksi käytetyimmistä ¹⁹F-leimaryhmän liittämiskohdista.²⁷ Tämä johtuu siitä, että C5-asema suuntautuu vallitsevasti isoon uurteeseen ja tämän aseman muokkaus muuttaa nukleinihappojen emäspariutumisoimaisuuksia suhteellisen vähän.



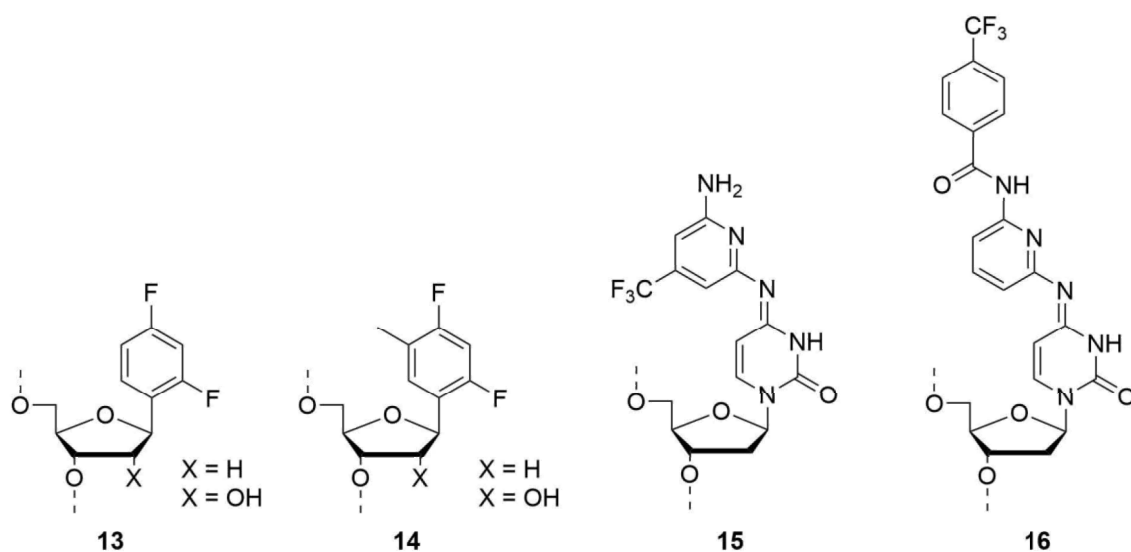
Kuva 1 C5-muokattuja pyrimidiininukleosideja.

5-fluoropyrimidiini-muokattuja (**2** ja **3**) nukleosideja on liitetty oligonukleotideihin tavanomaisella kiinteän kantajan fosoramidiitti-kemialla.²⁸ Lisäksi RNA-polymeraasin avulla on valmistettu 5-fluorourasiili (**2**) ja -sytosiiniä (**3**) sisältäviä RNA-juosteita.^{22,23} Kiinteän kantajan synteesissä tulee huomioida C5-trifluorometyloitujen (**4** ja **5**) nukleotidien herkkyys konsentroidulle ammoniakille, jota käytetään yleisesti nukleinihappojen irrotukseen kantajalta. Trifluorometyyliryhmä muuntuu tällöin syanoryhmäksi.²⁹ Ongelma voidaan välttää fenoksisetyyli(Pac)-suojatuilla

nukleoemäksillä, jotka mahdollistavat irrotuksen miedommalla emäskäsittelyllä (50 mmol L⁻¹ K₂CO₃ metanolissa).

Pyrimidiininukleosidien C5-asemaan voidaan liittää myös steerisesti vaativampia leimaryhmiä. 5-[4,4,4-trifluoro-3,3-bis(trifluorometyyli)but-1-ynyyli]-2'-deoksiuridiinia (**6**) on käytetty korvaamaan tymidiini-³⁰ ja uridiini-³¹tähteitä. Yhdeksän magneettisesti ekvivalenttia fluori-atomia mahdollistaa hyvinkin pienien nukleinihappopitoisuuksien havainnoimisen.³⁰ Kuusi fluoriatomia sisältävää 3,5-bis(trifluorometyyli) on myös käytetty leimaryhmänä C5-asemassa eripituisten linkkerien välityksellä.^{32,33} (**7** ja **8**) 5-[4''-(5'''-aminobentso[*d*]oksatsol-2'''-yyli)-2''-fluorofenyyl]-2'-deoksiuridiinia (**9**) voidaan käyttää ¹⁹F-NMR-mittauksien lisäksi myös fluoresenssikoettimena.¹⁴

Myös fluorattuja bentseenijohdannaisia on käytetty pyrimidiinien analogeina. Poolittomat 2,4-difluorotoluenei³⁴ (**13**) ja 2,4-difluorobentseeni³⁵ (**14**) sisältävät kumpikin kaksi fluoriatomia, jotka eivät ole magneettisesti ekvivalentteja. Steerisesti ne eivät merkittävästi eroa luonnollisesta tyministä tai urasiilista, mutta ne eivät kykene muodostamaan vetysidoksia Watson-Crick parin muodostamiseksi johtaen kaksoiskierteen pysyvyyden laskuun.

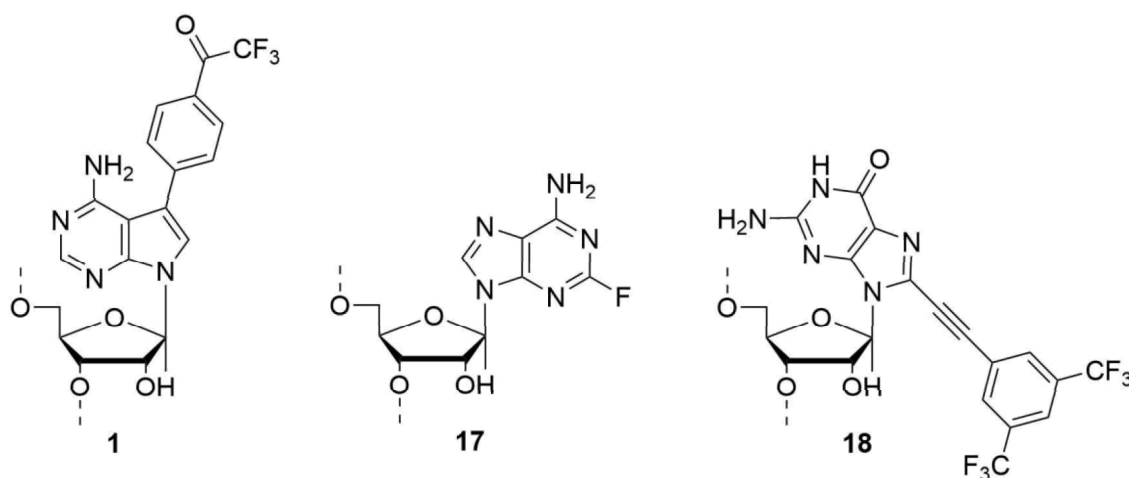


Kuva 2 Bentseenijohdannaiset pyrimidiininukleosidianalogit sekä 2'-deoksi-*N*^d-(6-amino-pyridin-2-yyli)sytidiini-johdannaiset koettimet.

Sytidiininukleosidien *N*^d-asemaan voidaan liittää kolme magneettisesti ekvivalenttia fluoriatomia sisältävä leimaryhmä 6-amino-pyridin-2-yyli-johdannaisen linkkerin avulla (**15** ja **16**). Tällaisia oligonukleotidikoettimia on käytetty DNA-tripleksien tutkimiseen. Huolimatta potentiaalisista koko emäsparin tunnistavista sitoutumiskohdista, nämä muokkaukset alentavat kolmoiskierteen pysyvyyttä. Ne ovat toimineet kuitenkin

tehokkaina sensoreina kohdejuosteiden emäsjärjestyksen detektoimiseen yhden emäksen tarkkuudella.¹²

Myös puriininukleosideja voidaan leimata ¹⁹F NMR-koettimien valmistamiseksi. Fluorattujen puriininukleosidien käyttöä rajoittaa kuitenkin niiden huono kestävyys automatisoidun synteessin reaktio-olosuhteissa.³⁶ 2-fluoroadeniini (**17**) voidaan liittää oligonukleotidiin entsymaattisesti ja sitä on käytetty leimaryhmänä ¹⁹F-NMR-koettimissa.²⁴ 7-trifluoroasetofenoni (**1**) modifioidut adeniini ja guaniini sisältävät kolme magneettisesti ekvivalenttia fluori-atomia ja niillä on voitu havaita DNA-proteiini-vuorovaikutuksia nanomolaarisissa konsentraatioissa.³ Aminobentsaksoli johdannaisia on käytetty myös puriiniemäksien muokkaamiseen.¹⁴

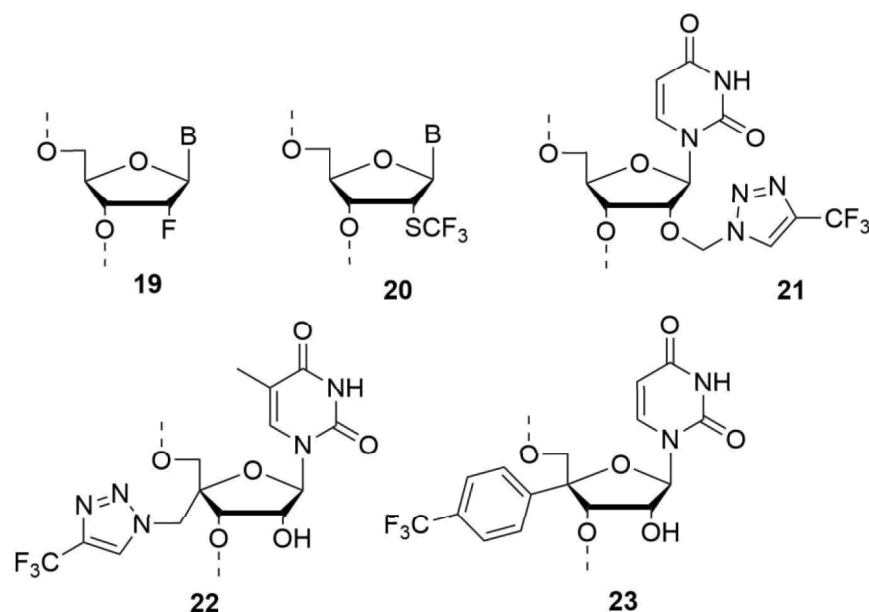


Kuva 3 Fluorattuja puriininukleosideja.

3.2. Sokerimodifikaatiot

Fluorileima voidaan liittää myös nukleosidin sokeriosaan. Yksinkertaisin sokeriosan fluori-modifikaation on deoksiriboosin 2'-hydroksyylin korvaaminen fluorilla^{21,37,38} (**19**). 2'-deoksi-2'-trifluorometyylitio-modifikaatio³⁹⁻⁴¹ (**20**) mahdollistaa ¹⁹F-NMR-mittaukset mikromolaarisissa konsentraatioissa. Verrattuna millimolaarisia konsentraatioita vaativiin yhden leima-atomin sisältämiin koettimiin 2'-SCF₃ leimatun koettimen käyttö vaatii vähemmän materiaalia ja sillä minimoidaan mahdolliset aggregaatio-ongelmat. Lisäksi 2'-SCF₃-leimaus voi lisätä koettimen kestävyttä fosfodiesteraseja vastaan, sillä aikaisemmissa tutkimuksissa⁴² 2'-OCF₃-muokkauksen on havaittu parantavat tätä ominaisuutta. Kasvanut nukleaasikestävyys parantaisi 2'-SCF₃-leiman käyttökelpoisuutta *in vivo*-tutkimuksissa. 2'-O-[(4-trifluorometyyli-1*H*-triatsool-1-yyli)metyyli]-modifikaatio² (**21**) suosii *N*-konformaatiota ja vaikuttaa suurehkosta koostaan huolimatta kaksois- ja kolmoiskierteiden pysyvyyksiin vain

marginaalisesti. Sokerileimauksien etuna on, että kyseinen leimaryhmä voidaan sisällyttää mihin tahansa RNA-juosteen emäkseen.

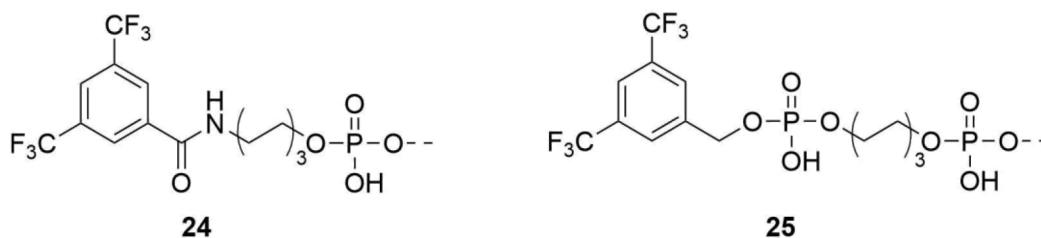


Kuva 4 Sokerimodifikaatioita.

Myös sokerirenkaan 4'-aseman muokkaamiseen on olemassa suhteellisen suoraviivaisia synteettisiä menetelmiä, joita voidaan hyödyntää fluorileimauksessa. Lisäksi kyseinen asema suuntaa leimaryhmän vallitsevasti DNA-kaksoiskierteen pienen uurteen reunalle, joka on herkkä sekundäärirakenteiden muutoksille. 4'-C-[(4-trifluorometyyli-1*H*-1,2,3-triaatsol-1-yyli)metyyli]tymidiini⁶ (**22**) ja 4'-C-(4-trifluorofenyyl)uridiini² (**23**) sisältävät molemmat kolme magneettisesti ekvivalenttia fluoriatomia ja ne voidaan liittää osaksi oligonukleotidikoetinta automatisoitua kiinteän kantajan synteesiä käyttäen.

3.3. Muita modifikaatioita

Fluorileima voidaan liittää myös oligonukleotidikoettimen 5'-päähän.⁴³ 3,5-bis(trifluorometyyli)fenyyli-ryhmä (**24** ja **25**) sisältää kuusi magneettisesti ekvivalenttia fluori-atomia ja siitä sopivan linkkerin välityksellä valmistettu fosforamidiittirekenneyksikkö voidaan liittää sekä DNA-⁴⁴ että RNA-juosteen⁴³ 5'-päähän. On huomattavaa, että nämä leimat eivät ole nukleosidianalogeja ja lisäksi leimaryhmät melko kaukana sekundäärirekenteesta. Tästäkin huolimatta kyseisiä leimoja on käytetty menestyksekkäästi G-kvadruplexi-rakenteiden detektointiin.⁴³



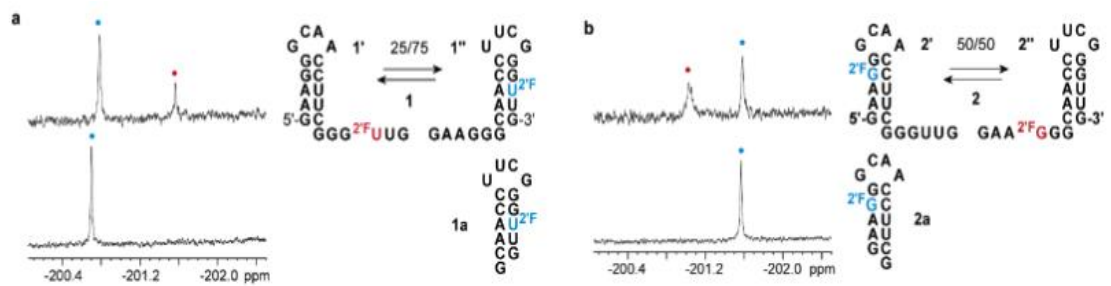
Kuva 5 5'-modifikaatioita.

4. ¹⁹F-NMR-koettimien käyttökohteita

4.1. Lyhyet oligonukleotidit

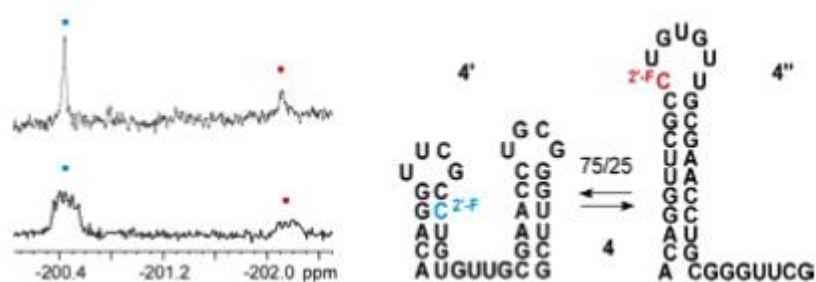
RNA:n toiminta biologisten prosessien säätelijänä perustuu usein sen kykyyn muodostaa erilaisia sekundaärirakenteita.^{45,46} Lyhyetkin 20-40 nukleotidia pitkät RNA-juosteet voivat esiintyä liuoksessa useissa eri sekundaärirakenteissa.^{47,48} Sekundaärirakenteiden tasapainoja voidaan tutkia leimaamattomilla koettimilla vertailemalla imino-protonien ¹H-NMR-spektrejä.²⁰ Menetelmän heikkoutena on kuitenkin, se että se perustuu vaihtuvien vetyjen signaalien mittaukseen. Tämä haittaa erityisesti eri olosuhteissa tehtävien mittausten vertailua, sillä protoninvaihdon nopeus muuttuu lämpötilan ja puskuriolosuhteiden muuttuessa. Lisäksi oligonukleotidin pituuden kasvaessa ¹H-NMR-spektrin tulkinta vaikeutuu huomattavasti, sillä imino-protonien signaalien määrä kasvaa ja signaalien päällekkäisyys lisääntyy.²⁰ ¹⁹F NMR-koettimien etuna leimaamattomiin koettimiin verrattuna on kvantitatiivisempi, protonien vaihdosta riippumaton, taustasta häiriötön ja helpommin tulkittava NMR-spektri.

Kreutz kollegoineen käytti 2'-fluorileimattua uridiinia ja guanosiinia (Kuva 4, **19**) molekyyllinsisäisen hiuspinni-hiuspinni-tasapainon tutkimiseen.³⁷ Tutkimuksessa käytettiin 20 nukleotidia pitkää RNA-juostetta, josta oli ¹⁹F-leimattu joko 3'-päästä uridiini (**ON1**) tai 5'-päästä guanosiini (**ON2**). Signaalien assignointi eri sekundaärirakenteille tehtiin vertaamalla sekundaärirakenteiden signaaleja mallijuosteeseen, jonka konformaatio tiedettiin (**ON1a** tai **ON2a**).



Kuva 6 Protoni-dekoplatut ^{19}F -NMR-spektrit. (a) 2'-F-uridiini-leimattu RNA **ON1** esiintyy kahdessa konformaatioissa **ON1'** ja **ON1''**, joiden alla on esitetty vertailusekvenssi **ON1a**. (b) Sama kuin (a), mutta 2'-F-guansiini-leimattu sekvenssi **ON2** (konformeerit **ON2'** and **ON2''**; vertailusekvenssi **ON2a**). NMR-olosuhteet: 0,3 mM RNA, 25 mM natriumfosfaatti-puskuri pH 7, 298 K. Kreutz et al.³⁷ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

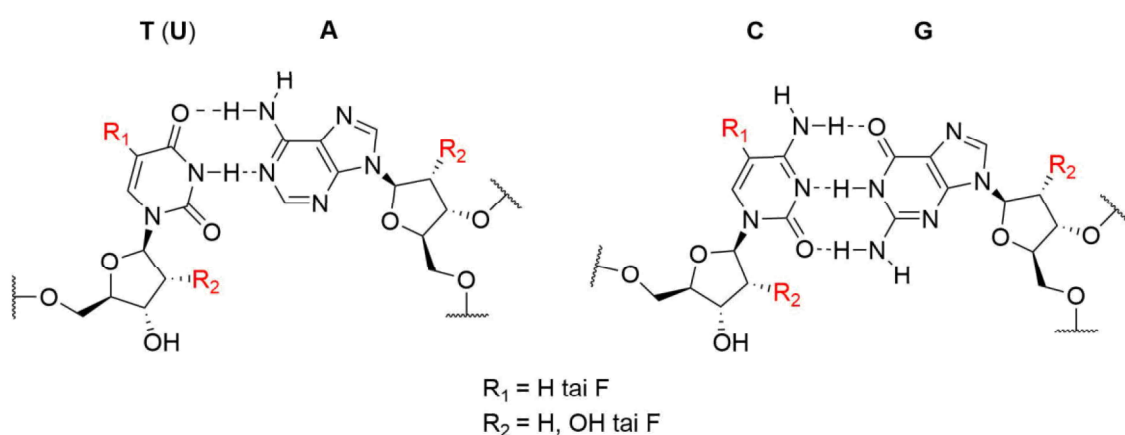
Tutkimuksessa³⁷ selvitettiin ^{19}F -leiman vaikutusta sekundäärirakenteiden tasapainoon ja kaksoiskierteen pysyvyyteen. Guansiisiin 2'-F-leimaus ei vaikuttanut sekundäärirakenteiden tasapainoon verrattuna leimaamattomaan juosteeseen. Kun uridiiniin lisättiin 2'-F-leima, muuttui sekundäärirakenteiden tasapaino 20-25% sen rakenteen puolelle, jossa uridiini sijaitsee rakenteen kaksoiskierteisessä osassa. UV-sulamispisteanalyysi tuki tätä havaintoa. Hiuspinnin **ON2a** termodynaaminen pysyvyys oli sama kuin leimaamattomalla juosteella, mutta **ON1a**:n tapauksessa termodynaaminen pysyvyys nousi hieman verrattuna leimaamattomaan juosteeseen. Juosteiden **ON1** ja **ON2** lisäksi Kreutz kollegoineen tutki vielä pidemmän 34 nukleotidia pitkän RNA:n keskellä sijaitsevan sytosiinin korvaamista 2'-F-leimatulla sytosiinilla. He havaitsivat, että myös tämä pyrimidiini-muokkaus vaikuttaa sekundäärirakenteiden tasapainoon.



Kuva 7 34 nukleotidia pitkä 2'-F-sytosiini-leimattu RNA **ON4** esiintyy kahdessa konformaatioissa **ON4'** ja **ON4''**. ^{19}F NMR -spektrit: protoni-dekoplatu (ylempi) and ja protoni-dekoplaamaton (alempi). Olosuhteet samat kuin Kuvassa 6.³⁷ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

2'-fluororiboosileimatut oligonukleotidin eivät kuitenkaan sovellu hyvin DNA:n sekundäärirakenteiden tutkimiseen. Tämä johtuu siitä, että muokatut nukleosidit suosivat

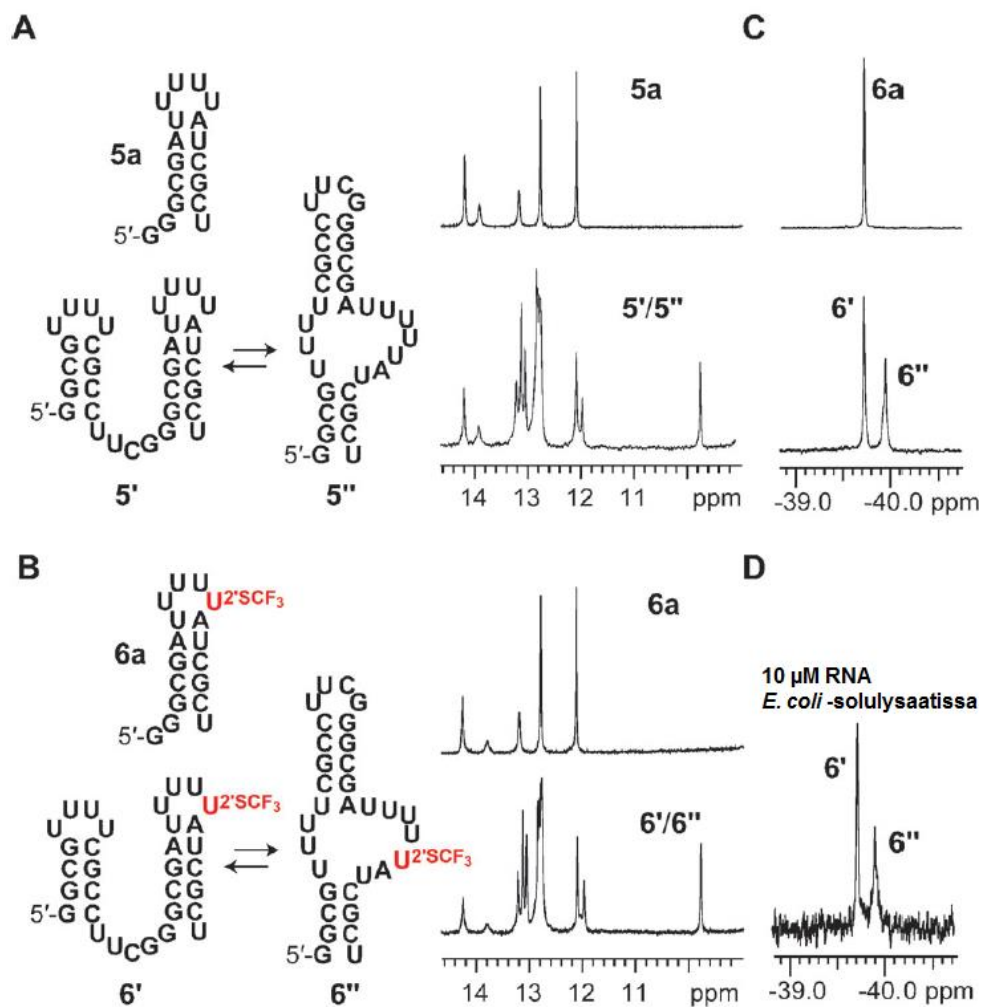
C3'-endokonformaatiota C2'-endo konformaation sijaan ja sopivat näin ollen vain RNA:n rakenteisiin.²¹ Puffer kollegoineen tutki RNA:n ja DNA:n sekundäärirakenteiden havaitsemista 5-F-leimatuilla pyrimidiineillä²⁸ (Kuva 1, 2 ja 3) tarkoituksenaan kehittää sekä RNA:lle että DNA:lle sopiva koetin. He käyttivät tutkimuksessaan kuutta eri ¹⁹F-leimattua RNA- tai DNA-oligonukleotidia, joten tutkimus antoi kattavan käsityksen 5-F-pyrimidiinileimauksen vaikutuksesta oligonukleotidien käyttäytymiseen. Jokaiselle tutkitulle oligonukleotidille saatiin mitattua selkeä ¹⁹F-NMR-spektri, jonka avulla voitiin määrittää sekundäärirakenteiden suhteet. Mielenkiintoista oli, että DNA-oligonukleotideilla eri sekundäärirakenteiden signaalien kemiallisten siirtymien ero oli selvästi pienempi kuin RNA-oligonukleotideilla, Tutkijat ajattelivat tämän johtuvan A-tyypin (RNA) ja B-tyypin (DNA) kaksoiskierteiden emäspinoutumisen eroista.



Kuva 8 DNA ja RNA Watson-Crick emäsparien kemialliset rakenteet. Ei-invasiiviset fluori-leimauksien paikat merkattu punaisella.²⁸ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Oxford University Press luvalla.

Tutkimuksessa²⁸ havaittiin, että 5-F-pyrimidiinileimaus ei vaikuta DNA:n tai RNA:n sekundäärirakenteiden tasapainoon. Tämä on etu verrattuna 2'-F-leimattuihin koettimiin, joilla sekundäärirakenteiden tasapaino pysyi muuttumattomana vain puriininukleoemästen tapauksessa. Lisäksi hiuspinnirakenteiden termodynaaminen pysyvyys säilyi muuttumattomana, mistä voidaan päätellä, että pyrimidiinien muokkaus ei vaikuta emäspariutumiseen. Tämä oli yllättävä havainto, sillä sekä 5-fluorourasiilin (2) N(3) imino protonin että N(3) protonoituneen 5-fluorosytosiinin (3) pK_a arvot ovat kaksi yksikköä muokkaamattomia emäksiä alemmat. Nukleoemäksien pK_a arvot vaikuttavat emäspariutumisen voimakkuuteen, sillä ne muuttavat protonien liikkuvuutta ja vaihtuvuutta liuottimen kanssa.

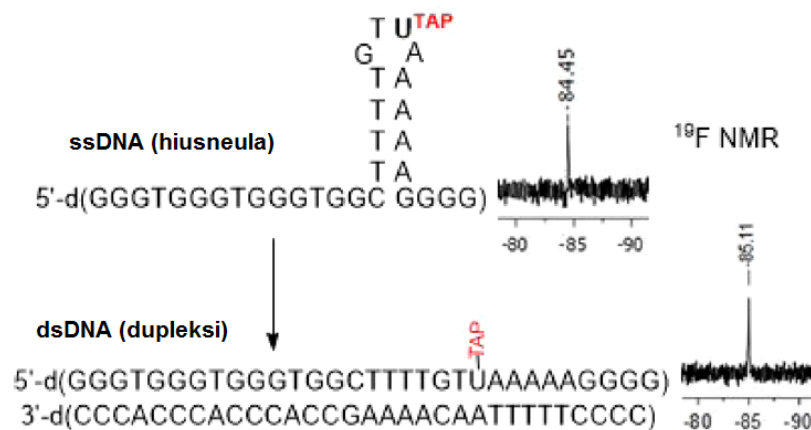
Myös 2'-SCF₃-leimausta (Kuva 4, 20) on käytetty kahtaissyvien RNA:n hiuspinnirakenteiden tasapainon tutkimiseen.^{40,41} 5-F-pyrimidiinileimauksen (2 ja 3) tavoin se ei vaikuta sekundäärirakenteiden tasapainoon. Fauster kollegoineen tutkivat sen käyttöä RNA:n sekundäärirakenteiden havainnointiin. He valmistivat 32 nukleotidia pitkän oligonukleotidikoettimen ON6'/6'', joka sisälsi yhden 2'-SCF₃-leimatun uridiinin. Verrokkina he käyttivät muokkaamatonta oligonukleotidia ON5'/5'', jolla oli sama emäsjärjestys. Iminiprotonien NMR-spektristä he päättelivät, että sekundäärirakenteiden tasapainosuhte on sama sekä muokatulle, että muokkaamattomalle oligonukleotidille. Tämä havainto varmistettiin oikeaksi, mittaamalla protonispektrit myös lyhyemmille referenssi hiusneularakenteille ON5a ja ON6a.



Kuva 9 A) Muokkaamaton RNA 5, täysipituinen juoste kahdessa konformeerissaan 5' ja 5'' sekä imino-protonien NMR-spektro. B) Sama kuin A, mutta 2'-SCF₃-leimatuille analogeille. C) ¹⁹F NMR –spekttri, johon sekundäärirakenteiden signaalit on assignoitu D) Sama kuin C, mutta mittaukset on suoritettu E. Coli –solulysaattia sisältävässä liuoksessa. NMR-olosuhteet A–C: [RNA] = 0,3 mM, [Na₂HAsO₄] = 25 mM, pH 7,0, H₂O/D₂O = 9:1, 298 K; olosuhteet D: [RNA]=10 mM, E. coli -lysaatti/ D₂O=9:1, 298 K.⁴⁰ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Wiley luvalla.

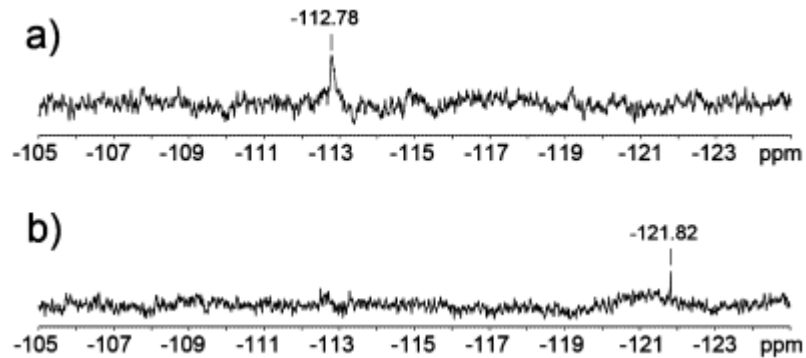
2'-SCF₃-leimauksen soveltuvuutta *in vivo* -mittauksiin havainnollistettiin tekemällä mittauksia *E. coli* -solulysaateissa. Sekundäärirakenteet onnistuttiin tässä tapauksessa erottamaan toisistaan jopa 10 µM liuoksessa.

Olszewska kollegoineen selvitti tutkitrifluoroasetofenoniin (TAP) (Kaavio1, 1) liitettyjen nukleotidien soveltuvuutta DNA:n sekundäärirakenteiden tutkimukseen.³ Tutkimuksessa käytetty 31 nukleotidia pitkä koetin valmistettiin PEX-polymeraatioreaktiolla ja fluorileima liitettiin käyttämällä 5-TAP-muokattua uridiinitrofosfaattia. Leimaryhmä dU^{TAP} oli hiuspinni rakenteen silmukassa, kun koetin oli yksijuosteisena. Näin valmistetun koettimen ¹⁹F-NMR-signaali muuttui 0,67 ppm, kun koetin muodosti kaksoiskierteen vastinjuosteensa kanssa. TAP-ryhmä sopii alhaisien pitoisuuksien määrittämiseen, sillä mittaukset tehtiin 1,1 nmol L⁻¹ konsentraatiossa.



Kuva 10 dUTAP-muokatus ssDNA:n ¹⁹F NMR –spektri hiuspinni-konformaatioissa (yllä). dUTAP-muokatus koetinolonukleotidin ja vastinjuosteesta muodostaman kaksoiskierteen dsDNA ¹⁹F NMR –spektri NMR-olosuhteet: [DNA] = 1,1 nM, 20 mM fosfaattipuskuri pH = 7.³ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

TAP-ryhmän signaalin muutosta selkeämpi muutos (noin 9,0 ppm) havaittiin aminobentsoksatsolyylifluorofenyylileimatuilla (ABOX) (Kuva 1, 9) nukleotideilla Riedlin ja kollegoiden tutkimuksessa.¹⁴ He käyttivät samaa koettimen ja vastinjuosteesta emäsjärjestystä kuin Olszewska kollegoineen. ¹⁹F-NMR-skpektroskopian lisäksi ABOX-muokattuja nukleotideja voidaan käyttää DNA:n sekundäärirakenteiden havaitsemiseen fluoresenssin avulla. Tämä kaksoistoimivuus voi lisätä koettimen sovelluskohteita, sillä fluoresenssi on herkkä myös pH:n muutoksille, joten koettimella voitaisiin havaita koettimen ympäristössä tapahtuvia happamuuteen vaikuttavia biologisia prosesseja.



Kuva 11 (a) ABOX-leimatun uridiinin sisältävän koettimen (samaemäsjärjestys ja leimauspaikka kuin Kuvassa 10) hiuspinni-konformaation ^{19}F NMR –spektri. (b) Koettimen ^{19}F NMR –spektri, kun liuokseen lisättiin vastin juostetta, mikä aiheutti hiuspinnin avautumisen ja kaksoiskierteisen DNA:n muodostumisen. NMR-olosuhteet: $[\text{DNA}] = 30 \mu\text{M}$, 20 mM fosfaattipuskuri pH = 7.¹⁴ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

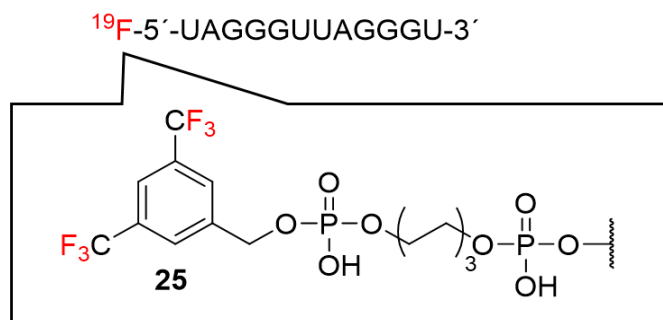
4.2. G-kvadrupleksit

G-kvadrupleksit ovat neljästä guaniinirikasta RNA- tai DNA-juosteesta muodostuneita rakenteita. Niitä esiintyy esimerkiksi telomeereissä sekä useissa onkogeenisissa RNA- ja DNA-juosteissa. Niillä on merkittävä vaikutus telomeerien säätelyyn ja suojaukseen, mistä syystä ne ovat olleet lääkekehityksen ja -tutkimuksen mielenkiinnon kohteina.^{49–51} RNA G-kvadrupleksit aiheuttavat esimerkiksi proteiini-riippuvaista onkogeneenien translaatiota syöpä- ja hermorappeumasairauksissa.^{52,53} Joissain tutkimuksissa on havaittu viitteitä siitä, että RNA G-kvadrupleksit voivat esiintyä polymorfisina korkeamman järjestymisasteen G-kvadrupleksirakenteina, jotka koostuvat kahdesta pinoutuneesta G-kvadrupleksi alirakenteesta.^{54,55}

Bao kollegoineen tutki RNA G-kvadrupleksejä *in vitro* ja elävissä soluissa käyttämällä fluorileimattuja oligonukleotideja ja ^{19}F -NMR-spektroskopiaa. Tutkimuksen lähtökohtana oli luoda uusia työkaluja telomeerin G-kvadrupleksien korkeamman järjestymisasteen rakenteiden suoraan havainnointiin elävissä soluissa.⁴³ Tutkimuksessa havaittiin ensimmäistä kertaa, että RNA-kvadrupleksit pinoutuvat kahden alayksikön muodostamiin korkeamman järjestäytymisasteen rakenteiksi. Lisäksi tuloksista voidaan päätellä, että solujen korkea kokonaiskonsentraatio (crowding effect) suosii korkeamman järjestäytymisasteen rakenteita jopa pienissä RNA-pitoisuuksissa. G-kvadrupleksien termaalinen pysyvyys oli lisäksi korkea näissä korkean kokonaiskonsentraation liuoksissa.

Tutkimuksessa käytetty koetin oli valmistettu automatisoidulla DNA/RNA-syntetisaattorilla käyttäen fosforamidiittikytkentäkemiaa. Fluorileimattuna ryhmänä oli 3,5-bis(trifluorometyyli)fenyyli (Kuva 12, **25**), joka oli liitetty RNA-juosteen 5'-päähän.

RNA-juosteen emäsjärjestys oli 3'-UGGGAUUGGGAU-5'.

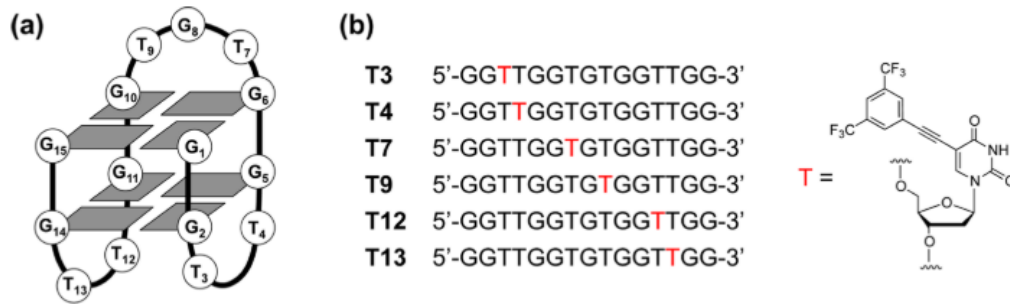


Kuva 12 Bao et al. koettimen rakenne.⁴³ Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan Oxford University Press luvalla.

¹⁹F-NMR-spektroskopiaan perustuvia koettimia on käytetty myös DNA G-kvadrupleksien tutkimiseen. Ishizuka kollegoineen tutki trombiinia sitovan aptameerin (thrombin binding aptamer, TBA) DNA G-kvadruplekseja korvaamalla kohdejuosteen tymidiini-emäksiä yksi kerrallaan ¹⁹F-leimatuilla nukleotideilla (Kuva 1, **10**).³² Näitä leimattuja juosteita käytettiin malliyhdisteinä todentamaan G-kvadrupleksin konformaation vaikutus leiman tuottamaan ¹⁹F-NMR-signaaliin. Koetinjuosteen konformaation muutos lämpötilan funktiona yksijuosteisesta DNA:sta kvadrupleksiksi pystyttiin havaitsemaan ¹⁹F-NMR-spektroskopian avulla. Lisäksi tutkittiin TBA:n ja sen kohdeproteiinin välistä sitoutumista.

Tutkimuksessa käytetty ¹⁹F-leimattu ryhmä valmistettiin Shonogashiran reaktiolla 5-jodo-2'-deoksiuridiinista ja 1-etynyyli-3,5-bis(trifluorimetyyli)bentseenistä. Näin valmistetusta 2'-deoksinukleosidista valmistettiin 5'-dimetoksitrietyloitu fosforamidiittirakenneyksikkö, jota käytettiin varsinaisen koetinjuosteen valmistamiseen kiinteän kantajan DNA-synteesissä.³²

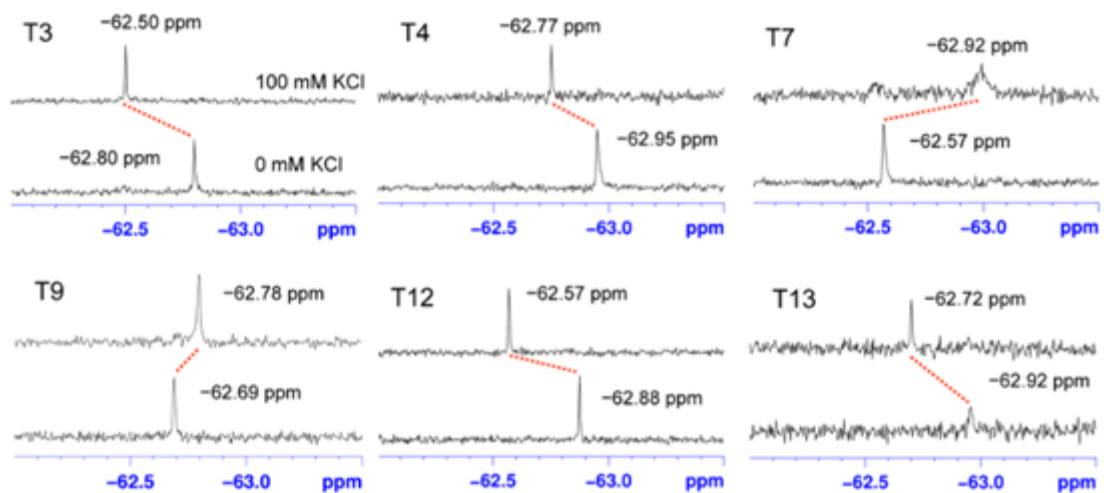
¹⁹F-leimatujen ja leimaamattomien G-kvadrupleksien konformaatiot määritettiin aluksi CD-spektroskopiolla. Sekä leimatujen, että leimaamattomien G-kvadrupleksien CD-spektreissä havaittiin maksimit ja minimi 295 nm:n ja 265 nm:n kohdalla, mikä on tunnuksenomaista antiparalleelisessa tuolikonformaatioissa olevalle G-kvadrupleksille.⁵⁶ Tästä voidaan päätellä, että ¹⁹F-leimatun nukleosidin lisääminen juosteen silmukka-alueeseen ei vaikuta G-kvadrupleksin laskostumiseen.



Kuva 13 Ishizuka et al. (a) G-kvadrupleksi aptameerin rakenne. (b) Tutkimuksessa käytettyjen ^{19}F -leimattujen oligonukleotidien emäsjärjestys ja ^{19}F -leimatun 5-((3,5-bis(trifluorometyyli)fenylyli)etyynyli)-2'-deoksiuridiinin rakenne.³² Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan American Chemical Society luvalla.

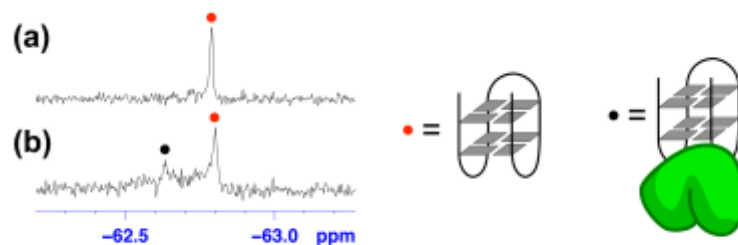
Ishizukan ja kollegoiden tutkimuksessa tutkittiin juosteen konformaation muutosta sekä lämpötilan, että KCl-pitoisuuden funktiona. Kun KCl-pitoisuutta nostettiin 0 mM:sta 100 mM:een havaittiin ^{19}F -NMR-spektrissä uusien resonanssisignaalien syntyminen ja vanhojen katoaminen kaikilla tutkituilla oligonukleotideilla. Esimerkiksi ^{19}F -leimatun oligonukleotidin **T12** NMR-spektrissä havaittiin resonanssisignaali -62,88 ppm:n kohdalla KCl-pitoisuuden ollessa 0 mM. Tällöin oligonukleotidi esiintyy liuoksessa yksijuosteissa konformaatioissa. Kun KCl-pitoisuus nostettiin 100 mM:iin syntyi uusi signaali -62,57 ppm:n kohdalle ja edellinen signaali hävisi. Kun lämpötilaa nostettiin 70 °C:een, -62,57 ppm:n kohdalla oleva signaali hävisi ja yksijuosteisen muodon signaali palasi. Näin todennettiin, että ^{19}F -leimausta ja NMR-spektroskopiaa voidaan käyttää G-kvadrupleksien konformaation tutkimiseen.³²

Leimatun nukleotidin paikka juosteessa vaikuttaa ^{19}F -spektrissä havaittavaan kemialliseen siirtymään, mikä selittyy sillä, että fluorin kemiallinen ympäristö vaikuttaa suuresti sen ^{19}F -NMR-spektrin kemiallisiin siirtymiin. Lisäksi signaalien muoto vaihteli ^{19}F -leimatun nukleotidin **T** eri paikkojen välillä. Tämä selittyy osittain sillä, NMR-signaalin muoto on riippuvainen molekyylin mahdollisuudesta pyörimisliikkeeseen sitä ympäröivässä liuoksessa^{57,58}. Nämä havainnot tukevat mahdollisuutta käyttää tutkittua koetinta G-kvadrupleksien rakenteen ja toiminnan yksityiskohtaiseen havainnointiin.³²



Kuva 14 Ishizuka et al. KCl-pitoisuuden vaikutus ^{19}F -NMR-siirtymään. Kuvassa on lisäksi nähtävissä ^{19}F -leimatun nukleotidin paikan vaikutus kemialliseen siirtymään.³² Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan American Chemical Society luvalla.

^{19}F -leimatulla koettimella voitiin tutkia myös G-kvadruplexiaptameerin ja sen kohdeproteiini trombiinin välistä sitoutumista. Kun G-kvadruplexia sisältävään liuokseen listättiin trombiinia ilmestyi ^{19}F -NMR-spektriin uusi signaali, joka assignoitiin G-kvadruplexi-trombiini-kompleksista johtuvaksi. Näin saatiin viitteitä siitä, että ^{19}F -NMR-spektroskopiaan perustuvalla analyysi menetelmällä voitaisiin tutkia myös G-kvadruplexien ja proteiinien välisiä vuorovaikutuksia.³²



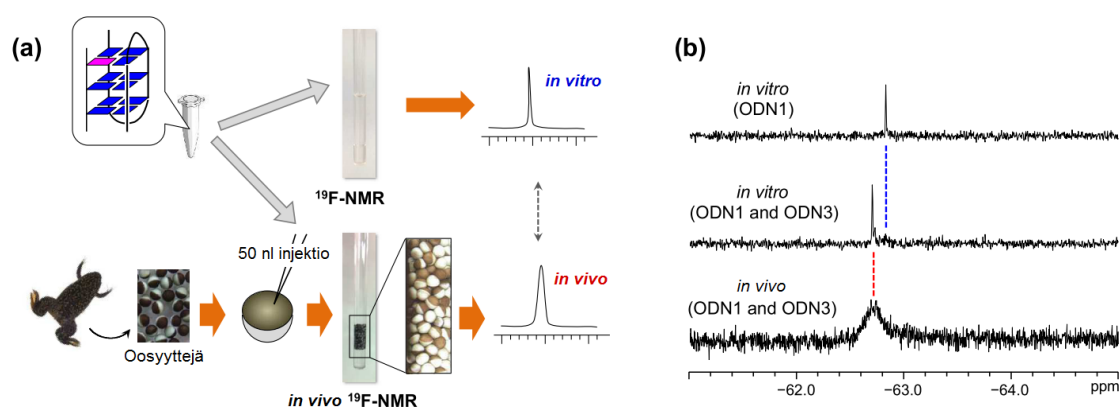
Kuva 15 G-kvadruplexin ja G-kvadruplexi-proteiini-kompleksien tutkiminen ^{19}F -NMR-spektroskopiolla.³² Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan American Chemical Society luvalla.

Eräässä toisessa tutkiuksessaan⁵⁹ Ishizuka ja kollegat tutkivat ^{19}F -NMR-leimatun guaniinijohdannaisen vaikutusta TBA:n muodostaman G-kvadruplexin pysyvyyteen sekä kyseisen ^{19}F -leimatun aptameerin soveltuvuutta G-kvadruplexien havainnointiin elävissä soluissa. ^{19}F -leimattu guaniinijohdannainen (^8F G) (Kuva 3, **18**) valmistettiin liittämällä 3,5-bis(trifluorometyyli)bentseeni 2'-deoksiguanosiiniin Sonogashiran

reaktiolla. Näin valmistetusta nukleosidista tehtiin fosforamidiitti, joka liitettiin koetinjuosteeseen kiinteänkantajan synteesimenetelmällä.

Tutkimuksessa selvisi, että ^{8F}G parantaa G-kvadrupleksin pysyvyyttä verrattuna luonnollisiin sekvensseihin. Tämä johtuu tutkijoiden mukaan siitä, ^{8F}G 8-aseman substituentin ja riboosirenkaan välinen steerinen varjostus stabiloi *syn* konformaatioissa olevan G-kvadrupleksin rakennetta.

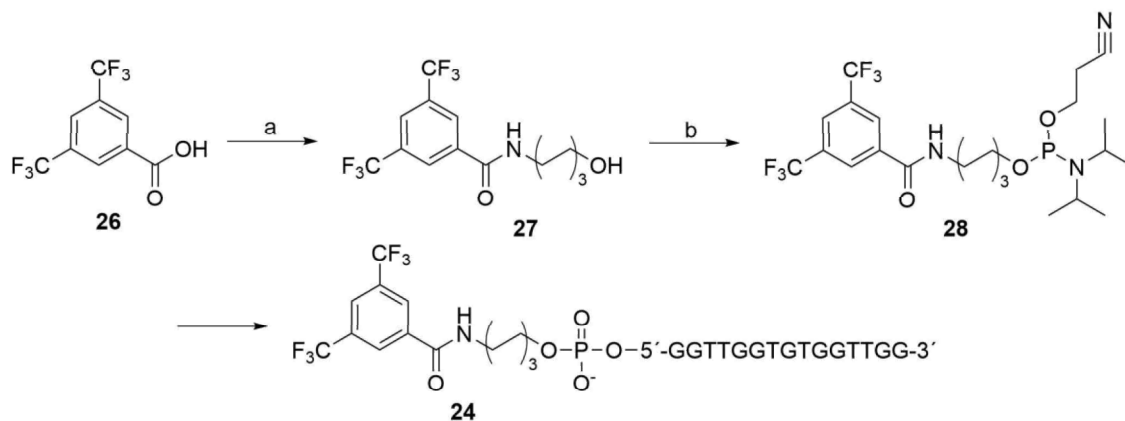
Ishizuka ja kollegat tutkivat ^{8F}G -muokatun aptameerin soveltuvuutta G-kvadrupleksien *in vivo* -havainnointiin. He käyttivät mallisoluina afrikankynsisammakon (*Xenopus laevis*) munasoluja, sillä ne ovat aikaisemmissa tutkimuksissa^{60–65} osoittautuneet hyödyllisiksi työkaluiksi NMR-spektroskopiaan perustuvissa *in vivo* -koejärjestelyissä. Soluihin injektioitiin 19F -leimattuja oligonukleotideja **ODN1** sekä leimaamattomia luonnollisia oligonukleotideja **ODN3**. Oligonukleotidien oli *in vitro*-mittauksissa havaittu muodostavat intermolekulaarisen G-kvadrupleksin (**ODN1** + **ODN3**). Solut laitettiin NMR-näyteputkeen ja niistä mitattiin 19F -NMR-spektri, jossa havaittiin G-kvadrupleksille ominainen signaali. Näin todennettiin ^{8F}G -muokatun aptameerin soveltuvuus G-kvadrupleksin rakenteen tutkimiseen *in vivo*.⁵⁹



Kuva 16 (a) Kaavakuva *In vivo* 19F NMR –mittauksista *X. laevis* oosyyteissä. DNA-näyte injektioitiin soluihin. Vertailulla *in vitro* –mittauksissa saatuun spektriin saadaan luotettavaa tietoa solunsisäisen DNA:n konformaatiosta. (b) Esimerkkejä *in vitro* - ja *in vivo* - 19F NMR-mittauksista.⁵⁹ Kuva on uudelleen julkaistu kustantajan Royal Society of Chemistry luvalla.

Sakamoto kollegoineen kehittivät 19F -leimattuun G-kvadrupleksiin perustuvan menetelmän kaliumionien havaitsemiseen.⁴⁴ Kyseinen koetin voisi mahdollistaa kaliumin tehokkaamman ja tarkemman havaitsemisen *in vivo*. Aikaisemmin raportoitujen^{66,67} fluoresenssiin perustuvien menetelmien ongelmana *in vivo* -analytiikassa on soluelinten huono kyky läpäistä fluoresenssia. Lisäksi 19F -NMR-spektroskopiaan perustuvan

koettimen etuna on näytematriisista johtuvat olemattomat taustasignaalit. Sakamoton ja kollegoiden tutkimuksessa käytettiin koettimen ^{19}F -leimattua trombiini aptameeria (TBA). Fuorileima (Kuva 5, **24**) oli liitetty koettimen 5'-päähen tavanomaista fosforamidiittikytkentäkemiaa käyttämällä kiinteän kantajan synteesillä. Fluorileimana käytettiin 3,5-bis(trifluorometyyli)bentseeni -ryhmää.



Kaavio 4 Sakamoto et al. ⁴⁴ koettimen valmistaminen ja koettimen rakenne. Reaktio-olosuhteet: a: 6-amino-1-heksanoli, EDC, HOBt, DIPEA, DMF, b: 2-syanoetyyli N,N,N',N'-tetraisopropyyli fosforamidiitti, bentsyyliiti-1*H*-tetrazoli, asetonitrili.

TBA:n konformaatio muuttuu intramolekulaariseksi G-kvadrupleksiksi kaliumkationin pitoisuuden kasvaessa⁶⁸. Sakamoto kollegoineen oletti tämän vaikuttavan myös koettimen ^{19}F -spektrin kemiallisiin siirtymiin, koska fluorin kemiallinen ympäristö muuttuu aptameerin konformaation muuttuessa.

Tutkimuksessa havaittiin, että KCl:n lisääminen aptameeria sisältävään liuokseen siirsi 3,5-bis(trifluorometyyli)bentseeni -ryhmän (Kuva 5, **24**) ^{19}F -NMR-signaalia kohti spektrin alakenttää. Kaliumkationin läsnä ollessa mitatut aptameerin UV-sulamisprofiili ja CD-spektri osoittivat G-kvadrupleksille tunnusomaisia signaaleja. UV-absorbanssi laski lämpötilan kasvaessa ja CD-spektrissä näkyi maksimi ja minimi 295 nm ja 270 nm kohdalla. Näin voitiin päätellä, että ^{19}F -NMR-signaalin kemiallisen siirtymän muutos johtui aptameerin konformaatiotasapainon siirtymisestä kohti G-kvadrupleksia.

Koettimella pystyttiin havaitsemaan kaliumpitoisuuksia millimolaarisissa konsentraatioissa ja aptameeri-kalium-kompleksin dissosiaatiovakioksi määritettiin $1,3 \pm 0,14$ mM. Aikaisemmassa tutkimuksessa raportoitu dissosiaatiovakio (K_d) kompleksille on $5 \mu\text{M}$ ⁶⁸, mistä voidaan päätellä, että aptameerin 5'-leimaus 3,5-bis(trifluorometyyli)bentseenillä vähentää kaliumin sitoutumista. ^{19}F -TBA-koettimelle mitattu K_D ei kuitenkaan eroa paljoa aikaisemmin raportoitujen kaliumsensorien dissosiaatiovakioista (PBFI: $K_d = 8 \text{ mM}$ ⁶⁹ ja CD222: $K_d = 0,8 \text{ mM}$ ⁷⁰), mistä johtuen nyt tutkittua koetinta voidaan pitää käyttökelpoisena vaihtoehtona kaliumkationin

havaitsemiseen. ^{19}F -leimaus alensi aptameerin sulamispistettä, sillä UV-sulamispistemittauksissa havaittiin, että ^{19}F -TBA:n sulamispiste oli $-7,0\text{ }^\circ\text{C}$:tta matalampi kuin leimaamattoman TBA:n. Näistä tuloksista havaitaan, että varsinaisen fluorileiman tai TBA:n ja leiman välisen linkkerin rakenne vaatii vielä optimointia, jotta koettimella pystyttäisiin havaitsemaan alhaisempia kaliumpitoisuuksia.

Sakamoto kollegoineen tutki myös ^{19}F -TBA:n selektiivisyyttä kaliumkationia kohtaan mittaamalla ^{19}F -NMR-spektrin useiden eri metallikationien läsnäollessa. ^{19}F -TBA:lle mitattu kemiallisen siirtymä muuttui ainoastaan kaliumkloridia lisättäessä, mikä havainnollistaa koettimen selektiivisyyttä kaliumia kohtaan.⁴⁴

4.3. DNA-kolmoiskierre

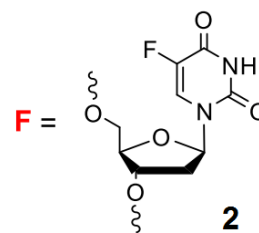
Kolmoiskierteiset nukleiinihapporakenteet syntyvät, kun kolmas juoste sitoutuu sekvenssispesifisesti kaksoiskierteisen oligonuklotidirakenteen isoon uurteeseen.⁷¹

Isossa uurteessa puriiniemästen niin sanotulla Hoogsteen-puolella on useita vetysidoksen luovuttajia ja vastaanottajia, jotka voivat muodostaa vetysidoksia kolmannen juosteen kanssa.⁷² Ensimmäiset viitteet kolmijuosteisen DNA-rakenteesta löysivät vuonna 1957 Felsenfeld kollegoineen⁷³, kun he havaitsivat polyriboadenyylihappoketju ja kaksi polyribouridyylilihappoketjua voivat muodostaa kolmoiskierteen magnesium-ionien läsnä ollessa. Tästä alkoi kolmikierteisten nukleiinihappojen tutkimus, joka on johtanut useisiin biologisiin sovelluksiin ja niiden tutkimiseen terapian ja diagnostiikan välineinä.^{73–76}

DNA-kolmoiskierteiden tutkimiseen on käytetty useita eri menetelmiä kuten fluoresenssiin perustuvia tekniikoita^{10,11}, isotermistä titrauskalorimetriaa⁷⁷, geelielektroforeesia^{78,79} sekä UV-,⁷ CD-^{8,9} ja NMR-spektroskopiaa^{80–82}. UV-spektroskopiaan perustuva menetelmä⁷ on yksi käytetyimmistä menetelmistä kolmoiskierteen stabiilisuutta kuvaavissa sulamispistemäärityksissä. Menetelmän käyttökelpoisuutta rajoittaa kuitenkin se, että absorbanssivaihtelut kaksois- ja kolmoiskierteen välillä voivat olla pieniä tai niiden sulamispisteet ovat liian lähellä toisiaan. Lisäksi menetelmällä ei saada rakenteellista tietoa, joten sitä käytetään usein yhdessä CD-spektroskopian kanssa. CD-spektroskopia ei toisaalta sovellu hyvin useiden oligonukleotidien samanaikaiseen havaitsemiseen eikä pitkille oligonukleotideille.^{8,9}

Tanabe kollegoineen tutki DNA-kaksois- ja kolmoiskierrerakenteita ^{19}F -NMR-spektroskopisesti.⁸³ He käyttivät tutkimuksessaan ^{19}F -leimattuna ryhmänä 5-fluorodeoksiuridiinia (**2**) ja useita eri leimattuja ja leimaamattomia oligonukleotideja.

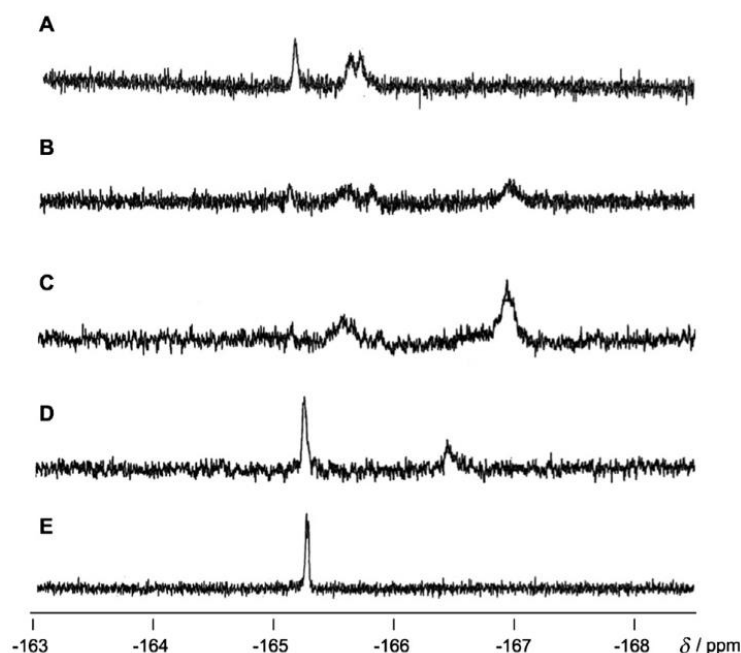
ODN 4 5'-ATA A**FC** CCA TGG ATC CAT CAC TAC T-3'
 ODN 5 5'-AGTA GTG ATG GAT CCA TGG GAT TAT-3'
 ODN 6 5'-CCTTCCT**FC**TCCCTC-3'
 ODN 7 5'-TACGGAAGGAAGAGGGAGTC -3'
 ODN 8 5'-GACTCCCTCTTCTTCCGTA-3'



Kuva 17 Tanabe et al. Tutkimuksessa käytettyjen oligonukleotidien sekvenssit ja leimaryhmän rakenne. Kolmoiskierteen muodostavat sekvenssit kursivoituna.⁸³ Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan Elsevier luvalla.

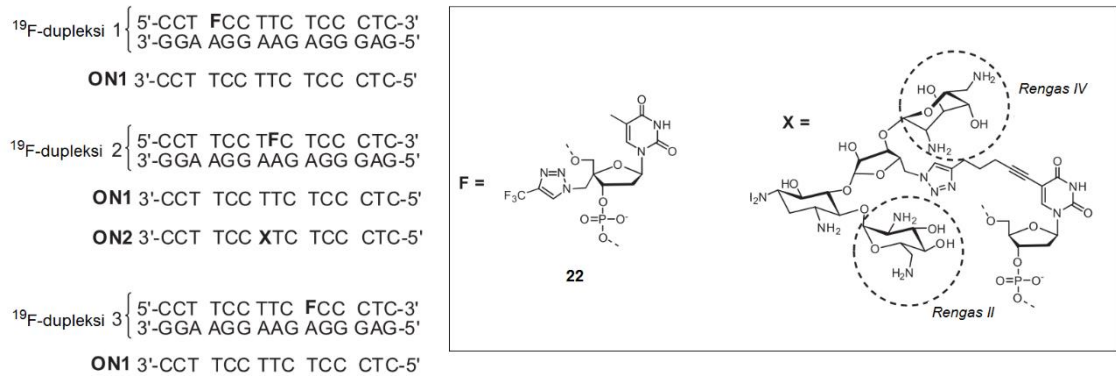
¹⁹F-leimattu **ODN 6**:n NMR-spektrissä oli signaali -165,7 ppm:n kohdalla pH:ssa 7,0 lämpötilan ollessa 25 °C. Kun pH laskettiin 5,5 havaittiin useita uusia signaaleja, joiden arveltiin johtuvan epäspesifisistä korkeamman järjestysasteen DNA-rakenteista. Paljon sytosiiniä (C) sisältävien DNA-juosteiden tiedetään muodostavan esimerkiksi niin sanottuja *i*-motif-rakenteita happamissa liuksissa. Lisäksi yhdisteistä mitattu CD-spektri sisälsi maksimin 283 nm:n kohdalla ja minimin 260 nm:n kohdalla, mikä täsmää aikaisemmin raportoituihin havaintoihin protonoituneiden sytosiinien *i*-motif-rakenteista.^{84,85} Kun lämpötila nostettiin 50 °C:een, epäspesifisten rakenteiden signaalit katosivat. Tämä havainto tukee johtopäätöstä, että happamissa olosuhteissa havaitut useat signaalit tulivat korkeamman järjestäytymisasteen rakenteista.

Kun oligopyrimidiinisekvenssi **ODN 6**-liuokseen pH:ssa 5,5 lisättiin **ODN 7 / ODN8**-kaksoiskierre, havaittiin ¹⁹F-NMR-spektrissä uusi signaali kemiallisen siirtymän arvolla -166,9 ppm. Tästä liuoksesta mitatussa CD-spektrissä havaittiin minimi 210 nm:n kohdalla, joka on tyypillinen kolmoiskierteelle.⁸⁶ Lämpötilan nosto 50 °C:een johti signaalin häviämiseen -166,9 ppm:n kohdalla ja ODN 3:a vastaavan signaalin muodostumiseen. Näin voitiin päätellä signaalin -166,9 ppm kohdalla johtuvan DNA-kolmoiskierteestä. Näin ollen Tanaben kollegoineen tutkima oligonukleotidikoetin sopii DNA-kolmoiskierteiden tutkimiseen ¹⁹F-NMR-spektroskopisesti.



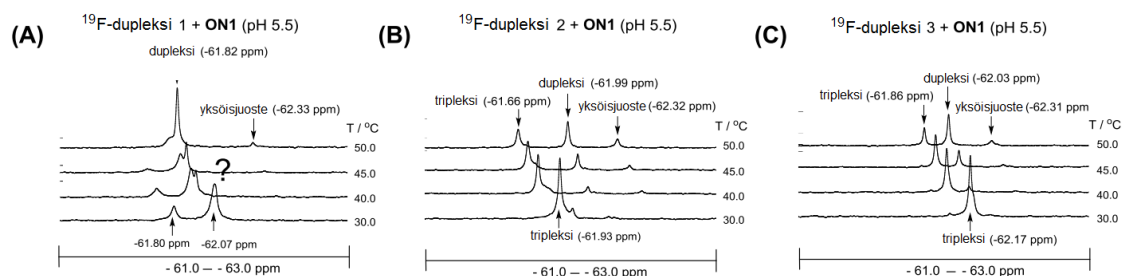
Kuva 18 5-fluorouridiinin sisältävän ON6:n ^{19}F NMR –spektrit. NMR- olosuhteet: 10 mM fosfaattipuskuri pH 5,5, 2 mM MgCl_2 . (A) ODN 6 (250 μM) 25 °C. (B) ODN 6 (219 μM) ODN 7/ODN 8 –kaksoiskiirteen läsnä ollessa (219 μM) 25 °C. (C) ODN 6 (211 μM) ODN 7/ODN 8 –kaksoiskiirteen läsnä ollessa (296 μM) 25 °C. (D) ODN 6 (211 μM) ODN 7/ODN 8 –kaksoiskiirteen läsnä ollessa (296 μM) at 50 °C. (E) Yksijuosteinen ODN 6 (250 μM) 50 °C.⁸³ Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan Elsevier luvalla.

Tähtinen kollegoineen tutki ^{19}F -leimattujen DNA-kaksoiskierteiden ja neomysiini-oligonukleotidi-konjugaattien kaksois/kolmoiskierre-tasapainoa ^{19}F -NMR-spektroskopisesti.¹³ He käyttivät tutkimuksessaan kaksoiskierrettä, jonka kolme eri kohtaa leimattiin 4'-C-[trifluorometyyli-1*H*-1,2,3-triatsol-1-yyli)metyyli]tymidiinillä (Kuva 4, **22**). Aikaisemmassa tutkimuksessaan² he olivat osoittaneet, että 4'-C-[trifluorometyyli-1*H*-1,2,3-triatsol-1-yyli)metyyli]tymidiini (**22**) on hyvä ^{19}F -NMR -sensori tähän tarkoitukseen. Kyseinen sensor ei vaikuta DNA-kolmoiskiirteen pysyvyyteen, mutta sen ^{19}F -signaalin kemiallinen siirtymä on hyvin herkkä ympäristönsä muutoksiin. Sensorin kemiallinen ympäristö muuttuu merkittävästi, kun kaksoiskiirteen matala uurre muuttuu kolmoiskiirteen Watson-Crick uurteeksi.⁸⁷ Koettimen kolme magneettisesti ekvivalenttia fluoriatomia näennäisesti eristäytyneessä spin-järjestelmässä mahdollistavat ^{19}F -NMR-mittaukset verrattain pienissä 50 μM oligonukleotidipitoisuuksissa.



Kuva 19 Tähtinen et al. Leimatus nukleotidin F ja neomysiini-oligonukleotidi-konjugaatin rakenteet sekä tutkimuksessa käytetyt juosteet. ¹³ Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan Elsevier luvalla.

^{19}F -leimattujen kaksoiskiarteiden ja **ON1**:n seoksien ^{19}F -NMR-signaalien kemiallisissa siirtymissä havaittiin merkittäviä eroja. ^{19}F -dupleksi 2 + **ON1** ja ^{19}F -dupleksi 3 + **ON1** käyttäytyivät samansuuntaisesti. Molemmista tapauksissa ^{19}F -NMR-signaalien suhteelliset alat kolmoiskiarteelle, kaksoiskiarteelle ja yksijuosteiselle muodolle ovat samat. Tosin kolmoiskiarten C ^{19}F -signaali oli 0,2 ppm ylemmällä kentällä 50 °C:een lämpötilassa. Lisäksi molemmista tapauksissa 30 °C:een lämpötilassa kaksoiskiarten. ^{19}F -dupleksi 1 + **ON1** käyttäytyi huomattavan eri tavalla verrattuna tapauksiin B ja C. Ensinnäkin 50 °C:een lämpötilassa dupleksin signaali siirtyi 0,2 ppm alakentälle (-61.82 ppm (A), -61.99 (B) ja -62.03 ppm (C), 50 °C). Toisekseen 30 °C:een lämpötilassa NMR-spektrissä havaittiin kaksi leveää signaalia, joiden integraalien suhde oli 1:3. Tutkijat eivät pystyneet selittämään tutkimuksessa tämän havainnon syytä, mutta todennäköisesti se liittyi kolmoiskiarteelle epätyypilliseen uurrerakenteeseen.⁸³

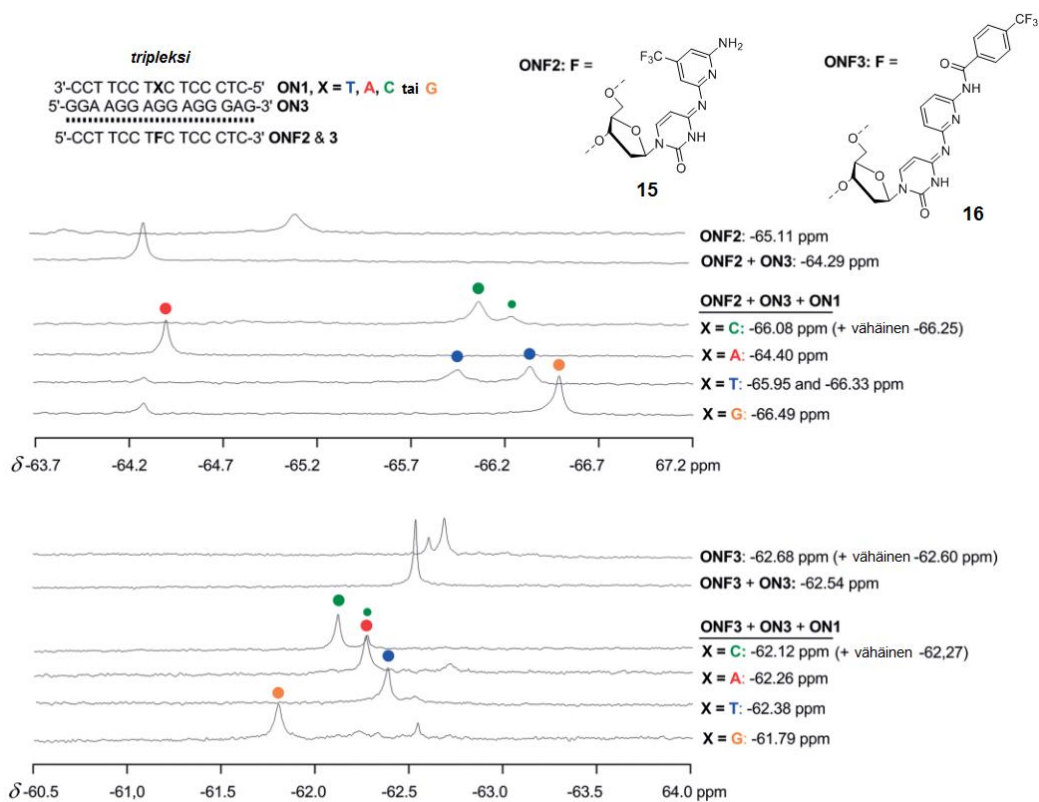


Kuva 20 Tähtinen et al. ^{19}F -kaksoiskiarteiden 1–3 + **ON1** (A–C) ^{19}F NMR-spektrit.¹³ Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan Elsevier luvalla.

Verrattaessa Tähtisen kollegoineen käyttämää 4'-C-[trifluorometyyli-1H-1,2,3-triaatsol-1-yyli)metyyli]tymidiinä (Kuva 4, **22**) ja Tanaben ryhmän käyttämää 2'-deoksi-

5-fluorouridiinia⁸³ (Kuva 1, 2) huomataan, että **22** tuottaa terävämät signaalit. Lisäksi sen avulla pystyttiin tarkastelemaan dupleksien ja tripleksien sulamista ja määrittämään rakenteille sulamispisteet (T_m) ¹⁹F-NMR-spektroskopisesti. Rakenteiden molaariset suhteet voidaan määrittää spektrin piikkien suhteellisten pinta-alojen avulla.¹³

Bhuma kollegoineen tutki DNA-kolmoiskierteitä käyttämällä 6-amino-pyridin-2-yyli-johdannaisten (**15** ja **16**) linkkerien avulla CF₃-leimattua sytosiiniä sisältäviä koettimia **ONF2** ja **ONF3**.¹² Heidän käyttämillään koettimilla pystyttiin havaitsemaan yhden emäksen ero pyrimidiini-rikkaassa kohdejuosteessa. GC-rikkouden kaksoiskierteiden Hoogsteen-puolelle tapahtuva sitoutuminen rajoittuu kuitenkin vain happamiin olosuhteisiin (käytetty pH 5,5). Jokaiselle F*G-X-triadille (X = T, A, C tai G) pystyttiin määrittämään oma tunnusomainen ¹⁹F-NMR-sormenjälki. Koettimen **ONF2** resonanssi jakaantui kahdeksi signaaliksi pyrimidiini emäksien tapauksessa, mikä voi johtua koettimen esiintymisestä kahtena melko stabiilina konformeerina muodostaessa kolmoiskiirteen AC- ja AT-emäsparien kanssa. Koettimen **ONF3** muodostaessa kolmoiskiirteen AC-emäsparin kanssa havaittiin kaksi signaalia, joista toinen oli kuitenkin huomattavasti pienempi. **ONF2**:n tapaista selkeää signaalien jakautumista ei havaittu.



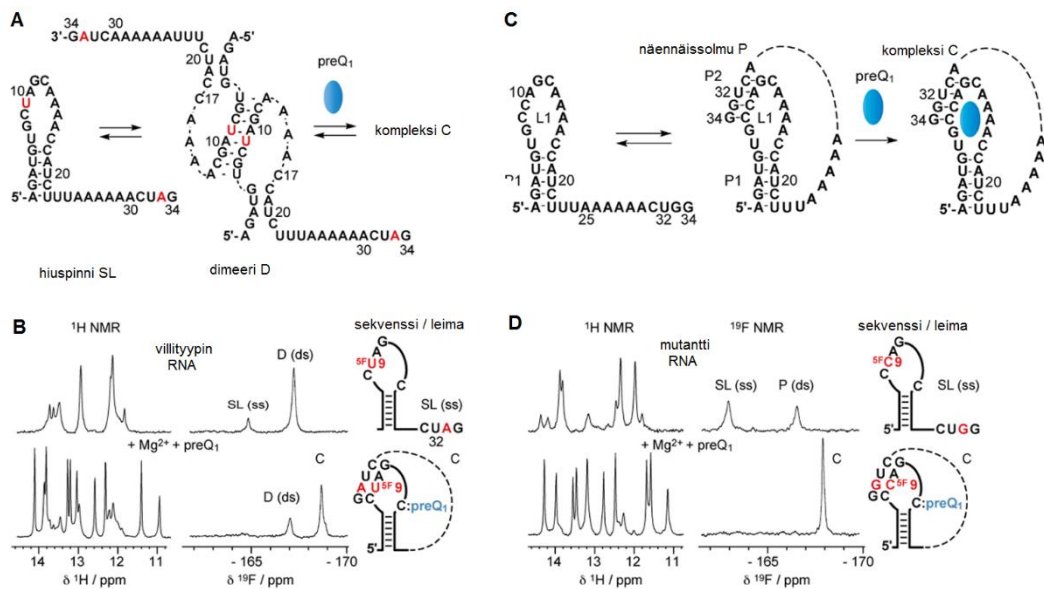
Kuva 21 Tripleksien ¹⁹F NMR-spektrit (F*G-X-triads, X = C, A, T tai G). NMR-olosuhteet: 10 μ M ON, 10 mM natriumkakodylaatti, 0,1 M NaCl, pH 5,5, D₂O/H₂O (1:9, v/v), 20°C.¹² Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan Elsevier luvalla.

4.4 Ribokytkimet

Ribokytkimet ovat lähinnä bakteereista löytyviä lähetti-RNA:n (mRNA) osia jotka osallistuvat kyseisen mRNA:n säätelyyn. Ne sijaitsevat 5'-transloitumattomissa alueissa ja ne koostuvat tyypillisesti kahdesta domeenista, joista toinen on ligandiselektiivinen korkean sitoutumisaffiniteetin aptameeri ja sen vieressä olevasta varsinaista geenien säätelyyn osallistuvasta domeenista. Ligandin kiinnittyminen aptameeriin aiheuttaa konformaation muutoksen säätelyyn osallistuvassa domeenissa, mikä johtaa geenin ilmentymisen säätelyyn.⁸⁸

Santner kollegoineen tutki *Fusobacterium nucleatum* -bakteerin preQ₁ luokan 1 ribokytöntä käyttämällä 5-fluoroleimattuja pyrimidiiniemäksiä (Kuva 1, 2 ja 3).⁸⁹ Kyseiset ribokytkimet muodostavat näennäissolmun (pseudoknotin), kun siihen sitoutuu 7-aminometyyli-7-deatsaguaniini (preQ₁).⁹⁰ Tutkimuksessa käytettiin ribokytkimen villityyppiä ja mutatoitunutta tyyppiä, jossa yksi emäspari oli vaihdettu toiseksi (A33G/U9C). He pystyivät ¹⁹F-NMR-spektroskopisesti havaitsemaan, että mutantti aptameeri esiintyi kahdessa eri konformaatioissa, kun liuoksessa ei ollut preQ₁-ligandia. Aptameeri muodostaa pullistuman sisältämän rakenteen (stem-loop) lisäksi näennäissolmun, joka muistuttaa kompleksia, johon preQ₁ on sitoutunut. Nämä kaksi rakennetta ovat dynaamisessa tasapainossa keskenään. Nämä havainnot varmistettiin ¹H- ja ¹⁵N-spektroskopisesti. Villityypin aptameeri ei sen sijaan muodostanut näennäissolmua vaan sen havaittiin muodostavan kahden aptameerin dimeerin. Tätä dimeeria havaittiin myös preQ₁:n läsnä ollessa. Mutantilla ainoa ligandin läsnäollessa esiintyvä signaali assignoitiin aptameeri-ligandi-kompleksiksi.

Tutkimuksessa kyettiin tutkimaan RNA:n sekundäärirakenteiden eroja ¹⁹F-NMR-spektroskopisesti. Menetelmä vaatii kuitenkin melko korkeaa oligonukleotidikonsentraatiota (600 μM).⁸⁹



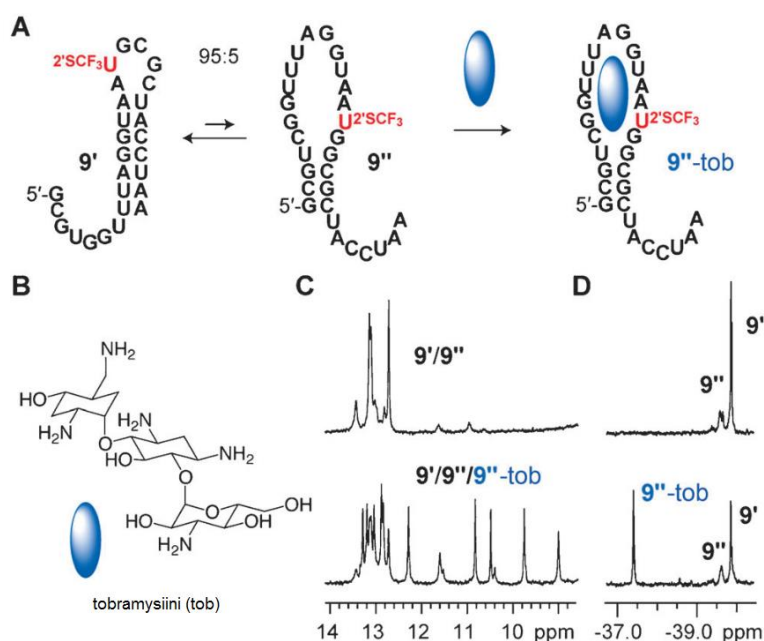
Kuva 22 Santner et al (A) Villityypin RNA:n Stem-loop - ja dimeerirakenteiden tasapaino. (B) 5F-U(9)-muokatun villityypin RNA:n vapaan ja preQ1:n kanssa kompleksoituneen rakenteen ^1H - ja ^{19}F -NMR-spektrit. (C) Mutantti RNA:n Stem-loop - ja pseudoknot-rakenteiden tasapaino. (D) 5F-U(9)-muokatun mutantti RNA:n vapaan ja preQ1:n kanssa kompleksoituneen rakenteen ^1H - ja ^{19}F -NMR-spektrit. NMR-olosuhteet: $[\text{RNA}] = 0,6 \text{ mM}$, $25 \text{ mM Na}_2\text{HAsO}_4$, pH 6,5, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, 298 K ; $[\text{Mg}^{2+}] = 3,0 \text{ mM}$, $[\text{preQ1}] = 1,2 \text{ mM}$.¹⁹ Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan Wiley luvalla.

Fauster kollegoineen on käyttänyt 2'-SCF₃ (**20**) leimattuja pyrimidiiniemäksiä reportterina ribokytkimien sekundaarirakenteiden tasapainon tutkimiseen.¹⁹ Tutkimuksessaan he valmistivat 27 nukleotidia pitkän malliribokytkimen, joka sisälsi ennestään tunnetun tobramysiinille sensitiivisen aptameerin.⁹¹

2'-SCF₃-leimattun pyrimidiinin (Kuva 4, **20**) ollessa RNA-rakenteen yksijuosteissa osassa, sillä ei odotetusti ole juurikaan vaikutusta rakenteen termodynaamiseen pysyvyyteen. Ollessaan Watson-Crick emäspariutuneessa kaksoiskierteessä se aiheuttaa huomattavan alenemisen rakenteen pysyvyyteen. Tämä johtuu 2'-SCF₃-muokattujen nukleosidien taipumuksesta esiintyä C2'-endo konformaatiossa. Lin ja Szostakin laskennalliset tutkimukset⁹² 3'-5'-silloittuneilla nukleinihapoilla tukevat tätä väitettä. He laskivat, että C2'-endo konformaatiossa oleva tähde heikentää A-muodon RNA-kaksoiskierrettä huomattavasti C3'-endo-konformeeriin verrattuna, vapaaenergioiden erotuksen ollessa 6 kcal mol^{-1} . Pysyvyys ero johtuu siitä, että A-muodon RNA-kaksoiskierrerakenteessa C2'-endo pinoutuminen häiritsee emäsparien tasomaista järjestäytymistä, mikä heikentää vetysidosvuorovaikutuksia.⁹²

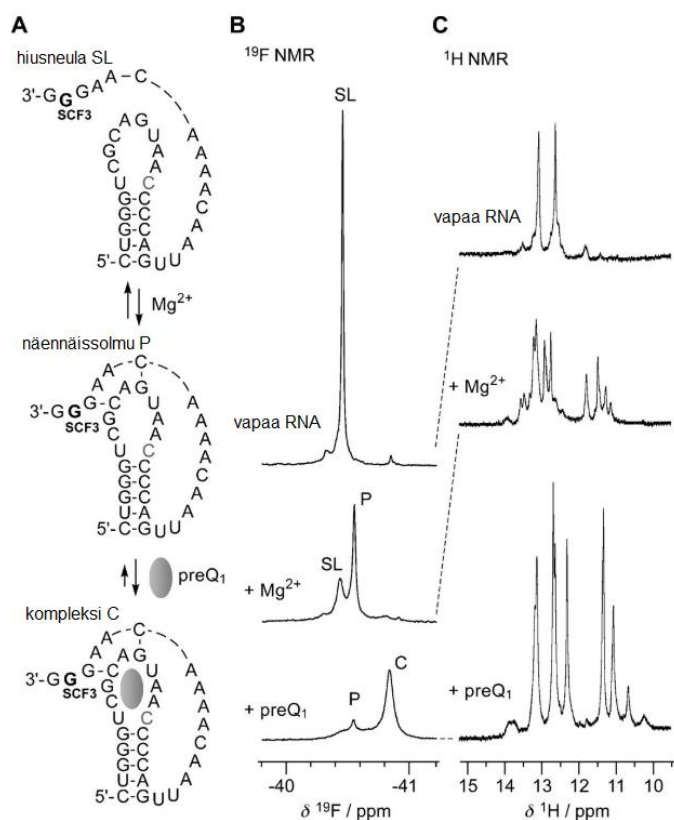
Fausterin ja kollegoinen valmistama malliribokytkin esiintyy liuoksessa vapaana ollessaan kahtena eri hiusneularakenteena. Lisättäessä liuokseen tobramysiiniä, ribokytkin kompleksoituu ligandin kanssa ja muodostaa tunnuksenomaisen 14

nukleotidia pitkän tobramysiinin sitovan silmukan. Tämä konformaation muutos voitiin havaita ^{19}F -NMR-spektroskopisesti.¹⁹



Kuva 24 Fauster et al.¹⁹ tutkimuksessaan käyttämän ribokytimen rakenne. A) Rinokytimen tasapainorakenteet. B) Tobramysiinin rakenne. C) RNA 9:n iminoprotonien NMR-spektri ennen (yllä) ja jälkeen (alla) tobramysiinin (0,5 ekvivalenttia) lisäästä. D) Sama kuin (C), mutta ^{19}F NMR-spektri. NMR-olosuhteet: [RNA] = 0,3 mM, [Na₂HAsO₂] = 10 mM, pH 7,0, H₂O/ D₂O = 9:1, 298 K; [tobramysiini] = 0,15 mM. Kuva on julkaistu uudelleen kustantajan Elsevier luvalla.

Pyrimidiiniemäksien lisäksi myös 2'-SCF₃-muokattuja puriiniemäksiä (**20**) on tutkittu ^{19}F -NMR-spektroskopisesti.⁹³ Jud kollegoineen tutki *Thermoanaerobacter tengcongensis* -bakteerin preQ₁ luokan I ribokytimen sekundäärirakenteiden tasapainoa käyttämällä reportterina 2'-SCF₃-modifioitua guanosiinia. Tutkimuksessa käytetty ribokytin esiintyy sekä näennäissolmu- että hiusneulakonformaatioissa fysiologisissa olosuhteissa Mg²⁺-ionin läsnä ollessa.^{89,94,95} Tämä nähtiin ^{19}F -NMR-spektrissä kahtena selkeänä resonanssisignaalina kemiallisten siirtymien arvoilla -40,2 ja -40,5. Kun liukseen lisättiin ligandia nelinkertaisesti oligonukleotidiin nähden huomattiin uusi signaali -40,8 ppm kohdalla. Tämä signaali assignoitiin preQ₁-RNA-kompleksille. Verratuna ^1H NMR-iminoprotonien signaaleihin perustuvaan analyysin sekundäärirakenteiden tutkiminen oli suoraviivaisempaa ^{19}F -NMR-spektroskopiolla (Kuva 23). Kuten odotettua, myös 2'-SCF₃-leimattuja puriiniemäksiä (Kuva 4, **20**) voidaan siis käyttää ribokytimien sekundäärirakenteiden tasapainojen tutkimiseen.

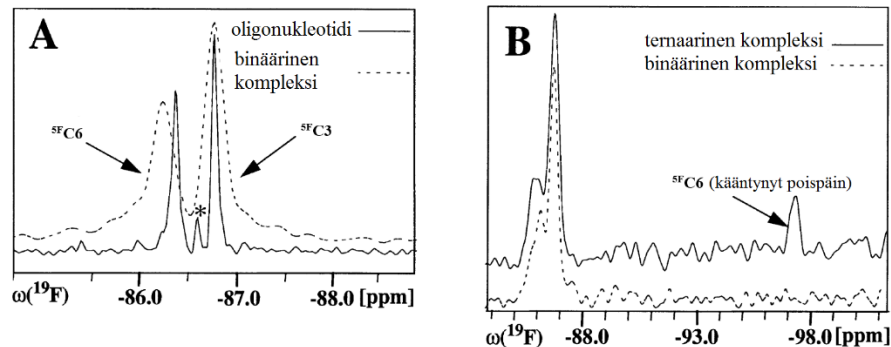
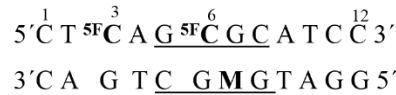


Kuva 23 2'-SCF₃-guanosiini-leimatun RNA:n Mg²⁺-avusteisen näennäissolmun muodostumisen ja sen sitoutumisen preQ1-ribokyttimeen tutkiminen ¹⁹F-NMR-spektroskopisesti. A) RNA:n sekundäärirakenteiden malli. PreQ1:n kanssa Watson-Crick-parin muodostava sytosiini merkattu harmaalla. B) Sekundäärirakenteita vastaavat ¹⁹F-NMR-spektrit. C) Sekundäärirakenteita vastaavat iminoprotonien ¹H-NMR-spektrit. C) NMR-olosuhteet: [RNA] = 0,3 mM, [natrium kakodylaatti] = 25 mM, pH 7,0, 298 K; lisäykset: [Mg²⁺] = 2,0 mM; [preQ1] = 1,2 mM.⁹³ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Wiley luvalla.

4.5. Nukleinihappojen vuorovaikutukset proteiinien kanssa

DNA-metyylitransferaasit metyloivat DNA:ssa esiintyviä sytosiini-emäksiä, mikä kasvattaa genomiin sisältyvän informaation määrää. Nämä entsyymit ovat mielenkiintoisia tutkimuskohteita, sillä niitä voidaan käyttää malleina tutkittaessa proteiini-DNA-vuorovaikutuksien yleisiä mekanismeja ja rakenteita.^{96,97} DNA-metyylitransferaasi *HhaI*:n on havaittu muodostavat välituotteen, jossa kohteena oleva emäs on käännetty pois DNA-kaksoiskierteestä kohti entsyymien katalyyttistä keskusta.⁹⁸ Klimesauskas kollegoineen tutki metyylietransferaasi *HhaI*:n toimintaa ja kohde-emäksen kääntymistä ¹⁹F-NMR-spektroskopisesti.⁹⁹ Tutkimuksessaan he vertailivat metyylietrioreaktion eri vaiheissa esiintyvien vapaan DNA-kaksoiskiirteen, binäärisen *M.HhaI*-DNA-kompleksin ja tertiäärin *M.HhaI*-DNA-kofaktori-kompleksin rakenteita tarkastelemalla kahden fluorileiman kemiallisia siirtymiä ja spin-relaksaatio-parametrejä. NMR-mittauksien lisäksi he täydensivät mittausdataa

geeliliikkuvuustesteillä. Mittauksessa käytettiin 12 nukleotidia pitkää DNA-kaksoiskierrettä, jossa toisessa juosteessa oli kaksi 5-fluorosytosiinia (Kuva 1, 3). Toinen 5-fluorosytosiini sijaitsi entsyymin kohdealueella, ja toinen kolmen nukleotidin päässä kohti 5'-päättä. Jälkimmäinen emäs toimi koettimessa sisäisenä verrokkina. Koettimen vastinjuosteen kohdealueella oleva sytosiini oli valmiiksi metyloity, jotta metylaasi-entsyymin toiminta ohjautuisi vain kohdejuosteeseen.



Kuva 24 Klimašauskasin kollegoineen käyttämän DNA-kaksoiskierteen rakenne sekä DNA-kaksoiskierteen ja DNA-proteiinikompleksien 1D ^{19}F NMR-spektrit. Allviivaus tarkoittaa metyyli transferaasin kohdesekvenssiä, $^{5}\text{F}\text{C}$ 5-fluorosytosiinia ja **M** 5-metyylisytosiinia. (A) Vapaan kaksoiskierteen DNA:n (yhtenäinen viiva) ja sen binäärisen *M.HhaI* -kompleksin (katkoviiva) ^{19}F NMR -spektri kemiallisen siirtymän alueelta -85 - -88 ppm. NMR-olosuhteet: ^{19}F -resonanssitaajuus 470,5 mHz, $[\text{DNA}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{KPO}_4] = 20 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,5$, $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O} 9:1$. Asteriskilla merkitty signaali on epäpuhtaudesta johtuva. (B) Binäärisen *M.HhaI* -kompleksin (katkoviiva) ja ternaarisen *M.HhaI*-DNA-AdoHcy -kompleksin (yhtenäinen viiva) ^{19}F NMR -spektri kemiallisen siirtymän alueelta -85 - -100 ppm. NMR-olosuhteet: ^{19}F -resonanssitaajuus 470,5 mHz, $[\text{DNA}] = 120 \mu\text{M}$, $[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$, $[\text{KPO}_4] = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,5$, $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O} 9:1$.⁹⁹ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan John Wiley and Sons luvalla.

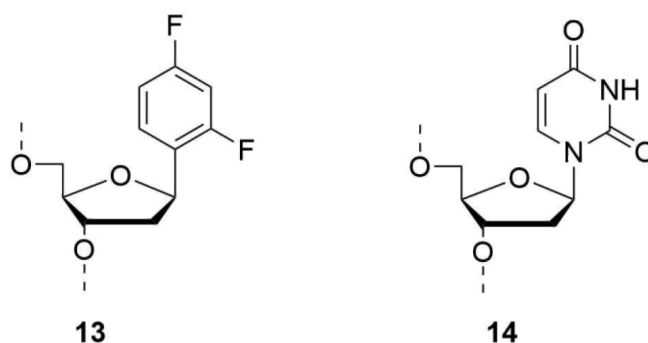
Mittauksissa havaittiin, että proteiini-DNA-kompleksin $^{5}\text{F}\text{C}6$ -signaali siirtyi 0,13 ppm alakentän suuntaan. Odotetusti $^{5}\text{F}\text{C}3$ -signaali säilyi muuttumattomana. Binäärisen kompleksin signaalien $^{5}\text{F}\text{C}6$ ja $^{5}\text{F}\text{C}3$ suhde oli huomattavasti pienempi alhaisemmassa ionivahvuudessa (Kuva 24B). Geeliliikkuvuusmittauksien perusteella entsyymin-DNA-sitoutuminen oli vahvempaa alhaisessa ionivahvuudessa, mikä voisi selittää signaalien $^{5}\text{F}\text{C}6$ alhaista intensiteettiä. Liuoksessa saattoi esiintyä useita tasapainorakenteita ja yksittäisten rakenteiden heikot signaalit jäivät havaitsematta NMR-mittauksen huonon herkkyuden tai rakenteiden välisen tasapainon aiheuttaman signaalien levenemisen vuoksi. Mielenkiintoinen havainto tehtiin, kun liuokseen lisättiin S-adenosyyli-L-homokysteiiniä (AdoHcy). Tällöin havaittiin uusi ^{19}F -resonanssi -97,3 ppm:n kohdalla. Näin suuren

kemiallisen siirtymän muutoksen (noin 11 ppm.) epäiltiin johtuvan emäksen $^{5F}C6$ kääntymisestä pois päin DNA-kaksoiskierteestä. Lisäksi signaalin terävyydestä voitiin päätellä, että DNA-proteiini-koentsyymi-kompleksin muodostuminen oli hidas prosessi (millisekuntien luokkaa). Myös geeliliikkuvuusmittaukset tukivat havaintoa kompleksin muodostumisen hitaudesta.

Mittaamalla 19F -spinleimojen relaksaatioaikoja tutkijat määrittivät DNA-kaksoiskierteisen rakenteen ja kääntyneen emäksen sisältävä rakenteen välisen tasapainon. He havaitsivat, että *M.HhaI* ei nopeutua emäsparien avautumista luonnollista ”DNA-hengitystä” (DNA breathing)¹⁰⁰ enempää. Tämä tuki aiemmin tehtyä havaintoa¹⁰¹, että sytosiini-5-metyylitransferaasit toimivat reagoimalla spontaanisti kääntyneiden emäksien kanssa. Toisaalta tutkimuksessa saatu data osoitti, että emäksen kääntyminen ei yksinomaan riippunut sytosiinin sitoutumisesta entsyymin aktiiviseen keskukseen, tutkijat ehdottivat, että entsyymillä on aktiivinen rooli DNA-kaksoiskierteen avaamisessa.

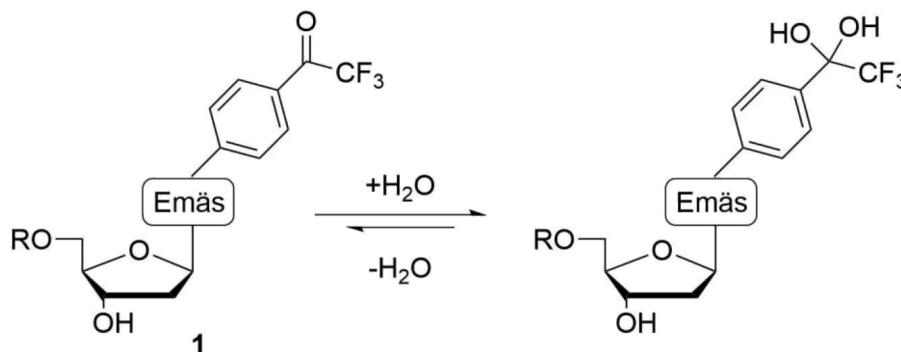
Kealy ja Santi käyttivät 19F -NMR-spektroskopiaan perustuvaa koetinta tRNA(m5U54) -metyylitransferaasin (RUMT) ja sen kohde RNA:n muodostaman kompleksin rakenteen tutkimiseen. Tutkimuksessa käytetty koetin on RNA-substraatin rakenneanalogi, jonka yksi urasiileista oli korvattu 5-fluorourasiililla (Kuva 1, 2). H-F-kytkeytymisvakioita vertailemalla he määrittivät kompleksin stereokemian ja ehdottivat siihen perustuvaa mekanismia RUMT-entsyymin toiminnalle. Heidän esittämänsä stereokemia on yhdensuuntainen aikaisemmin selvitetuille analogisille tymidylaattisyntaasi-¹⁰²⁻¹⁰⁴ ja DNA-sytosiisimetyylitransferaasi-entsyymien⁹⁸ reaktioille. 19F -NMR-spektroskopia on siis myös toimiva työkalu tutkittaessa entsyymireaktioiden stereokemiaa.

Jiang kollegoineen tutki urasiili-DNA-glykosylaasin toimintaa 19F -NMR-spektroskopisesti.³⁵ He käyttivät 2,4-difluorofenyylinukleotidia (Kuva 25, 14) urasiilin tilalla DNA-kaksoiskierteessä ja selvittivät näin urasiilin vetysitoutumisen vaikutusta entsyymien toimintaan. Fluoriatomi vastaa hyvin luonnollisen urasiilin O2 ja O4 eksosyklisen happiatomien van der Waals sädettä, joten se sopii rakenteen stereokemiaan hyvin. Fluori ei kuitenkaan pysty muodostamaan vetysidoksia DNA-kaksoiskierteessä tai entsyymien aktiivisen keskuksen kanssa.



Kuva 25. 2,4-difluorofenylinukleotidin ja uridiinin rakenteet.³⁵

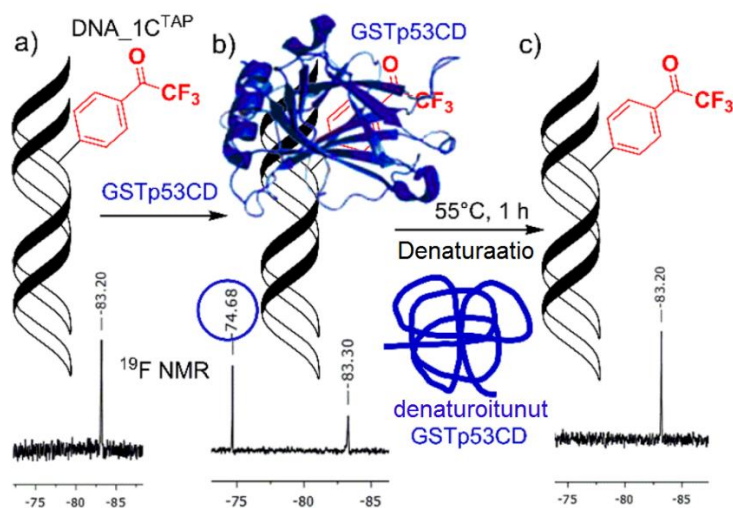
Olszewska kollegoineen tutki trifluoroasetofenoniin (Kaavio 5, **1**) liitettyjen nukleotidien soveltuvuutta DNA-proteiini-vuorovaikutusten tutkimiseen.³ Trifluorometyyliketonit ovat hyvin reaktiivisia nukleofiilisessa additiossa ja niiden on raportoitu reagoivan erityisesti seriinin kanssa. Nämä tulokset toimivat lähtökohtana Olszewskan ja kollegoiden tutkimukselle. He käyttivät leimaryhmänä 2,2,2-trifluoroasetofenonia (TAP). NMR-mittaukset osoittivat, että TAP-muokatut nukleosidit esiintyvät pääosin tai täysin hydraatteina. Tämä havainto tukee aikaisempia havaintoja trifluorometyylisubstituoidun oksoryhmän alttiudesta nukleofiilisille hyökkäyksille.



Kaavio 5 Trifluoroasetofenonin hydraation tasapainon havaittiin suosivan *gem*-diolia.³ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

TAP-tyhmän soveltuvuutta DNA-proteiini-vuorovaikutuksien tutkimiseen testattiin p53-proteiinilla (GSTp53CD, Kaavio 6), joka sisälsi koetinta sitovan kohdan. p53 on kasvainta supressoiva proteiini, joka aktivoituu solun vaurioituessa. Se estää syövän syntymistä indusoimalla solua korjaavia mekanismeja tai ohjelmoitua solukuolemaa.¹⁰⁵ Kun kaksijuosteista koetin-DNA:ta sisältävään liuokseen lisättiin p53-proteiinia havaittiin ¹⁹F-NMR-spektrissä uusi signaali 8,52 ppm yläkentällä vapaan koettimen signaaliin verrattuna. Kun proteiini denaturoitiin inkuboimalla liuosta 55 °C:ssa tunnin ajan havaittiin proteiinin lisäyksessä syntyneen signaaliin katoavan. Negatiivisena

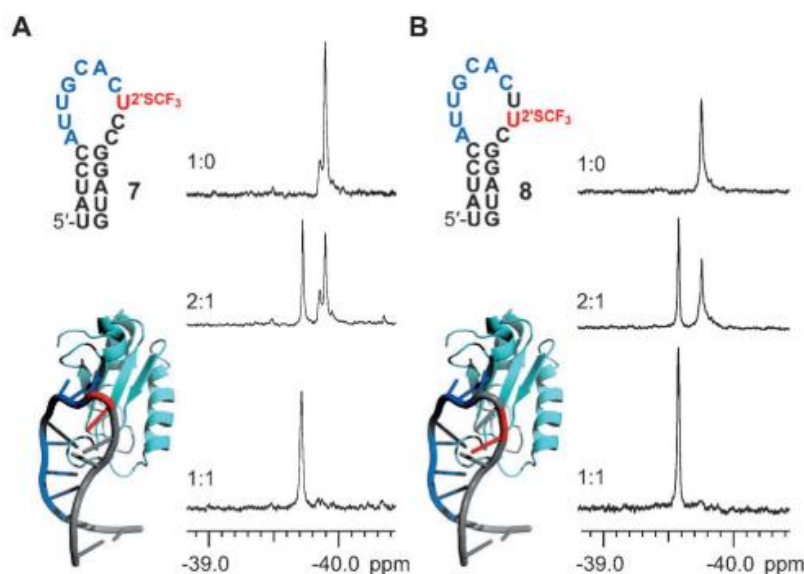
kontrollina käytettiin inkubointia BSA:n (bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini) kanssa, jolloin ei havaittu kemiallisen siirtymän muutosta. Tutkittu koetin siis sitoutuu spesifisesti tiettyyn proteiiniin, ja sitoutuminen voitiin havaita ^{19}F -NMR-spektroskopian avulla. Kemiallisen siirtymän muutos saattaa johtua proteiinin aiheuttamasta CF_3 -ryhmän varjostuksesta ja/tai trifluoroasetofenonin ketoni-hydraattitasapainon muutoksesta proteiinin sitoutuessa koettiin.



Kaavio 6 a) Vapaan kaksoiskierteisen koettimen ^{19}F NMR-spektri. (b) Koettimen ^{19}F NMR-spektri kohdeproteiini p53:n läsnäollessa. (c) Koettimen ^{19}F NMR-spektri denaturaation jälkeen. NMR-olosuhteet: [DNA] 0,5 nM, 2,5 ekv. GSTp53CD.³ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

Fauster ja kollegat käyttivät 2'-SCF₃-leimatua (**20**) oligonukleotidikoetinta RNA:n ja ribonukleoproteiini U1A:n välisten vuorovaikutusten tutkimiseen.⁴⁰ U1A on 282 aminohappoa pitkä riboproteiini, joka osallistuu esilähetti-RNA:n pilkkomiseen (splicing).¹⁰⁶ He valmistivat kaksi hiusneula-RNA-rakennetta, jotka sisälsivät tunnustusalueen U1A:lle. Riboproteiinin RNA:ta sitovan domainin U1A-RBD:n ja kohde-RNA:n muodostaman kompleksin dissosiaatiovakion K_d arvo on 2.0×10^{-11} M. Korkean affiniteetin ja hitaan tasapainon takia kompleksi sopii hyvin ^{19}F -NMR-spektroskooppisen koettimen demonstroimiseen. 2'-SCF₃-ryhmät sijaitsivat lähellä koettimen 10 nukleotidia pitkää silmukkaa, jossa sijaitsi konservoitu sekvenssi AUUGGAC. Hiusneula 7:n ^{19}F -NMR-spektrissä havaittiin signaali -39.90 ppm:n kohdalla sekä sen kyljessä yläkenttään päin pienempi signaali, joka johtunee silmukan ympäristön pienistä konformaatiomuutoksista. Kun liuokseen lisättiin 1 ekvivalentti U1A-RBD:ta, havaittiin vain yksi selkeä signaali -39,70 ppm:n kohdalla. Tämä sopi hyvin ennakkotietoon, jonka mukaan proteiini sitoutuu RNA:han korkealla affiniteetillä. Samanlainen havainto tehtiin

myös oligonukleotidi **8**:n tapauksessa, jossa leima sijaitti kauempana sitoutumiskohdasta. Tästä voitiin todeta, että leiman havainnointikyky ei rajoitu vain yhteen kohtaan koettimessa ja se voi sijaita myös kauempana sitoutumiskohdasta.



Kuva 26 RNA-proteiini-vuorovaikutuksen tutkiminen ^{19}F -NMR-spektroskopisesti. A) (vasemmalla) 2'-SCF₃-leimattu (punaisella) RNA-hiusneula, jossa tunnistussekvenssi proteiinille on merkattu sinisellä. Alla proteiini-RNA-kompleksin malli. (oikealla): RNA ja proteiini seosten (suhteet ilmoitettu kuvassa) ^{19}F -NMR-spektrit. B) Sama kuin (A), mutta leimaryhmä (punainen) on eri kohdassa koetinjuostetta. NMR-olosuhteet: [RNA] = 0,3 mM, [proteiini] = 0,3 mM, [Na₂HPO₄] = 10 mM, pH 6,0, H₂O / D₂O = 9:1, 298 K.⁴⁰ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Wiley luvalla.

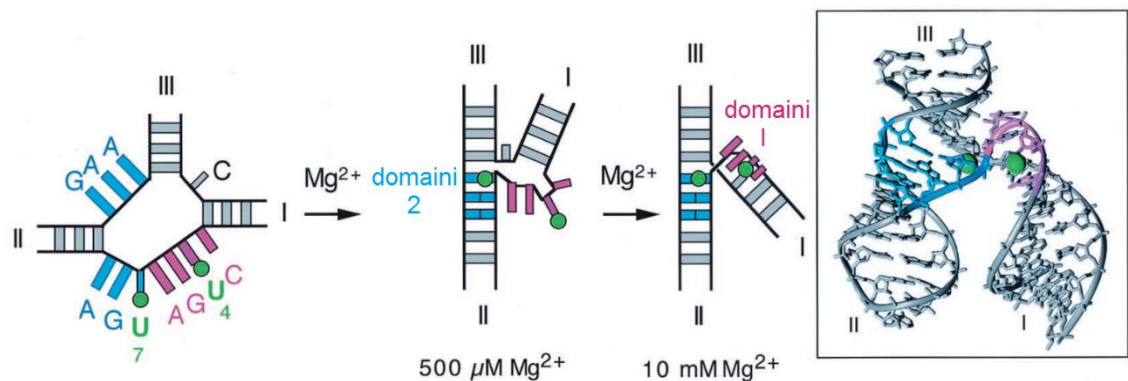
4.6. Hammerhead-ribotsyymi

RNA-välitteinen katalyysi on tärkeä osa monien eliöiden RNA:n muokkausta sekä proteiinisynteesiä. Pystyäkseen katalysoimaan biologisia prosesseja RNA:n on laskostuttava tarkasti tiettyyn kolmiulotteiseen rakenteeseen. Metallioneilla on tärkeä rooli RNA:n laskostumisessa, sillä niiden elektrostaattiset vuorovaikutukset RNA:n kanssa ovat vahvoja johtuen RNA:n polyelektrolyyttisestä luonteesta.¹⁰⁷ Hammerhead-ribotsyymiä on käytetty malliyhdisteenä tutkittaessa RNA:n katyyttistä aktiivisuutta.^{108–110} Se koostuu kolmesta kierteisestä domainista, jotka ovat järjestäytyneet keskustan ympärille kuin kolmihaarainen risteys. Lisäksi sen tarkka kolmiulotteinen laskostunut rakenne on määritetty röntgenkristallografialla, mikä helpottaa rakenteen ja aktiivisuuden välisen yhteyden tutkimista.¹¹¹

Hamman kollegoineen tutki Hammerhead-ribotsyymien laskostumista ^{19}F NMR-spektroskopian avulla. Leimaryhmänä he käyttivät 5-fluorouridiinia (Kuva 1, 2), jolla oli korvattu

tähteen U4 ja U7 nukleotidit (Kuva 27) domainista I domainien I ja II välistä.

Molempien tähteiden signaalien kemiallinen siirtymä ja viivanleveys muuttuivat, kun kohde-RNA:ta titrattiin Mg^{2+} -ioneilla ja näin laskostumista voitiin seurata ^{19}F NMR-spektroskopisesti. U7:n tapauksessa havaittiin kaksi kemiallisen siirtymän muutosta Mg^{2+} -ionien titrauksen edetessä. Ensimmäinen muutos tapahtui $500 \mu M$:n Mg^{2+} -konsentraatiossa ja sen tulkittiin johtuvan RNA:n ketjun laskostumisesta domainiksi II. Toinen muutos tapahtui millimolaarisessa Mg^{2+} -konsentraatiossa. Myös leiman U4 tapauksessa havaittiin sama muutos, joten sen tulkittiin johtuvan domainin I muodostumisesta. Signaalin viivanleveys kasvoi Mg^{2+} -titrauksen edetessä $0-500 \mu M$, minkä jälkeen se pieneni konsentraation lähestyessä $1 mM$:ia. Tästä tutkijat päättelivät laskostumisen tapahtuvan lähellä NMR-aikaskaalaa ja että domainin II muodostuminen tapahtuu millisekuntien aikaskaalassa. Leiman U7 titrauskäyrän toinen siirtymä osoitti, että Mg^{2+} -ionien sitoutuminen oli toisistaan riippumatonta assosiaatiovakion arvolla $100-500 M^{-1}$. ^{19}F -NMR-mittauksissa havaittu Hammerhead-ribotsyymin kaksivaiheinen laskostuminen on havaittu myös muissa tutkimuksissa^{112,113}, joten ^{19}F -NMR-leimatut koettimet sopivat myös RNA:n metalli-ionien indusoiman laskostumisen tutkimiseen.



Kuva 27 Hammerhead ribotsyymin kaksivaiheinen laskostumisprosessi. 2'-O-metyyli-5-fluorouridiinit U4 ja U7 on esitetty rakenteessa vihreinä palloina. Hammerhead-ribotsyymin kiderakenne esitetty laatikossa.¹⁰⁷ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan National Academy of Sciences luvalla.

4.7. Trans-aktiivointivaste-elementti

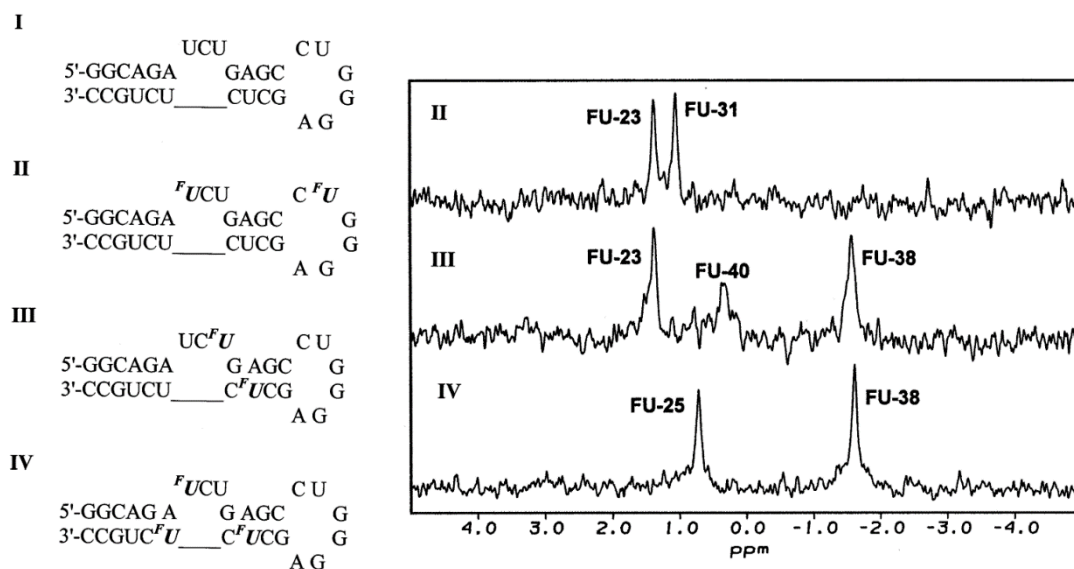
Trans-aktiivointivaste-elementti (trans-activation response element TAR) on tyypin I HI-viruksien genomien $5'$ -päästä löytyvä hiusneularakenne, jolla on tärkeä rooli viruksen genomien transkription aktivoitumisessa. HI-viruksen transkriptiota säätelevä Tat-proteiini sitoutuu TAR-sekvenssiin, minkä vuoksi TAR on ollut lääkekehityksen kannalta mielenkiintoinen kohde.¹¹⁴ ^{19}F NMR-spektroskopiaa on käytetty TAR:n kykyyn sitoa metalli-ioneita¹¹⁵, arginiiniamidia^{115,116} ja vieraita oligonukleotideja^{31,117}. Tat-proteiinin

ja TAR:n välistä vuorovaikutusta on tutkittu kiinteän olomuodon ^{19}F -NMR-spektroskopiolla.^{38,118,119}

Olejniczkat kollegoineen tutkivat TAR:n kykyä sitoa metalli-ioneja käyttämällä 5-fluorouridiinia (Kuva 1, 2) leimäryhmänä. Tutkimusta varten he valmistivat yhden vain luonnollisia nukleoemäksiä sisältävät TAR-mallin, sekä kolme fluorileimattua TAR-sekvenssiä. Näistä yhdessä oli kaksi 5-fluorouridiinia ja kahdessa kolme leimaa (Kuva 28). Huomattavaa oli, että fluorileimauksilla ei käytännössä ollut vaikutusta TAR-sekvenssin sekundäärirakenteeseen ja sen pysyvyyteen. Tätä tutkittiin lyijyn indusoimalla RNA:n hajoamistestillä, jossa havaittiin, että leimaamattoman ja fluorileimattujen sekvenssien hajoamiskuviot olivat samanlaiset. Aikaisemmat tutkimukset^{120,121} FU-A ja FU-G emäsparien pysyvyydestä tukivat tätä havaintoa.

Arginamiinin tiedetään sitoutuvan TAR-sekvenssin pullistumaan, joten Olejniczkat ja kollegat käyttivät sitä vartailuligandina tutkiessaan Mg^{2+} :n, Ca^{2+} :n ja $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$:n sitoutumista TAR:iin. Titrattaessa metalli-ioneja TAR:ia sisältävään liuokseen tutkijat huomasivat, että suurimmat muutokset kemiallisissa siirtymissä olivat pullistuman alueella oleville leimaryhmille assignoiduilla ^{19}F -signaaleilla. Tästä pääteltiin, että myös metalli-ionit sitoutuvat TAR-sekvenssin pullistumaan. Hiuspinnirakenteen silmukassa sijaitsevat fluorileiman kemiallisessa siirtymässä ei havaittu merkittävää muutosta. Titrauskäyristä tutkijat määrittivät TAR-metalli-ioni-kompleksien dissosiaatiovakioiksi $0,9 \pm 0,6$ mM kalsiumionin tapauksessa, ja $2,7 \pm 1,7$ mM magnesiumionin tapauksessa.

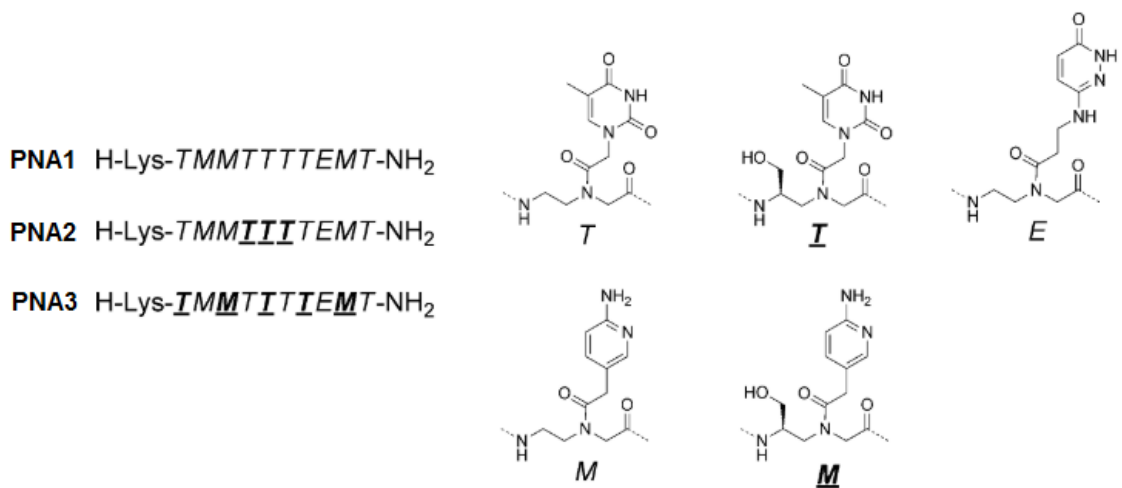
RNA:n katalyyttisen aktiivisuuden ja sekundäärirakenteen kannalta välttämättömän Mg^{2+} -ionien sitoutumisen dissosiaatiovakioiksi on useissa tutkimuksissa mitattu samankaltaisia lukemia^{122,123}. $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ aiheutti RNA:n irreversiibeliä aggregoitumista, kun sitä oli yli viisi ekvivalenttia liuoksessa, joten $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -TAR-kompleksille ei voitu määrittää dissosiaatiovakioita. Aggregoituminen on havaittu myös aikaisemmissa tutkimuksissa¹²⁴.



Kuva 28 Olejniczakin käyttämät HIV-1 TAR mallit sekä 5-fluorouridiini leimattuja malleja (II-IV) vastaavat ^{19}F NMR-spektrit.¹¹⁵ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Oxford University Press luvalla.

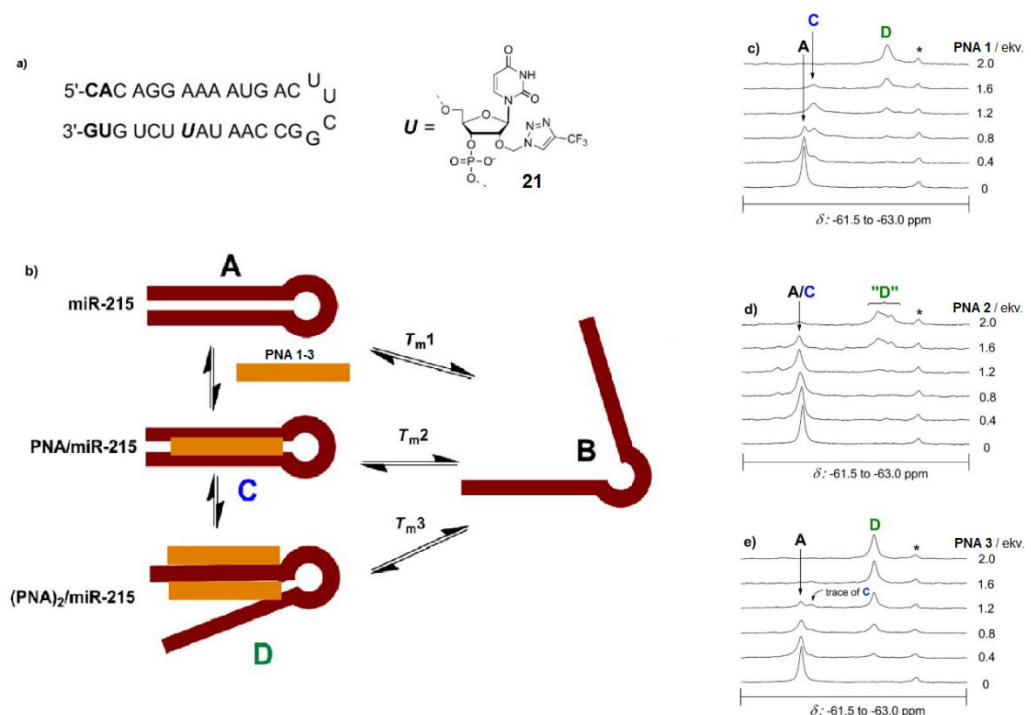
4.8. Peptidinukleiinihappojen ja ribonukleiinihappojen vuorovaikutukset

Peptidinukleiinihapot ovat DNA analogeja, joissa sokerirunko on korvattu aminoetyyliglysiinirungolla. Rakenneyksikköjen väliset sidokset ovat peptidisidoksia fosfodiesterisidoksien sijaan.¹²⁵ Jotkin PNA-sekvenssit voivat sitoutua kaksoiskierteiseen RNA:han ja muodostaa kolmoiskierteisiä rakenteita. Näitä PNA-sekvenssejä sanotaan TFPNA:ksi (Triplex Forming PNA). Tähtinen kollegoineen tutki ^{19}F -NMR-spektroskopisesti PNA-juosteiden sitoutumista RNA:n kaksoiskierteeseen.¹²⁶ Tutkimuksessa he käyttivät 2'-O-[(4- CF_3 -triatsool-1-yyli)1*H*-1,2,3, triatsool-1-yyli)meetyyli-leimattuja (Kuva 30, **21**) kaksoiskierteisiä RNA rakenteita. ^{19}F -NMR-spektroskopian avulla pystyttiin saamaan yksityiskohtaista tietoa PNA/hiusneula-RNA-kompleksien eri sitoutumistilojen stoikiometriasta ja niiden muutoksesta. Lisäksi PNA/RNA ja kolmoiskierteiselle (PNA)₂/RNA-kompleksille voitiin määrittää T_m -arvot. ^{19}F -NMR-mittauksien lisäksi sulamispistemittauksissa käytettiin UV- ja CD-spektroskopiaa. Tutkimuksessa selvitettiin myös γ -(*R*)-hydroksimetyyli-modifikaation vaikutusta PNA:n sitoutumiseen mikro-RNA-malliin miR-215. ^{19}F -NMR-spektroskopisissa mittauksissa selvisi, että γ -(*R*)-hydroksimetyylimodifikaatiot vaikuttivat PNA/RNA ja (PNA)₂/RNA rakenteiden tasapainoon.



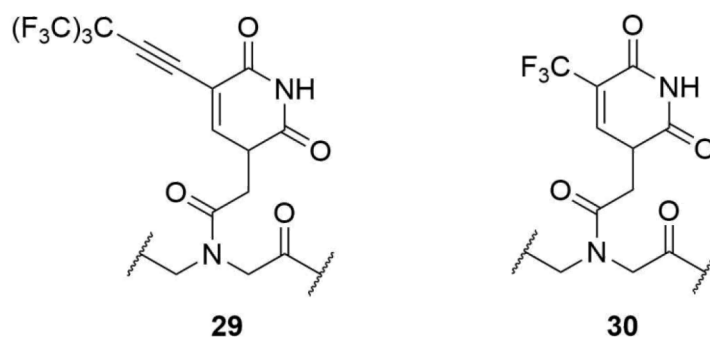
Kuva 29 Tähtinen et al. tutkimuksessa käyttämät PNA-sekvenssit sekä rakenneyksiköiden rakenteet.¹²⁶ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Wiley luvalla.

Kolme peräkkäistä γ -(*R*)-hydroksimetyyli-modifikaatiota sisältänyt suosi sitoutumista stoikimetrinen Hoogsteen-tunnistuksen kautta TFPNA (PNA2). Sen sijaan joka toisesta tähteestä γ -(*R*)-hydroksimetyyli-modifioitu TFPNA (PNA3) muodosti vain ternaarisen (PNA₂)/miR-215-kompleksin. Merkittävää oli, että tätä tietoa ei saatu selvitettyä UV- tai CD-mittauksissa.



Kuva 30 (a) Oligoribonukleotidinukleotidikeottimen (ORN) rakenne. (b) PNA/miR-215 -kompleksien tasapainokaavio. (c)-(e) PNA/miR-215 -kompleksien ¹⁹F-NMR -spektrit titrattaessa PNA 1-3. NMR-olosuhteet: 50 μ M ORN + PNA1-2 (0-2,0 ekv.), 10 mM natriumkakydylaatti, 0,1 M NaCl, pH 7,0, D₂O / H₂O (1:9, v/v), 40 °C.¹²⁶ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Wiley luvalla.

Myös fluorileimattua PNA:ta on käytetty koettimena tutkittaessa PNA ja oligonukleotidien välisiä vuorovaikutuksia. Kiviniemi kollegoineen tutkivat kahden eri leiman soveltuvuutta PNA:n leimaamiseen.¹²⁷ Tutkimuksessa mallikomplekseina käytettiin PNA-RNA/DNA –komplekseja, joissa juosteet olivat joko paralleeliset tai anti-paralleeliset. Jokaiselle tutkitulle kompleksille voitiin assignoida erillinen ¹⁹F-NMR-siirtymä. 5-[3,3-bis(trifluorometyyli)-4,4,4-trifluorobut-1-ynyyli -leiman (Kuva 31, **29**) sisältävän koettimen ¹⁹F-NMR-signaalit olivat kapeammalla alueella kuin 5-(trifluorometyyli) -leiman (Kuva 31, **30**) sisältävän koettimen. Tästä syystä 5-(trifluorometyyli) -leimauksen (**30**) voidaan ajatella sopivan paremmin PNA:n ja oligonukleotidien välisten vuorovaikutusten tutkimiseen. Tästä syystä tutkijat käyttivät sitä myös PNA/PNA- ja kahden PNA/DNA-kompleksin välisen kilpailevan sitoutumisen tutkimisessa. Tätä rakenteiden dynaamista tasapainoa on lähes mahdoton tutkia UV- tai CD-spektroskopiolla, mutta ¹⁹F-NMR-spektroskopiassa mittauksissa tasapainorakenteet voitiin erottaa toisistaan. Verrattuna DNA- ja RNA-koettimiin PNA-koettimien heikkoutena on amidisidoksien rotameerien tasapaino, kun PNA ei ole kompleksoituneena. Tästä syystä PNA-pohjaiset koettimet sopivat kaksois- ja kolmoiskierteisten rakenteiden tutkimiseen.

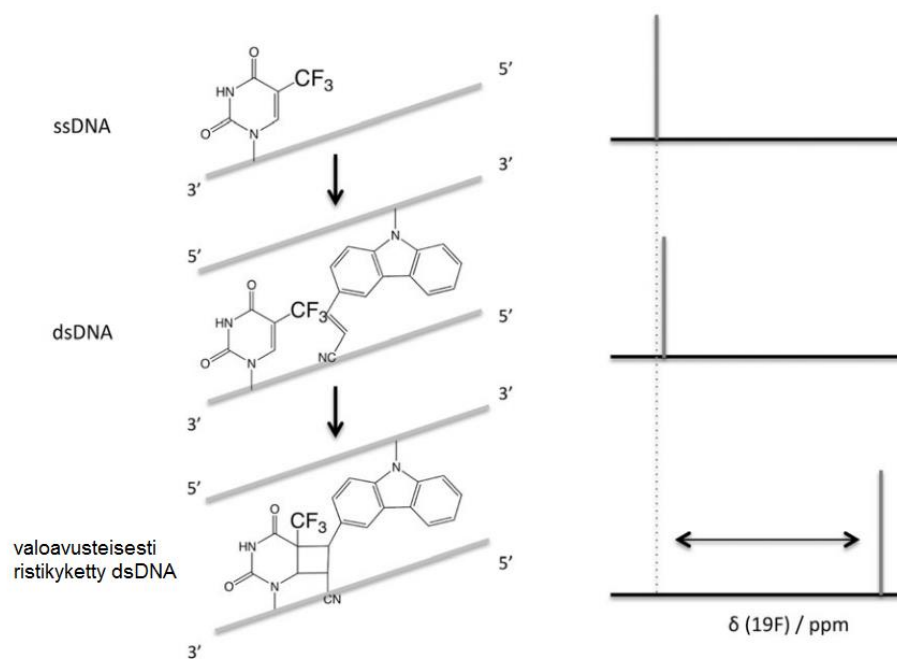


Kuva 31 5-[3,3-bis(trifluorometyyli)-4,4,4-trifluorobut-1-ynyyli- ja 5-(trifluorometyyli)urasiili-johdannaiset PNA-leimaryhmät.¹²⁷

4.9. Hybridisaatiokoettimet

¹⁹F-NMR-spektroskopiaan perustuvilla hybridisaatiokoettimilla voidaan havaita nanomolaarisia konsentraatioita. Nakamura ja Fujimoto käyttivät valoavusteiseen ristikytkentään (photo-cross-linking) perustuvia ¹⁹F-NMR-koettimia miRNA:n sekundäärirakenteiden havaitsemiseen.¹²⁸ Tutkimuksessa he käyttivät leimaryhmänä tymidiiniä, jonka 5-metyyli oli korvattu trifluorometyylillä (**4**). Tätä leimaryhmän vastinemäkseen oli liitetty 3-syanovinylikarbatsoli. Hybridisaation jälkeen tyymiinin 5-6-kaksoissidos ja vastinemäksen syanovinyyli-ryhmä reagoivat valoavusteisesti [2+2]-

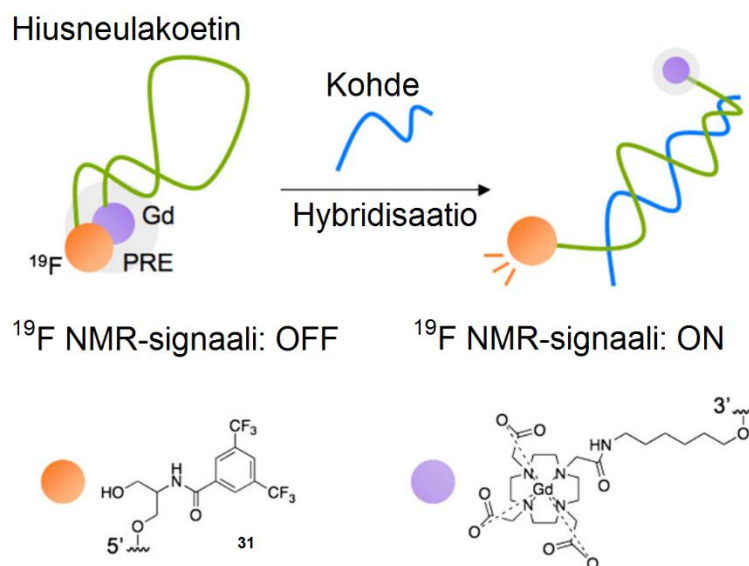
sykloadditiolla muodostaen nelirenkaan.



Kaavio 7 Valoavusteisen ristikutkennän vaikutus fluorin kemialliseen siirtymään.¹²⁸ Kuva on uudelleen julkaistu kustantajan Royal Society of Chemistry luvalla.

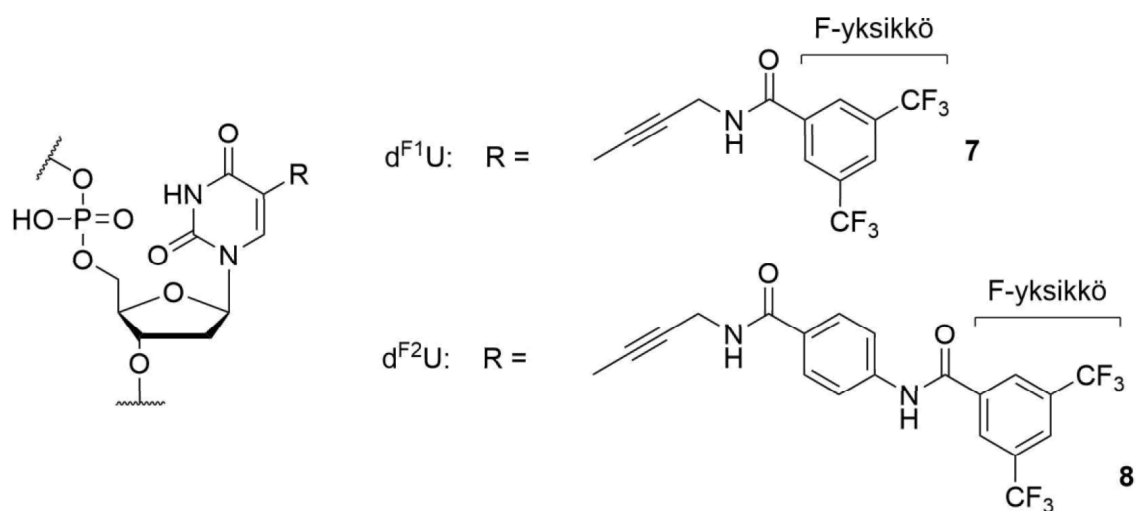
Hybridisaation ja ristikutkeytymisen johdosta koettimen ¹⁹F NMR-signaali muuttui 8 ppm yläkentälle. Näin suuri siirtymän muutos on poikkeuksellisen verrattuna muihin ¹⁹F NMR-oligonukleotidikoettimiin. Tutkijat esittivät, että kemiallisen siirtymän suuri muutos johtui tymidiinin 5-hiilen orbitaalien hybridisaation muuttumisesta sp²-hybridisaatiosta sp³-hybridisaatioon. Koettimella pystyttiin havaitsemaan mallina käytetty miRNA 10 nM:n konsentraatiossa.

Sakamoto kollegoineen tutki paramagneettiseen relaksaation vahvistukseen perustuvaa ¹⁹F-NMR-hybridisaatiokoetinta.¹²⁹ He käyttivät fluorileimana bis(trifluometyyli)bentseeniä (Kaavio 8, **31**), joka oli liitetty koetinjuosteen 5'-päähän. Koettimen 3'-päässä oli Gd-DOTA-kelaatti, joka sammuttaa leimaryhmän ¹⁹F-NMR-signaalin koettimen ollessa hiusneulakonformaatiossa. Kun koettimen sisältämään liukseen lisättiin vastinjuostetta, voitiin ¹⁹F-NMR-spektrissä havaita signaali. Koettimella ei pystytty erottamaan yhden emäspoikkeavuuden sisältävää juostetta täysin komplementaarisesta juosteesta. Koettimella voitiin kuitenkin erotella kohde-DNA:ita niiden emäsjärjestyksen perusteella sillä lisättäessä ei-komplementaarisen sekvenssin sisältävää kohde-DNA:ta NMR-signaalia ei havaittu.



Kaavio 8 Gd-DOTA-kelaatin indusoimaan ^{19}F -NMR-signaalin sammuttamiseen perustuvan hybridisaatiokoettimen toiminta. ¹²⁹ Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Elsevier luvalla.

Hybridisaatiokoettimilla voidaan erotella kaksoiskierteisen DNA:n sekundäärirakenteita, kuten pullistumia ja emäspoikkeavuuksia. Tanabe kollegoineen käytti kahta bis(trifluorometyyli)bentseeni-pohjaista (Kuva 32, 7 ja 8) koetinta erotellakseen täysin komplementaarisen, ei-komplementaarisen ja pullistuman sisältävän DNA-kaksoiskierteen rakenteita.³³ Ensimmäisen koettimen leimaryhmä oli liitetty uridiinin 5-hiileen propargyyliamino-linkkerillä ja toisessa koettimessa leiman ja propargyyli-aminoryhmän väliin oli lisätty aminobentsamido-ryhmä.



Kuva 32 Tanabe et al. tutkimuksessaan käyttämät bis(trifluorometyyli)bentseeni-pohjaiset oligonukleotidikoettimen leimaryhmät.³³

Molemmilla koettimilla pystyttiin erottelemaan yksijuosteinen sekä kaksijuosteiset täysin komplementaariset ja emäspoikkeavuuksia sekä pullistuman sisältävät DNA:t,

mutta vain ^{19}F -NMR:n sisältävällä koettimella kyettiin erottamaan kvantitatiivisesti useampia erilaisia pullistumia ja emäspoikkeavuuksia. Molekyylimallinnuksen perusteella koetinmäksen ^{19}F -NMR:n leimaryhmä on kaksoiskierteen syvässä uurteessa, mutta pidemmästä linkkeristä johtuen koettimen ^{19}F -NMR:n leimaryhmä on lähemmässä vuorovaikutuksessa vastakkeisen juosteen kanssa. Tutkijat ajattelivat tämän olevan syynä sen paremmuuteen sekundäärirakenteiden havaitsemisessa.

5. Yhteenveto

^{19}F -NMR-spektroskopian avulla voidaan tutkia oligonukleotidien sekundäärirakenteiden tasapainoa sekä niiden vuorovaikutusta muiden molekyylien kanssa. Spektrofotometriin menetelmiin, kuten UV-, CD-, ja fluoresenssispektroskopiaan verrattuna NMR-spektroskopia on vähemmän herkkä, mutta sillä voidaan saada yksityiskohtaista tietoa paikallisen tason muutoksista ja samanaikaisesti esiintyvien rakenteiden tasapainosta. ^{19}F -NMR-spektroskopian lisäksi myös ^1H - ja ^{15}N -NMR-spektroskopian avulla voidaan tutkia oligonukleotidien sekundäärirakenteita. Fluorin etuna muihin spinleimoihin verrattuna on fluori-19-isotoopin korkea luonnollinen esiintyminen ja se, että ^{19}F -NMR-spektroskopiaan perustuvilla koettimilla havaitseminen perustuu usein vain yhden signaalin kemiallisen siirtymän muutokseen. Lisäksi taustasignaalien osuus on olematon, mikä on hyödyllistä erityisesti biologisissa näytematriiseissa. Haittapuolena voidaan pitää sitä, että kohdeyhdisteet pitää leimata sopivalla fluorileimalla, joka voi muuttaa liiaksi alkuperäistä luonnollista rakennetta. NMR-spektroskopiolla saatavaa dataa täydennetään usein muilla spektroskopisilla menetelmillä. Fluoresenssi- ja NMR-leimat voivat olla jopa samassa koettimessa, kuten TAP-modifioituissa oligonukleotideissa.

Fluori voidaan liittää joko nukleotidin emäs- tai sokeriosaan. Lisäksi tunnetaan koettimia, joissa fluorileima on liitetty oligonukleotidin 5'-päähän. Emäsmodifikaatioista yleisin on pyrimidiinukleosidien C5-aseman leimaus. Sokerimodifikaatioista yksinkertaisin on riboosin 2'-hydroksyylin korvaaminen fluorilla. Lisäksi 4'-asemaan voidaan liittää fluorattu leimaryhmä. Sokerileimauksien etuna on, että ne voidaan sisällyttää mihin tahansa RNA-juosteen emäkseen. Fluorileima voidaan lisätä koettiin kemiallisesti tai entsyymaattisesti. Kemiallisessa synteesissä etuna on leimauskohdan spesifisyys, mutta entsyymaattisesti voidaan valmistaa pidempiä juosteita.

RNA:n toiminta biologisten prosessien säätelijänä perustuu usein sen kykyyn muodostaa erilaisia sekundäärirakenteita. Yksinkertaisimmillaan, sitä voidaan tutkia käyttämällä 2'-F-leimatun nukleotidin sisältävää koetinta. Tällaisella koettimella ei

kuitenkaan päästä millimolaarisia konsentraatioita alhaisempiin pitoisuuksiin. 5-TAP-leimattua uridiinia sisältävällä koettimella on pystytty erottamaan ^{19}F -NMR-spektroskopisesti yksijuosteinen hiusneula ja kaksoiskierteinen rakenne nanomolaarisessa konsentraatiossa. Kolme magneettisesti ekvivalenttia fluoria sisältävä 2'-SCF₃-leimaryhmä on osoittanut soveltuvaksi myös *in vivo*-mittauksiin. Sitä on käytetty myös tutkittaessa Hammerhead-ribotsyymiä, jota pidetään malliyhdisteenä RNA-välitteisen katalyyysin tutkimuksessa.

Telomeereissä sekä useissa onkogeneenisissa RNA- ja DNA-juosteissa esiintyvät G-kvadrupleksit ovat olleet jo pitkään lääketutkimuksen mielenkiinnon kohteina. Niiden rakennetta ja toimintaa on tutkittu sekä emäsmuokatuilla, että 5'-päästään modifioituilla ^{19}F -NMR-koettimilla. Molemmat leimaustyytit ovat osoittautuneet käyttökelpoisiksi myös *in vivo*-mittauksissa.

Kolmikierteisten nukleiinihapot tarjoavat mielenkiintoisen terapeutin ja diagnostisen sovelluspotentiaalin. ^{19}F -NMR-spektroskopisesti on pystytty havaitsemaan, jopa yhden emäksen ero kolmoiskierteen pyrimidiinirikkaassa juosteessa mikromolaarisessa konsentraatiossa. Myös PNA:n kykyä muodostaa kolmoiskierteitä RNA:n kanssa on tutkittu fluoratuilla koettimilla.

^{19}F -NMR-spektroskopiaan perustuvilla hybridisaatiokoettimilla voidaan havaita oligonukleotideja nanomolaarisissa konsentraatioissa. Niissä hybridisaatioon liittyy myös esimerkiksi fotokemiallinen reaktio, joka kasvattaa kemiallisen siirtymän muutosta, ja näin parantaa koettimen herkkyyttä.

^{19}F -NMR-spektroskopiaan perustuvilla koettimilla on sovelluspotentiaalia erityisesti diagnostisissa sovelluksissa. Useita oligonukleotidien sekundaärirakenteisiin liittyviä ilmiöitä on pystytty tutkimaan *in vivo*, ja fluorileimaan perustuvien koettimien toimivuus on todennettu myös biologisesti merkittävässä pitoisuuksissa. Liittämällä hybridisaatioon muita kemiallisia ilmiöitä, voidaan fluorattujen koettimien herkkyyttä kasvattaa entisestään. Lisäksi lukuisat leimaryhmät mahdollistavat laajan kirjon erilaisia kohdesekvenssejä.

KOKEELLINEN OSA:

Organometallivälitteiseen emäspariutumiseen perustuvan ^{19}F -NMR-koettimen valmistaminen

1. Johdanto

¹⁹F-NMR-spektroskopiaan perustuvia koettimia on käytetty useissa tutkimuksissa oligonukleotidien sekundäärirakenteiden tutkimiseen.² Niillä on mahdollista tutkia sekundäärirakenteiden pienimpiäkin muutoksia ja eri sekundäärirakenteiden moolisuhteita, koska fluorin kemiallinen siirtymä on erittäin herkkä sen kemiallisen ympäristön muutoksiin. ¹⁹F-NMR-spektroskopiaan perustuvia koettimia voisi mahdollisesti soveltaa myös lääketieteellisessä diagnostiikassa, missä sen etuna olisi näytematriisista johtuvat olemattomat häiriösignaalit.⁴³

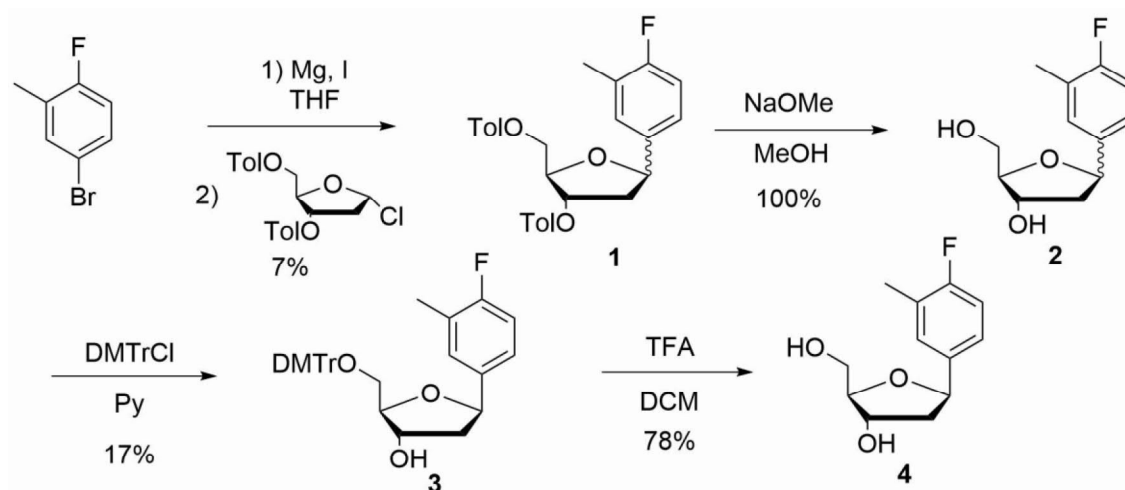
Erikoistyössä valmistettiin fosforamidiittirakenneyksikkö organometallivälitteiseen emäspariutumiseen perustuvan ¹⁹F-NMR-koettimen valmistamiseksi. Työssä valmistettua rakenneyksikköä on tarkoitus myöhemmin käyttää tutkimuksessa 11-meerisen oligonukleotidikoettimen valmistamiseen.

2. Tulokset ja niiden tarkastelu

Työssä valmistettiin kaksi fluorattua C-nukleosidia. Lisäksi tutkittiin nukleosidien merkuroituvuutta, koska nukleosideja on tarkoitus myöhemmin käyttää elohopeavälitteisen emäspariutumisen tutkimiseen.

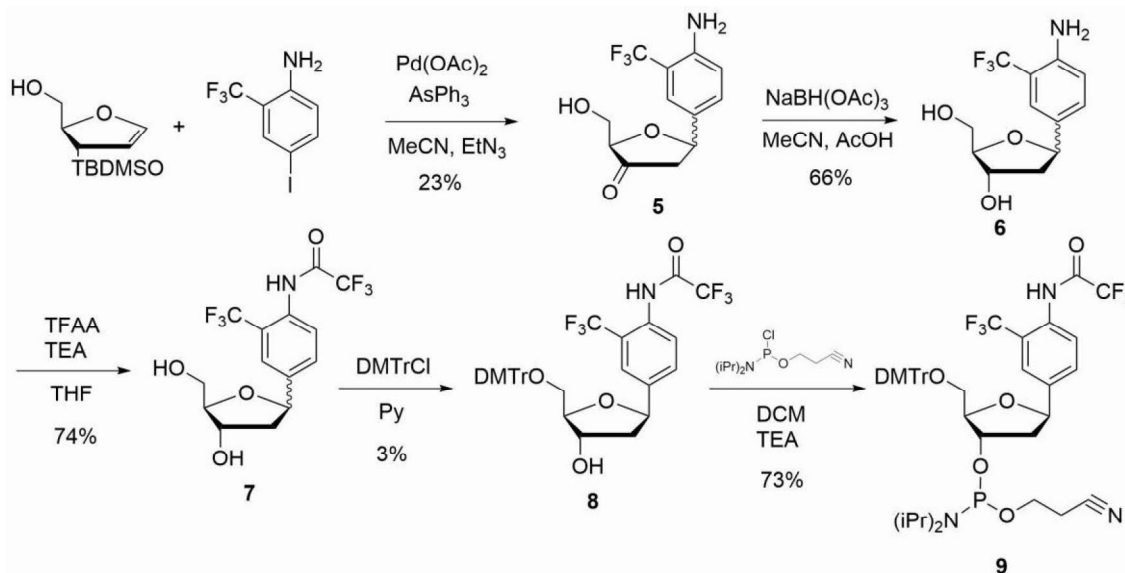
¹⁹F-NMR-spektroskopiaan perustuvina koettimina nukleosidit **4** ja **8** eroavat herkkyydensä puolesta. Nukleosidin **8** trifluorometyyliryhmän kolme fluori atomia tekevät siitä herkemmän ¹⁹F-NMR-koettimen verrattuna nukleosidiin **4**, jossa on vain yksi fluoriatomi.

Nukleosidin **4** valmistukseen käytettiin Grignardin reaktiota, jossa syntyi halutun C-nukleosidin α - ja β -anomeerien seos ($\alpha/\beta = 1:20$). Anomeereja ei saatu tässä vaiheessa erotettua silikagaalikromatografisesti, joten seuraavaan vaiheeseen jatkettiin niiden seoksella. Toluoyylisuojarahmät poistettiin kvantitatiivisesti natriummetoksidilla (**2**). Anomeerien 5'-OH-ryhmät trityloitiin (**3**), minkä jälkeen anomeerit saatiin erotettua toisistaan silikageelikromatografisesti.



Kaavio 9 Nukleosidin **4** valmistus.

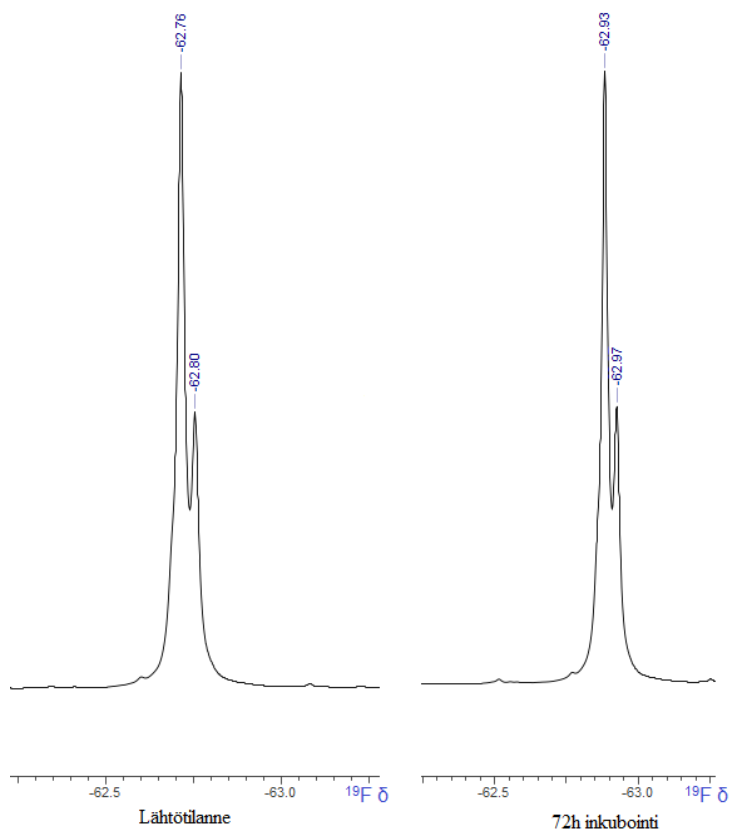
Johtuen nukleosidin **4** valmistuksessa käytetyn Grignardin reaktion huonosta saannosta, päätettiin käyttää Heckin reaktiota nukleosidin **5** C-glykosidisen sidoksen muodostukseen. Reaktiossa saatiin tuotteena α - ja β -anomeerien seos (**5**) ($\alpha/\beta = 1:2$), jolla jatkettiin seuraavaan vaiheeseen, jossa 3'-ketoryhmä pelkistettiin $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$:lla (**6**). Anomeerien erottamiseksi emäsosan NH_2 -ryhmä trifluoroasetyloitiin (**7**) ja 5'-OH-ryhmä trityloitiin (**8**). Nukleosidin **5** valmistuksessa käytetty glykalilähtöaine valmistettiin noudattamalla Minuthin ja Ritchertin raportoimaa valmistustapaa.¹³⁰



Kaavio 10 Nukleosidin **9** valmistus.

Koska valmistettuja nukleosideja on tarkoitus käyttää myöhemmin elohopeavälitteisen emäspariutumisen tutkimiseen, tarkasteltiin työssä myös nukleosidien merkuroituvuutta monomeeritasolla. Elohopean liittymisen osoituksena pidettiin muutosta nukleosidin $^1\text{H-NMR}$ -spektrin emäsosan signaaleissa spektrin

aromaattisella alueella sekä muutoksia ^{19}F -NMR-spektrin kemiallisissa siirtymissä. Nukleosidin **4** merkuraatiota ei saatu käytetyillä olosuhteilla todennettua. Fluori toimii aromaattisessa renkaassa deaktivoivana ryhmänä, mikä tässä tapauksessa aiheuttanee yhdisteen huonon reaktiivisuuden merkuraatiossa. Havainnon pohjalta pääteltiin, että merkuraatioon tarvitaan aktivoiva ryhmä, esimerkiksi NH_2 . Tästä syystä aniliini valittiin toisen työssä valmistetun nukleosidin emäsosan pohjarakenteeksi. Nukleosidin **8** merkuraatio todennettiin sekoittamalla sen anomeerien seosta NMR-putkessa 72h ajan elohopea-asetaatin kanssa vedessä $55\text{ }^\circ\text{C}$:ssa. Inkuboinnin alussa tehdyssä mittauksessa fluorin kemialliset siirtymät olivat 62,80 ppm ja 62,76 ppm. Inkuboinnin jälkeen mitatussa spektrissä kemialliset siirtymät olivat 62,93 ppm ja 62,97 ppm. Tästä voitiin päätellä, että elohopea oli kiinnittynyt aromaattiseen renkaaseen.



Kuva 33 Nukleosidin **8** merkuraation aiheuttama muutos ^{19}F -spektriin. Vasemmalla lähtötilanne ja oikealla tilanne 72 tunnin inkuboinnin jälkeen. Spektreissä näkyvissä molempien anomeerien signaalit.

3. Kokeelliset menetelmät

3.1 Yleiset menetelmät

Työssä käytetyt liuottimet kuivattiin 3 Å:n molekyyliseuloilla. Trietyyliamiini tislattiin ja kuivattiin kalsiumhydridillä. Kaupalliset lähtöaineet käytettiin sellaisenaan. Anomeerien puhdistukseen käytetty silikageeli kuivattiin vakuumieksikaattorissa fosforipentoksidilla. Tuotteiden karakterisointiin käytetyt NMR-spektrit mitattiin Bruker Avance-III 500 MHz ja 600 MHz -laitteilla. Massaspektrit mitattiin Bruker ESI-microTOF-Q -laitteistolla.

3.2 Synteetit

3.2.1 6-fluoro-3-[3,5-*O*-bis(toluoyyli)-2-deoksi- α/β -D-erythro-pentofuranosyyli]-tolueeni (1)

50 ml keittopulloon laitettiin 1,2 ekv. magnesiumlastuja (0,45 g, 19 mmol) ja 0,12 ekv. jodijauhetta (0,25 g, 1,8 mmol). Seosta sekoitettiin 45 °C:ssa 1h, jonka jälkeen keittopulloon lisättiin 1 ekv. 5-bromo-2-fluorotolueenia (2,0 ml, 15 mmol) liuotettuna 5 ml:aan kuivaa THF:a. Liuosta sekoitettiin 55 °C:ssa 1h, kunnes kiinteä magnesium oli lähes kokonaan hävinnyt liuoksesta. Sekoitusta jatkettiin ja liuoksen annettiin jäähtyä hlt:aan, minkä jälkeen lisättiin 0,74 ekv. 3',5'-di-*O*-(*p*-toluoyyli)-2-deoksi-D-ribofuranosyylikloridia (3,1 g, 11 mmol) liuotettuna 30 ml:aan kuivaa THF:a. Reaktio lopetettiin yön yli sekoituksen jälkeen kaatamalla reaktioliuos 10% NH₄Cl-liuokseen (75 ml). Vesifaasia uutettiin DCM:lla (3 x 30 ml). Orgaanista faasia pestiin kyll. NaHCO₃:lla (30 ml) ja kyll. NaCl:lla (30 ml) ja se kuivattiin Na₂SO₄:lla. Kuivausaine suodatettiin pois liuoksesta ja liuottimet haihdutettiin vakuumissa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttämällä eluenttina heksaanin ja etyyliasetaatin seosta (8:2, v/v). Puhdistettuna tuotteena saatiin α - ja β -anomeerien seosta (1:20) **1** 0,48 g (7%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,01 (d, *J* = 8,2 Hz, 2 H), 7,76 – 7,80 (m, 2 H), 7,20 – 7,33 (m, 8 H), 6,99 – 7,04 (m, 1 H), 5,33 (dd, *J* = 7,0 Hz, 1 H), 4,71 – 4,77 (m, 1 H), 4,56 – 4,66 (m, 2 H), 2,90 – 3,01 (m, 1 H), 2,43 (d, *J* = 3,6 Hz, 6 H), 2,31 – 2,35 (m, 1 H), 2,29 – 2,31 (s, 3 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm 166,39, 161,69, 159,75, 144,07, 137,82, 129,78, 129,74, 129,67, 129,24, 129,19, 129,10, 128,89, 127,14, 124,83, 114,93, 82,22, 79,82, 76,88, 64,59, 40,41, 21,67, 14,63 ; ES⁺-MS *m/z*: 485,1470 [M+Na]⁺, laskettu: 485,1735

3.2.2 6-fluoro-3-[2-deoksi- α/β -D-erythro-pentofuranosyyli]tolueeni (2)

Yhdiste **1** (0,48 mg, 1,0 mmol) liuotettiin 25 ml keittopullossa 10 ml:aan metanolia ja joukkoon lisättiin 40 mg natriummetoksidia. Reaktioliuosta sekoitettiin hlt:ssa 2h ja reaktion etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (Heksaani:EtOAc, 6:4, v/v). Reaktio haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttämällä eluenttina heksaanin ja etyyliasetaatin seosta (6:4, v/v). Puhdistettua tuotetta **2** saatiin 0,24 g (100%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,19 – 7,24 (m, 1 H), 7,13 – 7,19 (m, 1 H), 6,99 (dd, $J = 9,0$ Hz, 1 H), 5,02 (dd, $J = 8,5$ Hz, 1 H), 4,44 (dd, $J = 6,1$ Hz, 1 H), 4,03 – 4,09 (m, 1 H), 3,77 – 3,85 (m, 1 H), 3,70 – 3,77 (m, 1 H), 2,61 – 2,66 (m, 1 H), 2,26 – 2,32 (s, 3 H), 1,95 – 2,07 (m, 1 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm 161,74, 159,80, 137,83, 128,90, 124,99, 124,85, 115,02, 85,28, 79,10, 72,93, 62,55, 43,52

3.2.3 6-fluoro-3-[5-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)-2-deoksi- α/β -D-erythro-pentofuranosyyli]tolueeni (3)

Yhdiste **2** (0,24 mg, 1,0 mmol) ja haihdutettiin kahdesti kuiviin kuivasta pyridiinistä. Tämän jälkeen se liuotettiin 10 ml:aan kuivattua pyridiiniä ja liuokseen lisättiin tipoitain 1,2 ekv. 4,4'-dimetoksitriptyylikloridia (0,42 g, 1,2 mmol) liuotettuna 5 ml:aan kuivaa pyridiiniä. Reaktioon annettiin edetä sekoituksessa hlt:ssa ja sen etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (DCM:EtOAc:TEA, 99:1:0,2, v/v/v). Neljän tunnin sekoituksen jälkeen reaktioseos laimennettiin 40 ml:lla DCM:a. Orgaanista faasia pestiin kyll. NaHCO_3 :lla (3 x 20 ml) ja se kuivattiin Na_2SO_4 :lla. Kuivausaine suodatettiin pois liuoksesta ja liuottimet haihdutettiin vakuumissa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttämällä eluenttina DCM:n ja etyyliasetaatin seosta, (99:1, v/v, 0,2% TEA). Tuotteena saatiin 97 mg (17 %) puhdasta β -anomeeria **3**. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,47 – 7,52 (m, 2 H), 7,38 – 7,39 (m, 2 H), 7,17 – 7,33 (m, 6 H), 6,98 (dd, $J = 8,4$ Hz, 1 H), 6,83 – 6,88 (m, 5 H), 5,05 (dd, $J = 7,5$ Hz, 1 H), 4,45 (dd, $J = 13,1, 5,49$ Hz, 1 H), 4,19 (dd, $J = 8,4, 5,0$ Hz, 1 H), 3,80 (s, 6 H), 3,37 (q, $J = 4,9$ Hz, 1 H), 3,26 (q, $J = 5,8$ Hz, 1 H), 2,60 – 2,72 (m, 1 H), 2,06 (s, 3 H), 1,96 – 2,04 (m, 1 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm 161,74, 159,80, 144,89, 138,30, 136,05, 130,10, 129,84, 129,17, 129,05, 128,18, 127,88, 125,89, 124,66, 114,91, 113,19, 86,35, 84,64, 79,35, 74,99, 62,55, 55,21, 43,29, 30,87; ES^+ -MS m/z: 551,2072 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, laskettu: 551,2204

3.2.4 6-fluoro-3-[2-deoksi-β-D-erythro-pentofuranosyyli]tolueeni (4)

Yhdiste **3** (97 mg, 0,18 mmol) liuotettiin 4 ml:aan DCM:a ja liuokseen lisättiin 100 µl TFA:a. Reaktioon annettiin edetä sekoituksessa hlt:ssa ja sen etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (DCM:EtOAc:TEA, 95:5:0,2, v/v/v). Neljän tunnin sekoituksen jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin 30 ml:aan DCM:a. Liuosta pestiin kyll. NaHCO₃:lla (3 x 15 ml) ja se kuivattiin Na₂SO₄:lla. Kuivausaine suodatettiin pois liuoksesta ja liuottimet haihdutettiin vakuumissa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttämällä eluenttina DCM:n ja metanolin seosta (95:5, v/v, 0,2% TEA). Puhdistettua tuotetta **4** saatiin 32 mg (78%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,19 – 7,24 (m, 1 H), 7,13 – 7,19 (m, 1 H), 6,99 (dd, *J* = 9,0 Hz, 1 H), 5,02 (dd, *J* = 8,5 Hz, 1 H), 4,44 (dd, *J* = 6,1 Hz, 1 H), 4,03 – 4,09 (m, 1 H), 3,77 – 3,85 (m, 1 H), 3,70 – 3,77 (m, 1 H), 2,61 – 2,66 (m, 1 H), 2,26 – 2,32 (s, 3 H), 1,95 – 2,07 (m, 1 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm 161,74, 159,80, 137,83, 128,90, 124,99, 124,85, 115,02, 85,28, 79,10, 72,93, 62,55, 43,52

3.2.5 6-trifluorometyyli-4-[3-okso-2-deoksi- α/β-D-erythro-pentofuranosyyli]aniliini (5)

0,15 ekv. Pd(OAc)₂ (0,12 g, 1,6 mmol) ja 0,45 ekv. AsPh₃ laitettiin pystyjäähdyttimellä varustettuun kolviin. Kolviin lisättiin 10 ml kuivaa asetonitriliä, jonka läpi oli kuplitettu argonia. Liuosta sekoitettiin hlt:ssa argon-ilmakehässä 30 min. Liuokseen lisättiin 1 ekv. 4-jodi-2-(trifluorometyyli)aniliinia (1,0 g, 3,5 mmol) ja 1,1 ekv. 3-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-1,2-didehydro-1,2-dideoksi-D-ribofuranosia (0,88 g, 3,8 mmol) sekä 1,7 ekv. TEA:a (0,83 ml, 5,9 mmol). Reaktioliuosta sekoitettiin 70 °C:ssa argon-ilmakehässä 30 h ja reaktion etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (Heksaani:EtOAc, 6:4, v/v). Reaktioseos haihdutettiin kuiviin ja puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttämällä eluenttina heksaanin ja etyyliasetaatin seosta (7:3, v/v). Puhdistettuna tuotteena saatiin α- ja β-anomeerien seosta (1:2) **5** 0,30 g (23%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,50 (d, *J* = 1,7 Hz, 1 H), 7,39 (dd, *J* = 8,5, 1,7 Hz, 1 H), 6,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 1 H), 5,48 (dd, *J* = 7,0 Hz, H1' α) 5,15 (dd, *J* = 5,3 Hz, 1 H, H1' β), 4,03 (dd, *J* = 3,2 Hz, 1 H), 3,95 – 3,98 (m, 2 H), 2,83 – 2,88 (m, 1 H), 2,51 - 2,59 (m, 1 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm 144,23, 131,00, 129,66, 125,08, 117,51, 82,38, 80,50, 61,50, 44,95; ES⁻-MS *m/z*: 274,0757 [M-H]⁻, laskettu: 274,0697

3.2.6 6-trifluorometyyli-4-[2-deoksi- α/β -D-erythro-pentofuranosyyli]aniliini (6)

Yhdiste **5** (0,30 g, 1,1 mmol) laitettiin keittokolviin ja liuotettiin 10 ml etikkahapon ja sekä 5 ml asetonitriilin seokseen. Reaktioseosta sekoitettiin jäähauteessa 30 min ja reaktion etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (Heksaani:EtOAc, 6:4, v/v). Reaktio lopetettiin lisäämällä 2 ml metanolia, minkä jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttämällä eluenttina DCM:n ja metanolin seosta (95:5, v/v). Puhdistettua tuotetta **6** saatiin 0,20 mg (66%). ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ ppm 7,40 (d, J = 1,8 Hz, 1 H), 7,33 (dd, J = 9,9, 1,8 Hz, 1 H), 6,81 (d, J = 8,6 Hz, 1 H), 5,01 (dd, J = 5,3 Hz, 1 H, H1' β), 4,96 (dd, J = 8,6, 6,6 Hz, 1 H, H1' α), 4,31 – 4,34 (m, 1 H), 3,89 – 3,94 (m, 1 H), 3,36 – 3,68 (m, 1 H), 2,10 – 2,16 (m, 1 H), 1,93 – 1,99 (m, 1 H); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ ppm 144,23, 130,98, 130,08, 124,67, 117,36, 113,69, 113,45, 87,21, 79,53, 73,62, 63,30, 43,44; ES⁻-MS m/z: 276,0842 [M-H]⁻, laskettu: 276,0853

3.2.7 6-trifluorometyyli-4-[2-deoksi- α/β -D-erythro-pentofuranosyyli]-N-trifluoroasetyylianiliini (7)

Yhdiste **6** (0,20 g, 0,72 mmol) liuotettiin 5 ml kuivaa THF:a ja liuos jäähdytettiin 0 °C:een ja sitä kuplitettiin argonilla. Liuokseen lisättiin 1 ekv TEA:a (100 μ l, 0,72 mmol) ja muutamassa erässä TFAA:a (150 μ l, 1,1 mmol). Reaktion annettiin edetä hlt:ssa 16 h ja sen etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (EtOAc:MeOH, 95:5, v/v). Lähtöaineen loppumisen jälkeen liuokseen lisättiin 2 ml MeOH:a ja sekoitusta jatkettiin vielä 1h, jonka jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttämällä eluenttina heksaanin ja etyyliasetaatin seosta (7:3, v/v). Puhdistettua tuotetta **7** saatiin 0,20 g (74%). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ ppm 7,85 (d, J = 0,9 Hz, 1 H), 7,75 (dd, J = 8,9, 0,7 Hz, 1 H), 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 5,22 (dd, J = 4,7 Hz, 1 H), 4,34 – 4,38 (m, 1 H), 3,98 – 4,03 (m, 1 H), 3,71 (d, J = 4,9 Hz, 2 H), 2,27 – 2,34 (m, 1 H), 1,91 – 2,00 (m, 1 H) ES⁻-MS m/z: 372,0695 [M-H]⁻, laskettu: 372,0676

3.2.8 6-trifluorometyyli-4-[5-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)2-deoksi- β -D-erythro-pentofuranosyyli]-N-trifluoroasetyylianiliini **8**

Yhdiste **7** (1 ekv., 0,20 mg, 0,53 mmol) ja haihdutettiin kahdesti kuiviin kuivasta pyridiinistä. Tämän jälkeen se liuotettiin 10 ml:aan kuivattua pyridiiniä ja liuokseen lisättiin tipoitain 1,2 ekv. 4,4'-dimetoksitriptyylikloridia (0,21 g, 0,62 mmol) liuotettuna 5 ml:aan kuivaa pyridiiniä. Reaktion annettiin edetä sekoituksessa hlt:ssa ja sen etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (DCM:EtOAc:TEA, 99:1:0,2, v/v/v).

Vuorokauden sekoituksen jälkeen reaktioseokseen lisättiin 0,3 ekv. dimetroksitriptylikloridia (53 mg, 0,16 mmol) ja sekoitusta jatkettiin vielä 16 h. Reaktio lopetettiin laimentamalla DCM:lla. Orgaanista faasia pestiin kyll. NaHCO₃:lla (3 x 20 ml) ja se kuivattiin Na₂SO₄:lla. Kuivausaine suodatettiin pois liuoksesta ja liuottimet haihdutettiin vakuuissa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttämällä eluenttina DCM:n ja metanolin seosta (95:5, v/v, 0,2% TEA). Puhdistettuna tuotteena saatiin 10 mg (3%) puhdasta β-anomeeria **8**. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,76 (d, *J* = 1,1 Hz, 1 H), 7,61 (dd, *J* = 9,0, 1,7 Hz, 1 H), 7,44 – 7,48 (m, 2 H), 7,33 – 7,37 (m, 4 H), 7,29 – 7,32 (m, 2 H), 7,19 – 7,25 (m, 2 H), 6,83 – 6,86 (m, 4 H), 5,21 (dd, *J* = 4,3 Hz, 1 H), 4,44 – 4,49 (m, 1 H), 4,10 – 4,14 (m, 1 H), 3,79 (s, 6H), 3,35 (qd, *J* = 10,7, 4,6 Hz, 2 H), 2,29 – 2,36 (m, 1 H), 2,00 – 2,06 (m, 1 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm 158,56, 144,70, 141,32, 135,85, 130,65, 130,04, 129,97, 129,14, 128,11, 127,87, 127,77, 126,88, 124,77, 113,16, 112,99, 86,68, 78,78, 74,53, 64,18, 55,22, 43,93; ES⁻ MS *m/z*: 674,1968 [M-H]⁻, laskettu: 674,1982

3.2.9 6-trifluorometyyli-4-{3-*O*[-(2-syanoetoksi)(*N,N*-di-isopropyyliamino)-fosfinyyli]5-*O*-(4,4'-dimetoksitriptyli)-2-deoksi-β-*D*-erythro-pentofuranosyyli]-*N*-trifluoro-asetyylianiiliini (**9**)

Yhdiste **8** (1 ekv., 10 mg, 0,014 mmol) laitettiin liekitettyyn kolviin ja liuotettiin 1 ml kuivaan DCM:iin, Reaktioliuokseen lisättiin 1,35 ekv. 2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyyliklorofosforamidiittia (4,3 μl, 0,019 mmol) ja 3,7 ekv. TEA:a (4,3 μl, 0,07 mmol). Reaktioliuosta sekoitettiin argon-ilmakehässä hlt:ssa 3h, minkä jälkeen se applikoitiin sellaisenaan silikageelipatsaan päälle ja puhdistettiin kromatografisesti käyttäen eluenttina DCM:n ja metanolin seosta, (95:5, v/v, 0,2% TEA). Puhdistettua tuotetta **9** saatiin 9 mg (73%). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,66 (d, *J* = 1,0 Hz, 1 H), 7,45 – 7,47 (m, 1 H), 7,33 – 7,37 (m, 3 H), 7,27 – 7,31 (m, 5 H), 7,18 – 7,21 (m, 1 H), 6,81 – 6,87 (m, 5 H), 5,20 – 5,25 (m, 1 H), 4,51 – 4,58 (m, 1 H), 4,26 – 4,30 (m, 1 H), 3,82 – 3,83 (m, 2 H), 3,80 – 3,82 (m, 6 H), 3,32 – 3,43 (m, 1 H), 3,24 – 3,30 (m, 1 H), 2,65 – 2,68 (m, 2 H), 2,48 – 2,53 (m, 1 H), 2,35 – 2,43 (m, 1 H), 1,20 – 1,22 (m, 12 H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ ppm 158,67, 144,86, 139,33, 135,82, 130,76, 129,92, 129,17, 128,29, 127,79, 127,16, 124,65, 113,73, 113,23, 86,11, 79,08, 78,57, 63,77, 59,25, 58,24, 55,11, 43,06, 24,75, 24,35, 20,08; ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ ppm 148,19, 148,12; ES⁻ MS *m/z*: 874,3035 [M-H]⁻, laskettu: 874,3061

3.3.1 2-fluoro-5-[2-deoksi- α/β -D-erythro-pentofuranosyyli]tolueenin merkurointi

Yhdiste **4** (1 ekv. 32 mg, 0,13 mmol) liuotettiin veteen mikrosentrifugiputkessa ja liuokseen lisättiin 5 ekv. elohopea-asetaattia (0,20 g, 0,65 mmol). Reaktioseosta inkuboitii 55 °C:ssa 72h. Reaktioseos laimennettiin ionivaihdetulla vedellä, joukkoon lisättiin 0,50 g NaCl:a ja sekoitusta jatkettiin yön yli hlt:ssa. Reaktioseokseen oli muodostunut yön aikana valkoista sakkaa, joka suodatettiin ja sitä pestiin kylmällä 0,1 M NaCl:lla, etanolilla, vedellä sekä eetterillä. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ ppm 7,24 – 7,29 (m, 1 H), 7,17 – 7,22 (m, 1 H), 7,07 (t, $J = 9,3$ Hz, 1 H), 4,99 – 5,04 (m, 1 H), 4,87 – 4,92 (m, 1 H), 4,66 – 4,71 (m, 1 H), 4,14 – 4,24 (m, 2 H), 3,80 – 3,85 (m, 1 H), 2,62 – 2,67 (m, 1 H), 2,34 – 2,39 (m, 1 H), 2,18 – 2,28 (m, 2 H)

3.3.2 6-trifluorometyyli-4-[2-deoksi- α/β -D-erythro-pentofuranosyyli]aniliinin merkurointi

Yhdiste **6** (20 mg, 0,072 mmol) liuotettiin D₂O-vesi-seokseen NMR-putkessa ja liuokseen lisättiin Hg(OAc)₂ (23 mg, 0,072 mmol). Liuosta inkuboitii 55 °C:ssa 72 h, minkä jälkeen havaittiin muutos ¹⁹F-NMR-spektrissä. Lähtötilanne: ¹⁹F NMR (565 MHz, D₂O-H₂O) δ ppm -62,93, -62,97. Tilanne 72h inkuboinnin jälkeen: ¹⁹F NMR (565 MHz, D₂O-H₂O) δ ppm -62,76, -62,80

4. Yhteenveto

Työssä onnistuttiin valmistamaan kaksi kaksi fluorattua C-nukleosidia. Molempien nukleosidien synteesireittien kokonaissaanto oli < 1%. Nukleosidin **4** merkuraatiota ei saatu todennettua monomeeritasolla. Nukleosidin **8** merkuraatio todennettiin monomeeritasolla ja siitä valmistetulla fosforamidiittirakenneyksikköä on tarkoitus käyttää myöhemmin elohopevälitteisen emäspariutumisen tutkimiseen.

Viitteet

- (1) Cobb, S. L., Murphy, C. D. *J. Fluor. Chem.* **2009**, *130* (2), 132–143.
- (2) Granqvist, L., Virta, P. *J. Org. Chem.* **2014**, *80*, 7961–7970.
- (3) Olszewska, A., Pohl, R., Hocek, M. **2017**, 11431–11439.
- (4) Gillis, E. P., Eastman, K. J., Hill, M. D., Donnelly, D. J., Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (21), 8315–8359.
- (5) Gerig, J. T. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, *26* (PART 4), 293–370.
- (6) Granqvist, L., Virta, P. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (8), 3529–3536.
- (7) Mergny, J. L.; Lacroix, L. *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537.

- (8) Gray, D. M.; Hung, S. H.; Johnson, K. H. *Methods Enzym.* **1995**, *246*, 19–34.
- (9) Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčiuk, D.; Vorlíčková, M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713–1725.
- (10) Yang, M.; Ghosh, S.; Millar, D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 15329–15337.
- (11)) Darby, R. a. J.; Sollogoub, M.; McKeen, C.; Brown, L.; Risitano, A.; Brown, N. . B.,C.; Brown, T.; Fox, K. R. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e39.
- (12) Bhuma, N.,Tähtinen, V.,Virta, P. *European J. Org. Chem.* **2018**, No. 5, 605–613.
- (13) Tähtinen, V.,Granqvist, L.,Virta, P. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23* (15), 4472–4480.
- (14) Riedl, J.,Pohl, R.,Rulišek, L.,Hocek, M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (2), 1026–1044.
- (15) F., R.,C., E.,Lu, P. *Methods Enzym.* **1995**, *261*, 560–575.
- (16) Nikonowicz, E. P.,Michnicka, M.,Kalurachchi, K.,DeJong, E. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (7), 1390–1396.
- (17) Tanaka, Y.,Ono, A. *Dalt. Trans.* **2008**, No. 37, 4965–4974.
- (18) Fürtig, B.,Richter, C.,Wöhnert, J.,Schwalbe, H. *ChemBioChem* **2003**, *4* (10), 936–962.
- (19) Fauster, K.,Kreutz, C.,Micura, R. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (52), 13080–13084.
- (20) Höbartner, C.; Micura, R. *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 421–431.
- (21) Luy, B. .,Marino, J. P. *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*, 39–47.
- (22) Hennig, M.,Scott, L. G.,Sperling, E.,Bermel, W.,Williamson, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (48), 14911–14921.
- (23) Chu, W.,Horowitz, J. **1989**, *17* (18), 7241–7252.
- (24) Scott, L. G.,Geierstanger, B. H.,Williamson, J. R.,Hennig, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (38), 11776–11777.
- (25) Paredes, E.,Evans, M.,Das, S. R. *Methods* **2011**, *54* (2), 251–259.
- (26) Roy, S.,Caruthers, M. *Molecules* **2013**, *18* (11), 14268–14284.
- (27) Luyten, I.,Herdewijn, P. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33* (7–8), 515–576.
- (28) Puffer, B.,Kreutz, C.,Rieder, U.,Ebert, M. O.,Konrat, R.,Micura, R. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (22), 7728–7740.
- (29) Markley, J. C.,Chirakul, P.,Sologub, D.,Sigurdsson, S. T. **2001**, *11*, 2453–2455.
- (30) Barhate, N. B.,Barhate, R. N.,Cekan, P.,Drobny, G.,Sigurdsson, S. T. **2008**, No. 9, 2007–2009.
- (31) Kiviniemi, A.,Virta, P. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (8), 1559–1566.
- (32) Ishizuka, T.,Yamashita, A.,Asada, Y.,Xu, Y. *ACS Omega* **2017**, *2* (12), 8843–

8848.

- (33) Tanabe, K., Tsuda, T., Ito, T., Nishimoto, S. I. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (45), 15133–15140.
- (34) Graber, D., Moroder, H., Micura, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (51), 17230–17231.
- (35) Jiang, Y. L., McDowell, L. M., Poliks, B., Studelska, D. R., Cao, C., Potter, G. S., Schaefer, J., Song, F., Stivers, J. T. **2004**, 15429–15438.
- (36) Peng, X., Li, H., Seela, F. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (20), 5987–6000.
- (37) Kreutz, C., Kählig, H., Konrat, R., Micura, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (33), 11558–11559.
- (38) Olsen, G. L., Edwards, T. E., Deka, P., Varani, G., Sigurdsson, S. T., Drobny, G. P. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (11), 3447–3454.
- (39) Schwarz, V., Košutić, M., Bister, K., Kreutz, C., Micura, R., Jud, L., Hartl, M. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10400–10407.
- (40) Fauster, K., Kreutz, C., Micura, R. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51* (52), 13080–13084.
- (41) Košutić, M., Jud, L., Da Veiga, C., Frener, M., Fauster, K., Kreutz, C., Ennifar, E., Micura, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (18), 6656–6663.
- (42) Nishizono, N., Sumita, Y., Ueno, Y., Matsuda, A. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26* (22), 5067–5072.
- (43) Bao, H. L., Ishizuka, T., Sakamoto, T., Fujimoto, K., Uechi, T., Kenmochi, N., Xu, Y. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (9), 5501–5511.
- (44) Sakamoto, T., Hayakawa, H., Fujimoto, K. *Chem. Lett.* **2011**, *40* (7), 720–721.
- (45) Mandal, M.; Breaker, R. R. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 451–463.
- (46) Serganov, A.; Yuan, Y. R.; Pikovskaya, O.; Polonskaia, A.; Malinina, L.; Phan, A. T.; Höbartner, C.; Micura, R.; Breaker, R. R.; Patel, D. *J. Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1729–1741.
- (47) Höbartner, C.; Ebert, M.-O.; Jaun, B.; Micura, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 605–609.
- (48) Höbartner, C.; Micura, R. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 984–990.
- (49) Xu, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2719–2740.
- (50) Collie, G. W., Parkinson, G. N. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5867–5892.
- (51) Balk, B., Maicher, A., Dees, M., Klermund, J., Luke-Glaser, S., Bender, K., Luke, B. *Net. Struct. Mol. Biol* **2013**, *20*, 1199–1205.
- (52) Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A., Shaw, P.G., Kim, M.S.,

- Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R. *Nature* **2014**, *507*, 195–200.
- (53) Wolfe, A.L., Singh, K., Zhong, Y., Drewe, P., Rajasekhar, V.K., Sanghvi, V.R., Mavrikakis, K.J., Jiang, M., Roderick, J.E., Van der Meulen, J. *Nature* **2014**, *513*, 65–70.
- (54) Martadinata, H. and Phan, A. . *Biochemistry* **2013**, *52*, 2176–2183.
- (55) Collie, G.W., Parkinson, G.N., Neidle, S., Rosu, F., De Pauw, E. and Gabelica, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9328–9334.
- (56) Russo Krauss, I.; Merlino, A.; Randazzo, A.; Novellino, E.; Mazzarella, L.; Sica, F. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 8119–8128.
- (57) Palmer, A. G. *3rd Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **2001**, *30*, 129–155.
- (58) Selenko, P.; Wagner, G. *J. Struct. Biol.* **2007**, *158*, 244–253.
- (59) Ishizuka, T., Zhao, P. Y., Bao, H. L., Xu, Y. *Analyst* **2017**, *142* (21), 4083–4088.
- (60) E. Luchinat, L. B. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 3776–3784.
- (61) G. F. Salgado, C. Cazenave, A. Kerkour, J. L. M. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3317–3320.
- (62) R. Hänsel, S. Foldynová-Trantírková, F. Löhr, J. Buck, E. Bongartz, E. Bamberg, H. Schwalbe, V. Dötsch, L. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15791–15769.
- (63) Z. Serber, P. Selenko, R. Hänsel, S. Reckel, F. Löhr, J. E. Ferrell, Jr., G. Wagner, V. D. *Nat. Proc.* **2006**, *1*, 2701–2709.
- (64) P. Selenko, Z. Serber, B. Gadea, J. Ruderman, G. W. *PNAS* **2006**, *103*, 11904–11909.
- (65) Z. Serber, A. T. Keatinge-Clay, R. Ledwidge, A. E. Kelly, S. M. Miller, V. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2446–2447.
- (66) S. Nagatoishi, T. Nojima, E. Galezowska, B. Juskowiak, S. T. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1730.
- (67) S. Nagatoishi, T. Nojima, B. Juskowiak, S. T. *Angew. Chem* **2005**, *117*, 5195.
- (68) J. M. Wilcox, D. L. Rempel, M. L. G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2365.
- (69) Meuwis, K., Boens, N., De Schryver, F. C., Gallay, J., Vincent, M. *Biophys. J.* **1995**, *68* (6), 2469–2473.
- (70) Szmackinski, H., Lakowicz, J. R. *Sensors Actuators, B Chem.* **1999**, *60* (1), 8–18.
- (71) Sun, J. S., Hélène, C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3* (3), 345–356.
- (72) Duca, M., Vekhoff, P., Oussedik, K., Halby, L., Arimondo, P. B. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (16), 5123–5138.
- (73) Felsenfeld, G., Davies, D.R. Rich, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2023.
- (74) Watanabe, K. A., Fox, J. J. **1975**, *42*, 233–240.

- (75) Jain, A., Wang, G., Vasquez, K. M. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1117–1130.
- (76) Seidman, M. M., Glazer, P. M. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112* (4), 487–494.
- (77) Plum, G. E. *Biopolymers* **1997**, *44* (3), 241–256.
- (78) Sojfer, V. N.; Potaman, V. N. *Triple Helical Nucleic Acids*; Springer-Verlag: New York, 1996.
- (79) Hoyne, P. R.; Gacy, A. M.; McMurray, C. T.; Maher, L. J. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 770–775.
- (80) Radhakrishnan, I., Patel, D. J. *Biochemistry* **1994**, *33* (38), 11405–11416.
- (81) Phipps, A. K., Tarköy, M., Schultze, P., Feigon, J. *Biochemistry* **1998**, *37* (17), 5820–5830.
- (82) Feigon, J.; Koshlap, K. M.; Smith, F. W. *Methods Enzym.* **1995**, *261*, 225.
- (83) Tanabe, K., Sugiura, M., Nishimoto, S. I. *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18* (18), 6690–6694.
- (84) Manzini, G.; Yathindra, N.; Xodo, L. E. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4634.
- (85) Seela, F.; Budow, S.; Leonard, P. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1858.
- (86) Kan, Y.; Schuster, G. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11607.
- (87) Arya, D. P. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (2), 134–146.
- (88) Garst, A. D., Edwards, A. L., Batey, R. T. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3* (6), 1–13.
- (89) Santner, T., Rieder, U., Kreutz, C., Micura, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (29), 11928–11931.
- (90) Eichhorn, C. D.; Kang, M.; Feigon, J. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* **2014**, *1839*, 939–950.
- (91) Jiang, L., Patel, D. J. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 769–774.
- (92) Li, L., Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (7), 2858–2865.
- (93) Jud, L., Košutić, M., Schwarz, V., Hartl, M., Kreutz, C., Bister, K., Micura, R. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10400–10407.
- (94) A. Roth, W. C. Winkler, E. E. Regulska, B. W. K. Lee, J. Lim, I. Jona, I. Jona, J. E. Barrick, A. Ritwik, J. N. Kim, R. Welz, D. Iwata-Reuyl, R. R. B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 308–317.
- (95) J. L. Jenkins, J. Krucinska, R. M. McCarty, V. Bandarian, J. E. W. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 24626–24637.
- (96) Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Mi, S., P., J., Roberts, R. J., Wilson, G. G. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1–10.
- (97) Anderson, J. E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 24–30.

- (98) Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., Cheng, X. *Cell* **1994**, 76, 357–369.
- (99) Klimašauskas, S., Szyperski, T., Serva, S., Wu, K. *EMBO J.* **1998**, 17 (1), 317–324.
- (100) Guéron, M., Leroy, J. L. *Methods Enzymol.* **1995**, 261 (C), 383–413.
- (101) Wu, J. C., Santi, D. V. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262 (10), 4778–4786.
- (102) James, T. L., Pogolotti, A. L., Ivanetich, K. M., Wataya, Y., Lam, S. M., Santi, D. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, 72, 404–410.
- (103) Matthews, D. A., Appelt, K., Oatley, S. J., Xuong, N. H. *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 923–936.
- (104) Montfort, W. R., Perry, K. M., Fauman, E. B., Finer-Moore, J. S., Maley, G. F., Hardy, L., Maley, F., Stroud, R. M. *Biochemistry* **1990**, 29, 6964–6976.
- (105) Bourdon, J.-C., Surget, S., Khoury, M. P. *Onco. Targets. Ther.* **2013**, 57.
- (106) Lührmann, R., Kastner, B., Bach, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1087**, 265–292.
- (107) Hammann, C., Norman, D. G., Lilley, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98 (10), 5503–5508.
- (108) Epstein, L. M., Gall, J. G. *Cell* **1987**, 48 (3), 535–543.
- (109) Haseloff, J., Gerlach, W. L. *Nature* **1988**, 334 (6183), 585–591.
- (110) Pedersen, K. M. **1997**, 49, 211–220.
- (111) Pley, H. W., Flaherty, K. M., McKay, D. B. *Nature* **1994**, 372 (6501), 68–74.
- (112) Klug, A., Scott, W. G., Stoddard, B. L., Murray, J. B., Arnold, J. R. P. *Science* (80-). **2002**, 274 (5295), 2065–2069.
- (113) Murray, J. B., Terwey, D. P., Maloney, L., Karpeisky, A., Usman, N., Beigelman, L., Scott, W. G. *Cell* **1998**, 92 (5), 665–673.
- (114) Karn, J., Stoltzfus, C. M. **2012**, 1–17.
- (115) Olejniczak, M. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30 (19), 4241–4249.
- (116) Scott, L. G., Hennig, M. *19F-Site-Specific-Labeled Nucleotides for Nucleic Acid Structural Analysis by NMR*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2016; Vol. 566.
- (117) Kiviniemi, A., Virta, P. **2010**, No. ii, 8560–8562.
- (118) Huang, W., Varani, G., Drobny, G. P. *J. Biomol. NMR* **2011**, 51 (3), 347–356.
- (119) Huang, W., Varani, G., Drobny, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (50), 17643–17645.
- (120) Sahasrabudhe, P. V., Pon, R. T., Gmeiner, W. H. *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 3916–3921.
- (121) Sahasrabudhe, P. V., Gmeiner, W. H. *Biochemistry* **1997**, 36, 5981–5991.
- (122) Misra, V. K., Draper, D. E. *Biopolymers* **1998**, 48, 113–135.
- (123) Colmenarejo, G., Tinoco, I. *J. Mol. Biol.* **1999**, 290, 119–135.

- (124) Butcher, S. E., Allain, F. H. T., Feigon, J. *Biochemistry* **2000**, *39*, 2174–2182.
- (125) Nielsen, P. E. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7* (4), 786–804.
- (126) Tähtinen, V., Granqvist, L., Murtola, M., Strömberg, R., Virta, P. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (29), 7113–7124.
- (127) Kiviniemi, A., Murtola, M., Ingman, P., Virta, P. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (11), 5153–5159.
- (128) Nakamura, S., Fujimoto, K. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (59), 11765–11768.
- (129) Sakamoto, T., Shimizu, Y. K., Sasaki, J., Hayakawa, H., Fujimoto, K. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (1), 303–306.
- (130) Minuth, M., Richert, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 10874–10877.