

# **Tionukleotidien ja niiden johdosten hydrolyyttinen pysyvyys**

**Pro Gradu-tutkielma**

**Niko Lehtinen**

**Kemian laitos**

**Turun yliopisto**

**Toukokuu 2021**

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

# Tiivistelmä

TURUN YLIOPISTO

Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta, Kemian laitos, Bio-orgaaninen tutkimusryhmä

NIKO LEHTINEN: Tionukleotidien ja niiden johdosten hydrolyyttinen pysyvyys

Pro Gradu -tutkielma, 49 s.

Toukokuu 2021

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

---

Nukleotidit ja oligonukleotidit ovat orgaanisia molekyylejä, jotka ovat pitkien nukleiinihappoketjujen, kuten DNA:n ja RNA:n, rakenneyksiköitä. Niillä on elintärkeä merkitys kehossa esimerkiksi aineenvaihdunnassa, proteiinisynteesissä sekä energian siirrossa ja varastoinnissa. Nukleotidit liittyvät läheisesti kaikkiin RNA-riippuvaisiin prosesseihin kehossa, ja sitä kautta solun geeniekspressioon ja sen proteiinisynteesin säätelyyn. Tionukleotidit ovat laaja käsite erilaisia nukleotidien analogeja, joissa rikki on korvannut molekyylissä vähintään yhden hapen. Rikkisubstituutio vaikuttaa molekyylissä mm. lisäten sen entsymaattista stabiilisuutta, ja tioyhdisteillä on tärkeä rooli entsymologiassa. Luonnolliset oligonukleotidit hajoavat elimistössä nopeasti nukleasien vaikutuksesta.

Työn tarkoituksena oli suorittaa kahden nukleosiditriposfaatin, ATP:n ja GTP:n, sekä niiden rikkianalogien (ATP $\gamma$ S ja GTP $\gamma$ S) hydrolyysireaktiot erilaisissa pH- sekä lämpötilaolosuhteissa ja tutkia reaktioiden etenemistä. Tutkittujen yhdisteiden ja niiden rikkianalogien hydrolyysireaktioita seurattiin ottamalla niistä näytteitä tietyin väliajoin. Otetut näytteet analysoitiin ja reaktiotuotteet tunnistettiin kapillaari-elektroforeesilla (CE), joka erottaa yhdisteet perustuen varattujen hiukkasten erilaiseen etenemisnopeuteen ohuessa kapillaarissa. Hydrolyysireaktioille laskettiin nopeusvakiot, jotta saatiin tietoa tutkituista yhdisteistä ja niiden reaktiivisuudesta eri olosuhteissa. Tionukleotidien reaktiot todettiin nopeammiksi kuin luonnollisten nukleotidien, erityisesti happamissa olosuhteissa.

AVAINSANAT: tionukleotidi, hydrolyysi, kinetiikka, ATP, GTP

# Sisällysluettelo

<b>1. Johdanto</b> .....	<b>1</b>
1.1. Nukleotidit ja niiden tehtävät elimistössä .....	1
1.2. Tionukleotidit ja niiden johdannaiset tutkimuksessa .....	6
1.2.1. Fosforotioaatti- ja fosforotiolaattioligonukleotidit.....	8
1.2.2. Tionukleotidit .....	13
1.3. Tionukleotidien kemiallinen reaktiivisuus.....	15
1.4. Tutkielman tavoitteet .....	18
<b>2. Kokeellinen osa</b> .....	<b>20</b>
2.1. Reaktioiden suorittaminen.....	20
2.2. Liuokset ja lähtöaineet .....	23
2.3. Käytetyt laitteistot ja ajo-ohjelmat.....	23
2.4. Seleenianalogien pysyvyys .....	24
<b>3. Tulokset ja niiden tarkastelu</b> .....	<b>26</b>
3.1. Reaktioiden nopeusvakiot.....	26
3.2. ATP- ja ATP $\gamma$ S-tulokset.....	27
3.3. GTP- ja GTP $\gamma$ S-tulokset.....	36
3.4. Seleenianalogin hydrolyysin tulokset .....	41
<b>4. Johtopäätökset</b> .....	<b>44</b>
<b>Lähdeluettelo</b> .....	<b>45</b>

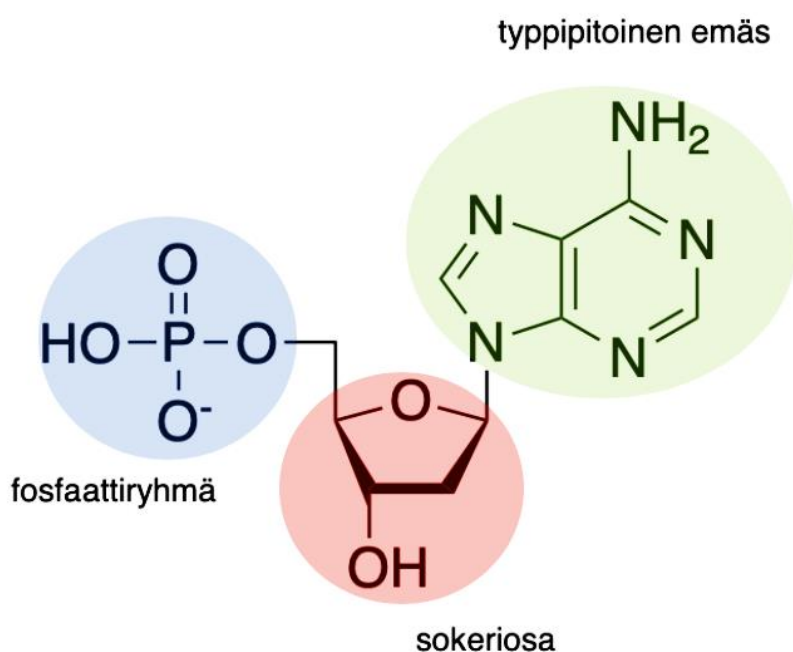
## Lyhenneluettelo

ADP	adenosine diphosphate adenosiinidifosfaatti
AMP	adenosine monophosphate adenosiinimonofosfaatti
ATP	adenosine triphosphate adenosiinitrifosfaatti
CE	capillary electrophoresis kapillaarielektroforeesi
cAMP	cyclic adenosine monophosphate syklinen adenosiinimonofosfaatti
GDP	guanosine diphosphate guanosiinidifosfaatti
GMP	guanosine monophosphate guanosiinimonofosfaatti
GTP	guanosine triphosphate guanosiinitrifosfaatti
ATP $\gamma$ S	adenosine 5'-( $\gamma$ -thio)triphosphate adenosiini-5'-( $\gamma$ -tio)trifosfaatti
GTP $\gamma$ S	guanosine 5'-( $\gamma$ -thio)triphosphate guanosiini-5'-( $\gamma$ -tio)trifosfaatti
PS	phosphorothioate fosforotioaatti
PSL	phosphorothiolate fosforotiolaatti
PSe	fosforoselenaatti phosphoroselenaate

# 1. Johdanto

## 1.1. Nukleotidit ja niiden tehtävät elimistössä

Nukleotideiksi kutsutaan orgaanisia molekyyliä, jotka koostuvat nukleosidiosasta ja vähintään yhdestä siihen liittyneestä fosfaattiryhmästä. Nukleosidiosa koostuu typpipitoisesta emäksestä sekä viiden hiiliatomin sokeriosasta. Nukleotidiin liittyneiden fosfaattiryhmien määrän perusteella nukleotidia voidaan kutsua joko mono-, di- tai trifosfaatiksi. Kuvassa 1 on havainnollistettu nukleotidin rakennetta.

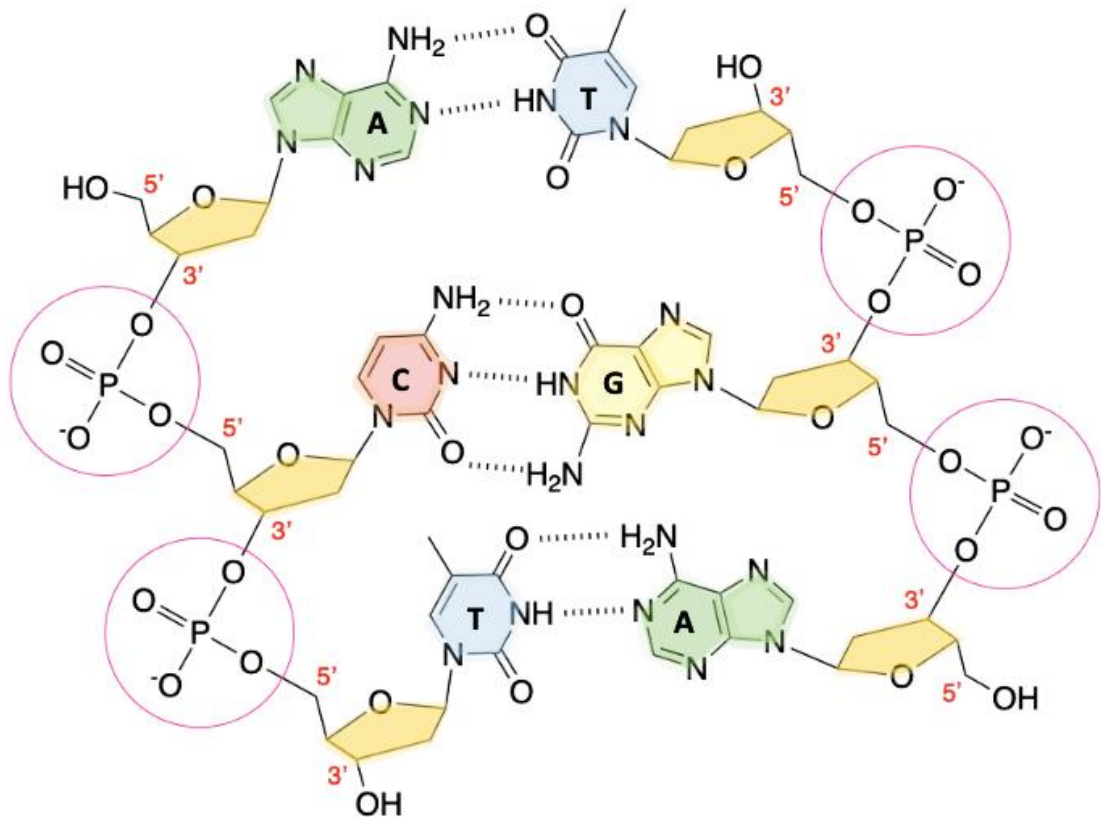


**Kuva 1.** Nukleotidin (monofosfaatti) rakenne.

Nukleotidien emäsosana voi toimia joko puriini- tai pyrimidiiniemäs: DNA:ssa emäs on joko adeniini, tyymiini, guaniini tai sytosiini, RNA:ssa sen sijaan urasiili korvaa tyymiinin. RNA:ssa (ribonukleiinihappo) sokeriosa on riboosi, DNA:ssa (deoksiribonukleiinihappo) sen sijaan deoksiriboosi.

Nukleotidit ovat pitkien nukleiinihappoketjujen, kuten DNA:n ja RNA:n, rakenneyksiköitä (ns. *building blocks*). Fosfaattiryhmien tehtävä on yhdistää nukleosideja fosfodiesterisidoksella pitkiksi ketjuiksi siten, että fosfaattiryhmästä lähtee kaksi esterisidosta, toinen ensimmäisen nukleosidin sokeriosan 3'-hiilen ja toinen vastaavasti

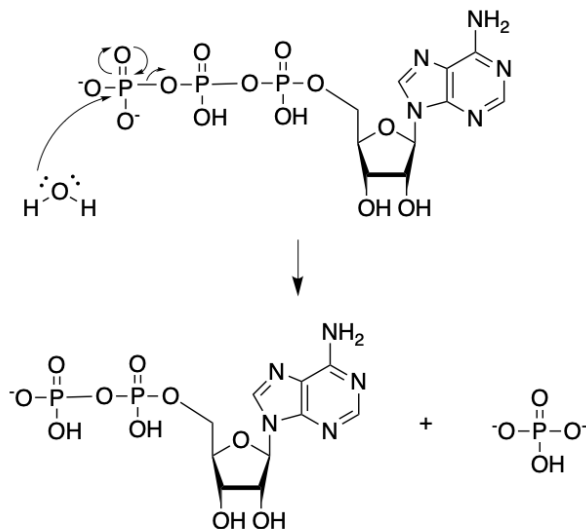
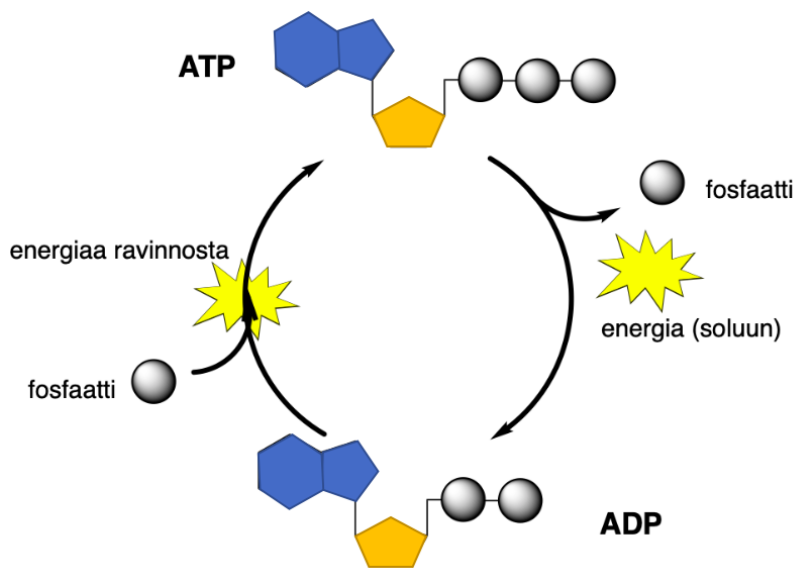
jälkimmäisen nukleosidin sokeriosan 5'-hiileen. Kuvassa 2 on esitetty nukleosidien yhdistyminen fosfodiesterisidoksilla DNA-ketjuksi.



**Kuva 2.** DNA-ketjun muodostuminen nukleoseideista, emäsparien välille on merkitty katkoviivalla vetysidokset. Ympyröidyt sidokset ovat fosfodiesterisidoksia. A = adeniini, T = tyymiini, C = sytosiini, G = guaniini

Nukleotidien merkitys kehossa on huomattavaa esimerkiksi aineenvaihdunnassa sekä energian siirrossa ja varastoinnissa. Ne toimivat solun energiavälittäjinä trifosfaattien muodossa (erityisesti ATP, adenosiinitrifosfaatti) sekä muissa tärkeissä energiaan liittyvissä prosesseissa. Jotkin entsyymien toiminnan kannalta välttämättömät, niihin sitoutuneet orgaaniset molekyylit eli kofaktorit tarvitsevat nukleotideja entsyymaattiseen toiminnan ylläpitämiseen. Lisäksi nukleotideilla on korvaamaton rooli proteiinisynteesissä, entsyymaattisissa reaktioissa ja solujen välisessä materian siirrossa. Proteiinisynteesi on elintärkeä prosessi solujen ja elinten oikeanlaisen toiminnan kannalta. Nukleotidien keskeinen rooli solun toiminnan kannalta tekee niistä hyvin mielenkiintoisia tutkimuksen kohteita.

Solun energiansiirrossa ja -varastoinnissa ATP ja sen hydrolyysireaktiot adenosinitrifosfaasi-entsyymien (ATPaasi) toimesta ovat keskeisessä roolissa ja ne ovatkin välttämättömiä monille solun prosesseille. ATP:n hydrolyysi ADP:ksi (adenosiinidifosfaatti) sekä epäorgaaniseksi fosfaatiksi on energiaa vapauttava prosessi, jonka tuottamaa energiaa hyödyntää moni muu solun toiminto (kuva 3). ADP voi edelleen hajota epäorgaaniseksi fosfaatiksi ja AMP:ksi (adenosiinimonofosfaatti). Suuri energiamäärä on varastoituneena fosfaattiryhmien välisiin fosfoanhydridisidoksiin. Esimerkiksi energia, joka tarvitaan lihaksen supistumista varten, on peräisin MgATP:n hydrolyysin kemiallisesta energiasta, joka muuntuu lihaksen mekaaniseksi energiaksi<sup>1</sup>. ATPaasit ovat kehon entsyymejä, joiden tehtävänä on katalysoida ATP:n hydrolyysireaktiota. Ravinnosta saatu glukoosi hajotetaan ATP-kierrossa energiaksi, ja ATPaasit ohjaavat fosfaattisidoksista vapautuvan energian soluihin ja elimiin kemiallisia reaktioita varten<sup>2,3</sup>. ATPaasit sitovat myös energiaa päinvastaisessa reaktiossa takaisin ATP:ksi. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPaasi on entsyymi, joka ATP:stä saatavan energian avulla, Na<sup>+</sup>- ja K<sup>+</sup>-ioneja konsentraatiogradienttia vastaan pumppaamalla säätelee solukalvon potentiaalia sekä osmoottista tasapainoa<sup>4</sup>.



**Kuva 3.** Yllä ATP-ADP-energiakierron pääpiirteinen toiminta kehossa (kuva mukailtu lähteestä<sup>5</sup>, viitattu 24.02.2020), ja alla vastaavasti ATP:n hydrolyysin reaktiomekanismi kehossa ADP:ksi sekä epäorgaaniseksi fosfaatiksi.

Tietyt sykliset nukleotidit kuten syklinen AMP (cAMP) toimivat osana solujen välisten signaalien välittämistä, ja cAMP saa tarvittavan energian signaalien välittämiseen ATP:n tuottaman energian avulla. cAMP:llä on myös muita tärkeitä rooleja kehossa, kuten ionikanavien toiminnan ylläpitäminen<sup>2</sup>.

Nukleotidit liittyvät myös hyvin läheisesti RNA-kemiaan. Yksi RNA:n tärkeimmistä rooleista kehossa on DNA:n tuottaman geneettisen koodin kääntäminen proteiineja varten, ja sitä kautta solun geeniekspression ja sen proteiinisynteesin sääteleminen. RNA osallistuu lähes kaikkiin solujen biologisiin prosesseihin. Tärkeimmät RNA:n tyypit ovat mRNA (*messenger-RNA*), tRNA (*transfer-RNA*), ja rRNA (*ribosomal-RNA*).



Proteiinisynteesissä mRNA välittää geneettisen koodin DNA:lta ribosomeihin, jotka katalysoivat proteiinisynteesiä. Ribosomit koostuvat proteiineista ja rRNA:sta, jonka päätehtävänä on avustaa ja ohjata proteiinisynteesiä. tRNA:ksi kutsutaan alle 100:sta nukleotidista koostuvia molekyyliä, jotka proteiinitranslaation aikana kuljettavat spesifisiä mRNA:n sekvenssiä vastaavia aminohappoja ribosomeihin, jossa ne yhdistyvät kasvavaan polypeptidiketjuun. mRNA:n kannalta myös fosfaatin hydrolyysillä on tärkeä merkitys. *Decapping* eli fosfoanhydridisidoksen katkeaminen mRNA:n 5'-cap-rakenteessa on tärkeässä asemassa mRNA:n stabiilisuuden kannalta<sup>6</sup>.

Elimistössä on paljon erilaisia RNA:ta hyödyntäviä mekanismeja, jotka toimivat esimerkiksi geenien säätelyssä estämällä geenien translaatiota tai proteiinien tuotantoa, kuten esimerkiksi miRNA (*microRNA*), jolla on tutkittu olevan vaikutusta monien sairauksien kuten syövän kehittymiseen. Lisäksi miRNA-säätelyn häiriöillä on todettu olevan yhteys esimerkiksi Alzheimerin tautiin<sup>7</sup>. RNA:lla on siksi keskeinen, nykyaikana paljon tutkittu ja vielä osittain tuntematon rooli syöpä- ja joidenkin muiden sairauksien esiintymiseen, kuten esimerkiksi miRNA:n kyky säädellä syöpään liittyviä geenejä.

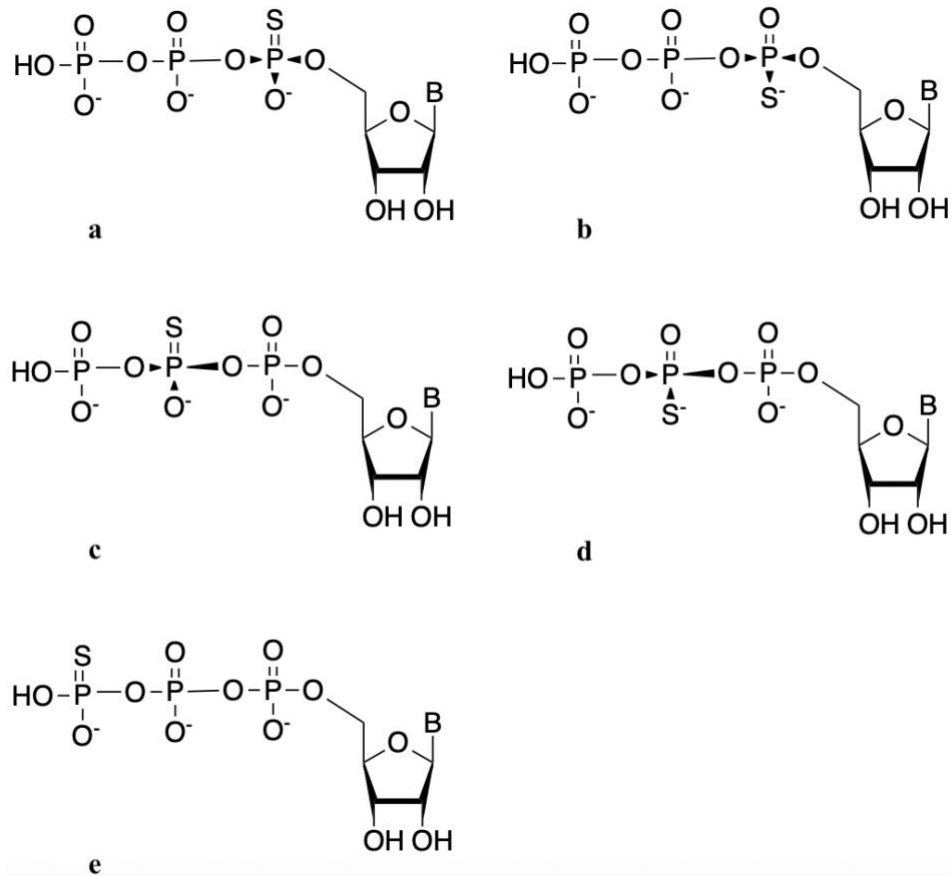
RNA:han liittyviä tutkimuksia tehdään, sillä niillä voi olla tulevaisuudessa potentiaalia monen eri sairauden ehkäisyssä ja hoidossa. RNA:n kolmiulotteisen rakenteen ja sen tarkan entsymaattisen toiminnan ymmärtäminen on tärkeää, jotta voidaan ymmärtää RNA:n suuri merkitys solun biokemiallisiin prosesseihin sekä näiden vaikutus esimerkiksi sairauksiin. RNA:n ominaisuuksien parempi ymmärtäminen, RNA:n modifioimisen kehittyminen sekä sen sekvensointitekniikoiden parantuminen luovat tärkeän pohjan RNA-tutkimuksen edistymiselle. RNA:n modifioiminen sen toiminnan ja stabiilisuuden muokkaamiseksi liittyy vahvasti oligonukleotidikemiaan ja muokattuihin oligonukleotideihin sekä nukleotideihin.

Teraeuttiset oligonukleotidit ovat noin 20 nukleotidin mittaisia rakenteellisesti muunneltuja DNA- tai RNA-nukleotidiketjuja, joita voidaan käyttää hyödyntää erilaisiin terapeuttisiin sovellutuksiin. Oligonukleotidit tarvitsevat rakenteisiinsa kuitenkin muutoksia, jotta ne voivat toimia tarpeeksi tehokkaita lääkeaineina, pääsevät helpommin haluttuun kohteeseensa kehossa tai ovat stabiilimpia esimerkiksi elimistön entsyymejä vastaan. Kun oligonukleotidin rakennetta modifioidaan, monia sen ominaisuuksia voidaan muokata haluttuun suuntaan. Muokkaaminen voi esimerkiksi sisällyttää

nukleotidiin uusia toiminnallisia ryhmiä tai linkkereitä, emästen muokkaamista, funktionaalisten ryhmien etäisyyden muuttamista tai tiettyjen atomien korvaamista toisilla.

## 1.2. Tionukleotidit ja niiden johdannaiset tutkimuksessa

Tionukleotidi on laaja käsite, joka kuvaa erilaisia nukleotideja ja niiden johdannaisia, jotka sisältävät vähintään yhden rikki- eli tiosubstituoidun atomin eli useimmiten yhden rikkiatomin molekyyllisessä happiatomin tilalla. Rikkisubstituutio on tyypillisesti esimerkiksi nukleosiditriposfaateissa joko emäsosassa tai  $\alpha$ -,  $\beta$ - tai  $\gamma$ -fosfaattiryhmän *non-bridging*-hapessa, kuten kuvan 4 rakenteissa a–e. Kuvassa 4 on esitetty tionukleotideja, joissa rikkisubstituutio on eri kohdassa nukleotidia. Lisäksi yleisimmissä ja tunnetuissa rikkianalogeissa happi voi olla korvattuna rikillä fosfodiesterisidoksen *non-bridging* hapessa tai *bridging*-3' tai 5'-hapessa.



**Kuva 4.** Erilaisia nukleosiditriposfaatin rikkisubstituutioita. **a** rikki  $\alpha$ -fosfaattiryhmässä, R-konformaatio ja **b** S-konformaatio **c** rikki  $\beta$ -fosfaattiryhmässä, S-konformaatio ja **d** R-konformaatio, **e** rikki  $\gamma$ -fosfaattiryhmässä.

Rikki ja happi ovat jaksollisessa järjestelmässä samassa ryhmässä, ja moni ero tionukleotidien ominaisuuksissa onkin johdettavissa rikin ja hapen erilaisiin kemiallisiin ominaisuuksiin. Happi ja rikki eroavat sekä elektronegatiivisuudessa että polaarisuudessa, lisäksi rikin atomisäde on isompi. Rikkisubstituution sisältävien oligonukleotidien voidaan kuitenkin yleensä olettaa käyttäytyvän samantapaisesti kuin vastaavien luonnollisten DNA- tai RNA-ketjujen. Koska tiostituoitujen oligonukleotidien konformaatiot vastaavat luonnollisten konformaatiota, niillä esiintyy myös samankaltaisia biokemiallisia ominaisuuksia<sup>8</sup>.

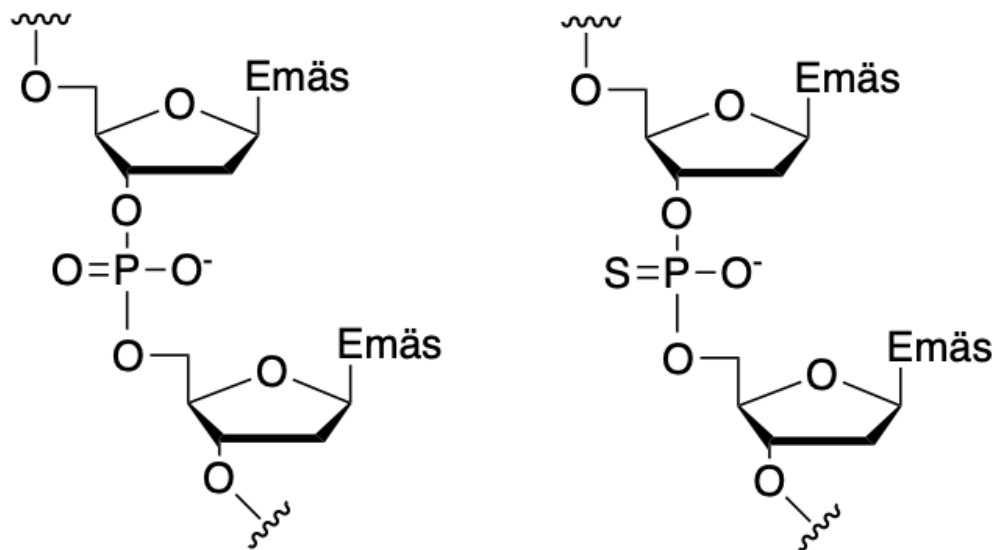
Rikin liittyessä hapen tilalle esimerkiksi fosfaattiryhmään, fosforiatomista voi tulla stereogeeninen keskus. Näin molekyylistä tulee diastereomeerinen. Diastereomeerereiksi kutsutaan kahta tai useampaa stereoisomerista yhdistettä, joilla on eri konfiguraatio yhdessä tai useammassa, mutta ei kaikissa stereogeenisissä keskuksissa, ja jotka eivät ole

toistensa peilikuvia. Diastereomerilla on merkitystä molekyylin reaktiivisuuden kannalta, ja diastereomeereilla voi olla erilaisia fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia.

Tionukleotideja on alun perin ruvettu tutkimaan erityisesti niiden stabiilisuutta lisäävän vaikutuksen takia, sillä toisin kuin luonnolliset oligonukleotidit, niiden rikkianalogit vastustavat monesti tehokkaasti nukleaasien aiheuttamaa pilkkoutumista. Tioyhdisteillä onkin tärkeä rooli entsymologiassa ja joidenkin tionukleotidien ominaisuus vastustaa entsyymattista hajoamista ja stabiloida yhdistettä liittyneenä DNA- ja RNA-rakenteisiin tekee niistä erinomaisia tutkimuskohteita. Toinen hyvin tärkeä tionukleotidien käyttötarkoitus on niiden käyttö entsyymi- ja ribotsyymikatalyyttisten reaktioiden ominaisuuksien tutkimisessa. Fosforotioaatin sisältävät nukleotidit ovat standarditekniikkaa mekanistisissa tutkimuksissa, esimerkiksi metalli-ionin roolin tutkimiseen fosfaatin siirtoreaktioissa<sup>9</sup>. Koska fosfaattiryhmät ovat elintärkeitä ja osallisena lähes kaikkissa biokemiallisissa prosesseissa kehossa, rikkisubstituutio tarjoaa uusia mahdollisuuksia. RNA-molekyylit, jotka sisältävät 3'- ja 5'-*bridging*-rikki-S-fosforotioaatin, ovat merkittäviä entsyymikatalyyysin mekanistisia koettimia<sup>10</sup>. Wang *et al.*<sup>11</sup> löysivät fosforotioaattia GpsA erään bakteerin DNA:sta, minkä avulla he osoittivat, että tioyhdisteitä voi esiintyä myös luonnossa. Eckstein ryhmään<sup>12,13</sup> on pohtinut tioyhdisteiden toimintaperiaatteita ja he ovat luoneet pohjaa tioyhdisteiden tutkimukselle ja modifikaatioille. Seuraavaksi käsittelen edellä mainittuja yhdisteitä sekä aikaisempia tionukleotidi-tutkimuksia, tionukleotidien tärkeimpiä ominaisuuksia, käyttötarkoituksia, terapeuttisia sovellutuksia sekä niiden tulevaisuudenkuvaa.

### 1.2.1. Fosforotioaatti- ja fosforotioaattioligonukleotidit

Kun fosfodiesterisidoksen happiatomeita korvataan rikillä, saadaan erilaisia substituoituja rakenteita. Fosforotioaateiksi (PS, *phosphorothioate*) kutsutaan oligonukleotideja, joiden fosfodiesterisidoksen *non-bridging*-happi on korvattu *non-bridging*-rikillä, jolloin syntyvää sidosta kutsutaan fosforotioaattisidokseksi. Tämän rakenteelliseen muutokseen (kuva 5) ansiosta fosforotioaateilla on monia hyödyllisiä ominaisuuksia verrattuna luonnollisiin DNA-oligonukleotideihin. Fosforotioaatti- sekä monia muita fosfodiesterisidoksen sisältäviä nukleotidianalogeja, jotka muistuttavat luonnollista DNA- tai RNA-kierrettä, käytetään erilaisiin lääketieteellisiin ja biokemiallisiin sovellutuksiin, erityisesti entsymologiassa.



**Kuva 5.** Vasemmalla fosfodiesterisidoksen rakenne, oikealla fosforotioaattisidos, jossa *non-bridging*-hapen tilalla on rikki.

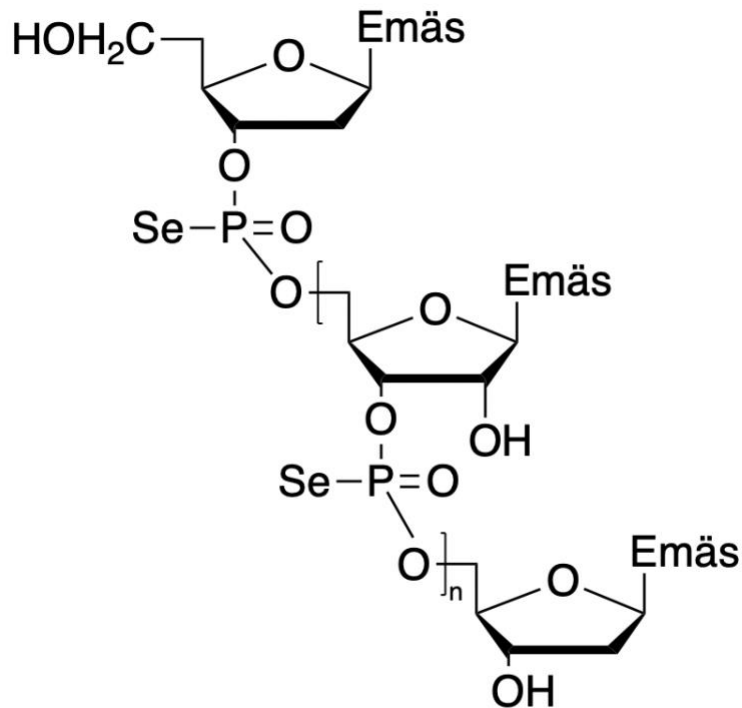
Fosforotioaattien tärkein ominaisuus on niiden vähäisempi alttius nukleasien aiheuttamalle hajoamiselle<sup>14</sup>, ja *PS-backbone* onkin yleisesti käytetty ja hyvä keino suojata nukleotideihin perustuvia lääkkeitä kehossa. Monet fosforotioaatin sisältävät DNA- tai RNA-ketjut ovat nukleasiresistenttejä. Esimerkiksi 3'-PS-ryhmä DNA:ssa blokkaa eksonukleaasi III:n toiminnan, estäen sen aiheuttaman hydrolyysin. Rikkiatomi vähentää fosforin elektrofiilisyyttä, ja PS-ryhmä on herkempi alkyloitumaan kuin tavallinen fosfaatti<sup>15</sup>. Luonnolliset oligonukleotidit hajoavat elimistössä nopeasti nukleasien vaikutuksesta, kun fosfodiesterisidos katkeaa. Siksi oligonukleotidien hyödyntäminen lääkkeitä vaatii yleensä sen rakenteen muokkaamista stabiilisuuden parantamiseksi.

Kun fosfodiesterisidoksen toinen *non-bridging*-happi vaihdetaan rikiksi, fosforista tulee kiraalinen keskus. Tämän stereogeenisen keskuksen takia syntyy R- ja S-diastereomeerejä. Diastereomeerit ovat stereoisomeereja, jotka eroavat toisistaan joiltakin kemiallisilta ominaisuuksiltaan, mikä rajoittaa fosforotioaattien käyttöä esimerkiksi antisense-terapiassa. Kiraalisuuteen voidaan kuitenkin vaikuttaa oikeanlaisilla nukleotidien modifioinnilla sekä rajoittamalla fosforotioaattisidosten lukumäärää, ja fosforotioaattit soveltuvatkin hyvin antisense-oligonukleotideiksi.

Antisense-oligonukleotidit ovat rakenteeltaan muokattuja, noin 10–25 nukleotidin pituisia yksijuosteisia DNA-oligonukleotideja. Ne ovat osoittautuneet erittäin lupaaviksi molekyyleiksi säätelemään geenien ilmentymistä *in vivo*, aiheuttamalla mRNA:n hajoamisen tai estämällä mRNA:n translaatiota. Antisense-terapiaa käytetään jo nyt joidenkin sairauksien parantamiseen. Antisense-oligonukleotidi sitoutuu komplementaarisesti tiettyyn mRNA:n kohtaan Watson–Crick-emäspariutumisella ja inhiboi mRNA:n translaatiota hyödyntämällä elimistön hajottajaentsyymiä, ribonukleaasi H:ta (RNAasi H). Näin muuttuu myös vastaavan mRNA:n koodaaman proteiinin aminohappojärjestys eli proteiinisynteesi estyy tai häiriintyy. Solussa voidaan siis antisense-oligonukleotidin avulla estää tietyn ei-halutun geenin ilmentyminen pysäyttämällä tai muokkaamalla sairauden aiheuttavan proteiinin syntetisoimista<sup>16</sup>.

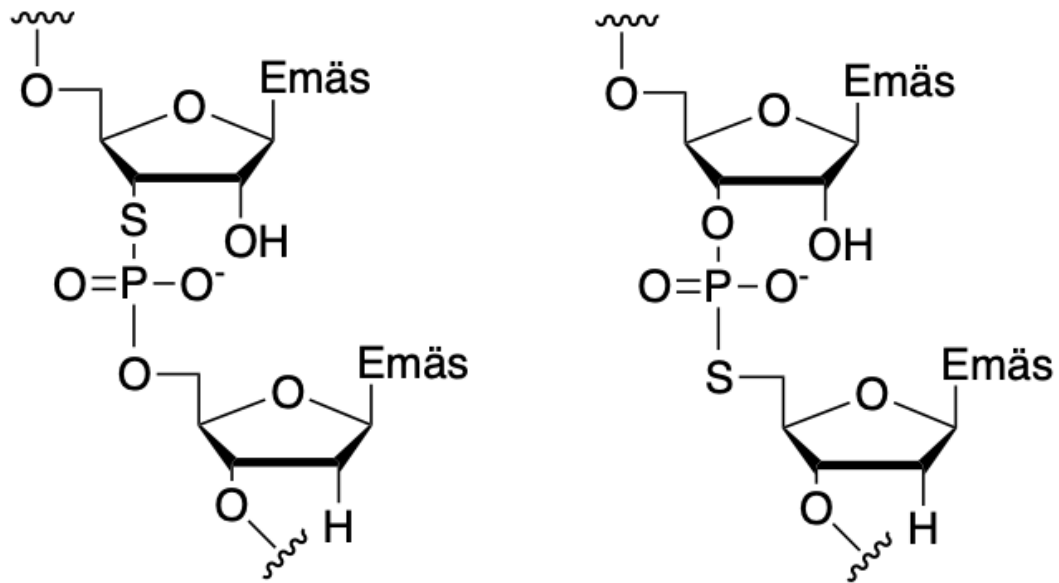
Fosforotioaattioligonukleotidit ovat hyvin tutkittuja ja yleisiä antisense-molekyylejä, sillä ne ovat stabiileja ja pienissä määrin myrkyttömiä yhdisteitä. Lisäksi niiden etuna on mahdollisuus valmistaa niitä suurissa määrin edullisesti. Moni fosforotioaattioligonukleotidi onkin kliinisissä testeissä<sup>17</sup>.

Seleeni on niin ikään samassa ryhmässä jaksollisessa järjestelmässä kuin rikki ja happi. Happi voidaan nukleotideissa korvata myös seleenillä, ja monissa aikaisemmissa tutkimuksissa<sup>18,19</sup> PSe- eli fosforoselenoaattiyhdisteillä on todettu samankaltaisia kemiallisia ominaisuuksia kuin vastaavilla rikkiyhdisteillä. Se-R on myös parempi lähtevä ryhmä kuin S-R. Selenonukleotidit ovat herättäneet kiinnostusta ominaisuuksiensa vuoksi, ja seleenisubstituoituihin yhdisteisiin palataan osittain myös kokeellisessa osuudessa, jossa tähän tutkielmaan liittyen on tutkittu erään seleenianalogin kemiallista hajoamista. Myös selenosubstituutiolla voi olla hyödyllisiä biokemiallisia tai terapeuttisia ominaisuuksia verrattuna vastaaviin happianalogeihin, joten siksi niidenkin ominaisuuksien tutkiminen on tärkeää. Kuvassa 6 on kuvattu valmistetun fosforoselenoaattioligonukleotidin rakennetta, jonka Mori tutkimusryhmineen<sup>18</sup> valmistivat.



**Kuva 6.** Esimerkki fosforoselenaattioligonukleotidista<sup>18</sup>.

Mikäli rikkisubstituution paikka on 3'- tai 5'-*bridging*-hapessa (kuva 7), yhdistettä kutsutaan fosforotiolaatiksi (PSL). 3'-S-fosforotiolaatin tai 5'-S-fosforotiolaatin sisältävillä RNA-dinukleotidifosforotiolaateilla on huolimatta niiden hankalammasta synteesistä paljon sovellutuksia RNA-kemiassa ja RNA:n rakenteen analysoimisessa. 3'-fosforotiolaattien yksi yleinen käyttökohde on nukleiinihapporakenteiden stabiloiminen. 3'-PSL-substituutio vaikuttaa sekä oman sokerin, mutta myös siihen liittyneeseen viereisen sokeriosan konformaatioon stabiloivasti<sup>10</sup>.



**Kuva 7.** Fosforotiolaattien yleinen rakenne, jossa rikkisubstituutio on fosfodiesterisidoksen *bridging*-hapessa. Vasemmalla oleva yhdiste on 3'-S-fosforotiolaatti (3'-PSL) ja oikealla oleva on 5'-S-fosforotiolaatti (5'-PSL).

Fosforotiolaatin sisältäviä oligonukleotideja hyödynnetään koettimina metalli-ioni-riippuvissa fosfotransesterifikaatioissa niiden *rescue*-efektin takia, ja erityisesti 3'-PSL-linkin sisältäviä oligonukleotideja käytetään *rescue*-tutkimuksissa tunnistamaan metallionien sitoutumiskohtia<sup>10</sup>. 3'-PSL-diestereitä käyteään niin ikään myös entsyymaattisen reaktion eri reaktiovaiheiden rajoittavan tekijän määrittämisessä<sup>10</sup>.

Metalli-ionien *rescue*-efektillä tarkoitetaan  $Mg^{2+}$ -ionin erilaista affiniteettiä happi- tai vastaavasti rikkiligandien koordinoimiseen<sup>20</sup>. Happiligandin tiiosubstituutio voi näin ollen häiritä  $Mg^{2+}$ -vuorovaikutusta, mikä johtaa kompleksin aktiivisuuden vähenemiseen. Aktiivisuuden pieneneminen voidaan kuitenkin vaimentaa eli "pelastaa/*rescue*" käyttämällä tiettyjä kationeja, kuten  $Mn^{2+}$ , jotka vuorovaikuttavat paremmin rikin kanssa kuin  $Mg^{2+}$ . Metallionien *rescue*-effekti tarjoaa luotettavaa informaatiota metallionin ja ligandin välisestä vuorovaikutuksesta. Ribotsyymit ovat erittäin hyviä kohteita *rescue*-tekniikalle, ja tekniikkaa onkin käytetty keräämään ribotsyymikatalyyysin malleja, sekä tulkitsemaan ja tunnistamaan ligandien rakenteita ja metallionien katalyyttisiä vuorovaikutuksia<sup>20,21</sup>. Myös RNA:n rakenteen ja vuorovaikutusten analysointi helpottunee tekniikan kehittyessä.



### 1.2.2. Tionukleotidit

Yksi tionukleotidien tärkeimmistä käyttökohteista on fosforotioaattiryhmän diastereomeerien hyödyntäminen entsyymireaktioiden mekanismien tutkimiseen. Kun rikki liitetään ATP:n  $\alpha$ - tai  $\beta$ -fosfaattiin, fosforiatomista tulee kiraalinen keskus. Nukleosiditriposfaattien rikkisubsituution seurauksena syntyvien  $R_p$ - ja  $S_p$ -diastereomeerien avulla voidaan tutkia entsyymaattisen reaktion stereokemiaa. Lisäksi voidaan tarkastella entsyymaattisen reaktion etenemistä, johtuen entsyymien stereoselektiivisyydestä<sup>13</sup> sekä tutkimusta helpottavasta tio-reaktioiden hitaammasta entsyymaattisesta reaktionopeudesta. Fosforotioaatti-nukleotideja on myös käytetty tunnistamaan ja tutkimaan RNA:n ja proteiinien välistä vuorovaikutuksia<sup>22</sup>. *Non-bridging*-asemassa olevan rikin sisältävillä tionukleotideilla on yksi stereogeeninen keskus, ja diastereomeerien ominaisuudet ovat kiinnostavia myös  $Mg^{2+}$ -ionin sitoutumiseen liittyen<sup>12</sup>. Oikea kationien koordinaatio on tärkeää fosforotioaattien entsyymaattisissa reaktioissa. Mg-ATP-kompleksi osallistuu entsyymaattisiin fosforyyli- ja nukleotidyylireaktioihin kehossa. Tioanalogi ATP $\beta$ S:n  $R_p$ -isomeeri on kuitenkin todettu monissa tilanteissa paremmaksi substraatiksi  $Mg^{2+}$ -ionin läsnäollessa, kun taas  $S_p$ -isomeeri on parempi sitoutumaan heksokinaasiin  $Cd^{2+}$ -ionin läsnäollessa<sup>13</sup>.

Yksi tunnetuimpia tionukleotideja on GTP $\gamma$ S eli guanosiini-5'-( $\gamma$ -tio)trifosfaatti. GTP $\gamma$ S on rikkianalogi, jonka farmakologisia vaikutuksia on tutkittu paljon<sup>23,24</sup>. Sillä on merkittävä rooli muun muassa G-proteiinien aktivoinnissa. GTP $\gamma$ S:n on tutkittu olevan hyvä GTP-analogi peptidisidosten muodostamiselle proteiinisynteesissä, ja sen on huomattu stimuloivan aminoasyyli-tRNA:n sitoutumista ribosomeihin<sup>25</sup>. GTP $\gamma$ S:n on havaittu olevan myös ALOX5:n (arakidonaatti-5-lipoksigenaasin) mahdollinen hyvä aktivaattori, sillä sen todettiin parantavan arakidonaattista hapettumista 10-kertaisesti<sup>24</sup>. ALOX5 toimii elimistössä välttämättömien rasvahappojen muuttamiseksi leukotrieeneiksi. Tutkimuksessa tutkittiin myös muita tio-analogeja (5'-O-(2-tiodifosfaatti), adensiini-5'-O-(3-tiotrifosfaatti), adensiini-5'-O-(2-tiodifosfaatti), adensiini-5'-O-tiomonofosfaatti), ja ne kaikki stimuloivat hyvin spesifisesti 5-lipoksigenaasin aktiivisuutta, toisin kuin vastaavat rikittömät nukleotidit.

Gurer *et al.*<sup>26</sup> vertasivat ADP:n, ATP:n, ATP $\gamma$ S:n ja GTP $\gamma$ S tehokkuutta HIV-1-virionien tarttuvuuden estämiseksi. Hsp70 (*heat shock protein*) on elimistön ATP-riippuvainen

proteiini, jonka tehtävänä on mm. proteiinien laskostumisen helpottaminen, proteiinien kuljettaminen ja hajottaminen sekä nukleotidien sitominen. ATP:n hydrolysoituessa Hsp70:n konformaatio muuttuu, ja sen affiniteetti tiettyä substraattia kohtaan kasvaa. Virioneihin integroituneen Hsp70:n tehtävä on auttaa virioneja pääsemään elimistössä kohteeseensa. Hsp70:llä saattaa myös olla rooli muiden DNA- tai RNA-virusten parissa, kuten adeno- ja enteroviruksissa<sup>26</sup>. Inkubointi ATP:n tai ADP:n kanssa ei tuottanut näkyvää vaikutusta, kun taas sen sijaan ATP $\gamma$ S ja GTP $\gamma$ S todettiin hyvin tehokkaiksi vähentämään HIV-1:n tarttuvuutta: inkubointi tionukleotidin kanssa esti viraalisen cDNA:n synteesiä huomattavissa määrin, mikä aiheutti viruksen tarttuvuuden vähenemisen. Vaikutuksen epäiltiin johtuvan siitä, että Hsp70:n rakenne liittyneenä ATP $\gamma$ S:iin muistuttaa sen rakennetta liittyneenä ADP:iin, ja ADP:n sitoutuminen peptideihin on huomattavan paljon vähäisempää. Tämän Hsp70-ATP $\gamma$ S-kompleksin muodostuminen vaikuttaa virionin ytimen rakenteeseen, vähentäen sen käänteistranskriptiota, mikä johtaa myös sen tarttuvuuden heikkenemiseen.

5'-PSL-yksikön on todettu stabioloivan nukleotidien *cap*-rakenteita entsyymaattisissa reaktioissa, ja parantavan mRNA:n translaatiota. Jemielity *et al.*<sup>6</sup> tutkivat 15 eri PSL-sidoksen sisältävää analogia ja niiden kykyä vastustaa *decappingia* eli fosfoanhydridisidoksen katkeamista mRNA:n 5'-*cap*-rakenteessa DcpS- ja Dcp1–Dcp2-*decapping*-entsyymejä vastaan. Rikkianalogien todettiin sitoutuvan paremmin eIF4E-kompleksiin ja osa tutkituista rikkianalogeista paransi mRNA:n kykyä vastustaa *decapping*-entsyymien vaikutusta.  $\gamma$ -PSL-linkin sisältävät yhdisteiden huomattiin olevan hyvin vastustuskykyisiä *in vitro* hDcp2:n hydrolyysille, ja ryhmä totesi hydrolyyttisen pysyvyyden parantumisen vain, kun rikkisubstituutio oli  $\gamma$ -asemassa. Niin ikään kahden 5'-PSL-yksikön sisällyttämisen samaan yhdisteeseen huomattiin vähentävän stabilisoivaa vaikutusta. Tulokset voivat lähitulevaisuudessa mahdollistaa muokattujen analogien käytön *cap*-riippuvaisissa biologisissa sovellutuksissa.

Tionukleotidien synteesi voi olla monimutkainen tai matalatuottoinen prosessi. Pitkiä oligo(tio)nukleotideja on valmistettu 1980-luvulta alkaen fosforiamidiitti-menetelmällä kiinteä faasin (SPS, *solid phase synthesis*) avulla, jossa oksidaatio korvattiin sulfurisaatiolla<sup>27</sup>. Monissa fosforotioaatti-yhdisteiden synteesipoluissa akrylonitriilin syntyminen suurissa määrin sekä sen alkyloiva vaikutus suojarimien poistovaiheessa

vaikuttaa tionukleotidien synteesiä, ja aiheuttaa ei-haluttuja sivutuotteita, kuten desulfuroituja oligonukleotideja<sup>27</sup>. 2-syanoetyylin tilalle voidaan vaihtaa parempia suojarahmiä, jotta fosforotioaattien hydrolyyttinen stabiilisuus kasvaa, tai syntyvää akrylonitriiliä on pystytty poistamaan vahvoilla hapoilla (esimerkiksi piperidiini) tai scavenger-molekyyleillä, kuten nitrometaani<sup>28</sup>. Monia uusia synteesitekniikoita on kehitteillä, jotta tionukleotidien synteesi olisi helpompaa. Esimerkiksi Vyle *et al.*<sup>29</sup> osoittivat uudenlaista fosfaatti-*coupling*-tekniikkaa käyttäen dinukleosidien *cap*-rakenteiden synteesin mekanokemiallisella aktivoinnilla kuulamylyssä. Aikaisemmin 3',5'- ja 5',5'-pyrofosforotiolaatti-sidoksen sisältäviä rakenteita ei pystytty syntetisoimaan, ja Vylen tutkimusryhmä tutkii saman tekniikan sopivuutta alkyloituihin guanosiinitrifosfaatti *cap*-rakenteisiin. Fosforotiolaattimonoestereiden valmistamiseen käytettiin 3'-tiotymiinin ja 5'-tioadenosiinin S-aryylisulfidijohdannaisia Michaelis–Arbuzov-reaktiossa, jonka jälkeen tuotteet desilyloitiin hydrolyyttisesti ja yhdistettiin fosfaatti-*coupling*-tekniikalla kuulamylyssä.

### 1.3. Tionukleotidien kemiallinen reaktiivisuus

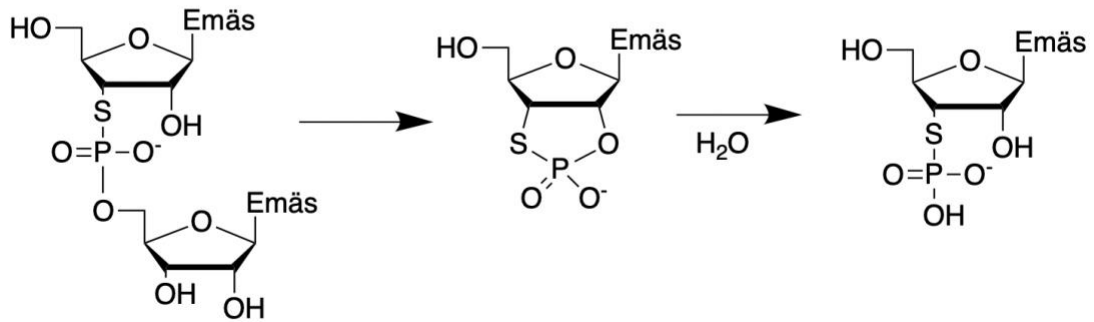
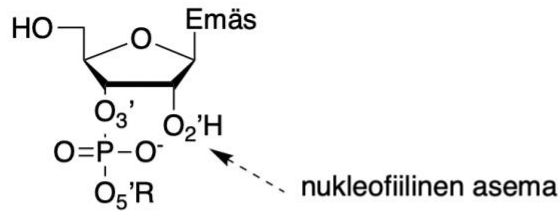
Reaktiivisuudella ja hydrolyyttisellä pysyvyydellä on suuri rooli, jotta tionukleotideista ja muista tiofosfaattiyhdisteistä voidaan kerätä tärkeää informaatiota niiden ominaisuuksista. Fosforotioaattianalogien kineettiset tutkimukset ovat tärkeitä myös tionukleotidien stereokemiallisten ominaisuuksien takia. Rikkisubstituution paikka tioyhdisteessä vaikuttaa sen kineettisiin ominaisuuksiin ja hydrolyyttiseen pysyvyyteen sekä reaktion tuotteiden suhteisiin.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että fosfodiesterisidoksen molempien *non-bridging* happien korvaaminen rikillä ei vaikuta suuresti fosfodiesterisidoksen hydrolyyttiseen stabiilisuuteen<sup>30</sup>. Happamissa olosuhteissa sekä fosforotioaatin että monofosforotioaatin hajoamisen todettiin olevan huomattavasti nopeampaa kuin kilpailevien reaktioiden, desulfurisaation ja isomerisaation, joskin hyvin happamissa olosuhteissa monofosforotioaatti reagoi noin 1,6 kertaa nopeammin.

*Bridging*-substituutiolla on sen sijaan suurempi vaikutus hajoamisreaktiivisuuteen. Sekä 3'- että 5'-rikkisubstituution on todettu vaikuttavan hydroksidi-ionin katalysoiman fosfodiesterisidoksen hajoamisreaktioon nopeuttavasti<sup>15</sup>. Elzagheidin *et al.*

tutkimuksessa 5'-rikkisubstituution on todettu nopeuttavan RNA-dinukleotidin hydrolyysiä jopa  $10^5$ -kertaa nopeammaksi<sup>31</sup>. Tämän arveltiin johtuvan tiolaatin toiminnasta parempana lähtevänä ryhmänä. Dinukleotidien 3'-tiosubstituution arveltiin vaikuttavan fosfaatin taipuvuuteen ja sitä kautta tekevän fosfaatin alttiimmaksi nukleofiilin hyökkäykselle.

Molekyylin sisäinen hyökkäys fosfodiesterisidokseen 2'-hydroksyyliiryhmän toimesta (reaktiokaavio 1) on yksi dinukleotidien tyypillisimpiä reaktioita niiden hydrolysoituessa. Mekanistisilla tutkimusmenetelmillä voidaan tarkastella kyseisen reaktion nopeutta ja mekanismia, kun happi vaihdetaan rikkiin eri kohdissa molekyyliä, *bridging*-3' tai 5'-asemaan tai 2'-hydroksyyliiryhmään. 2'-hydroksyyliiryhmä on RNA-analogin nukleofiili- asemassa sen hydrolyysireaktiossa. Iyer *et al.*<sup>8</sup> tutkivat yksinkertaistettuja ribonukleosidi-fosfodiesterimalleja, joista esimerkiksi puuttui ribosirengas, jotta voitiin tarkemmin keskittyä vain itse hajoamiseen osallistuvien molekyylien osiin. Ribosirenkaan puuttuminen mahdollisti suuremman konformaationallisen joustavuuden ja paremman hydrolyyttisen stabiilisuuden. Lisäksi nukleotideja muokattiin metyyliiryhmällä niin, että hydrolyysin kanssa kilpailevia reaktioita, isomerisaatiota ja fosfaattien migraatiota, voitiin seurata. Iyer tutkimusryhmineen myös määrittivät kineettisiä isotooppiefektejä (KIE)  $^{18}\text{O}$  ja  $^{34}\text{S}$  -isotooppeja hyödyntäen. 2'-SH-sidoksen hyökkäys fosfodiesterisidokseen todettiin huomattavasti vastaavaa happianalogia hitaammaksi. Rikki 3' tai 5' -asemissa sen sijaan stabiloii molekyyliä alkyylien toimiessa hyvinä lähtevinä ryhminä verrattuna niiden arylianalogeihin. KIE:n avulla todettiin, että rikkianalogien hajoamismekanismit vastasivat pääasiassa luonnollisia reaktioita. Rikin ollessa 3'-asemassa transitiotila on hyvin aikainen, kun taas rikin ollessa 5'-asemassa transitiotila on hyvin assosiatiiivinen eli välituotteet muodostuvat samaan aikaan kuin transitiotilaan saapuva ligandi liittyy kompleksiin<sup>8</sup>.



**Reaktiokaavio 1.** Iyerin *et al.*<sup>8</sup> tutkimuksessa 2'-hydroksyyli-ryhmä on nukleofiilisessä asemassa, ja alempana on kuvattu *bridging-3'*-tiosubstituoidun analogin hyökkäys molekyylin sisäisesti. Kaaviossa emäs on urasiili tai inosiini.

Tiosubstituutiota on tutkittu kokeellisten menetelmien lisäksi myös laskennallisin menetelmin. Rikkisubstituotujen dinukleotidien teoreettisesti nopeampi hydrolyysireaktio on todettu monien mekanististen tutkimusten perusteella paikkaansapitäviksi myös käytännössä<sup>8,15</sup>, ja muodostuvia tuotteita ja välituotteita sekä mekanismeista on voitu seurata tarkasti. Wong *et al.*<sup>15</sup> osoittivat, että 3'-aseman rikkisubstituoidun yhdisteen reaktiossa muodostaa kaksi transiitotilaa, joissa syntyvät välituotteet ovat eroavat toisistaan kineettisiltä ominaisuuksiltaan. Luonnollisen reaktion, jossa jälkimmäinen vaihe oli reaktion nopeutta rajoittava, aktivaatioenergia oli suurempi kuin tutkittujen 3'-S ja 5'-S-rikkisubstituotujen yhdisteiden reaktioiden transiitotilojen aktivaatioenergiat. 5'-aseman vastaavalla tiosubstituoidulla reaktiolla oli vielä 3'-aseman reaktiota pienempi aktivaatioenergia. Wong tutkimusryhmineen mittasivat myös muokkaamattoman ja 3'-S- sekä 5'-S-substituotujen nukleotidien reaktioiden sekundäärisen KIE:n (*secondary kinetic isotope effect*). Sekundäärisellä KIE:llä tarkoitetaan reaktion nopeudessa aiheutuvia muutoksia, jotka johtuvat epäsuorasti isotooppisista substituutioista. Vaikka primäärisissä KIE:ssä olikin eroja 3'-S- ja 5'-S-

reaktioilla KIE:n ollessa suurempi kuin luonnollisessa reaktiossa, sekundääriset KIE-arvot olivat lähes yhtä suuria.

#### 1.4. Tutkielman tavoitteet

Tutkielmani kokeellisen osuuden tavoite oli tarkastella muutamien tionukleotidien hydrolyyttistä pysyvyyttä. Tässä johdanto-osassa esittelemäni aikaisemmat tutkimukset ovat pohjustaneet, miksi tionukleotideja on ruvettu tutkimaan, ja mihin niitä voidaan tulevaisuudessa käyttää. Monissa aikaisemmissa esimerkkitutkimuksissa on todettu, että tiosubstituutiolla on hyödyllisiä tai erityisiä ominaisuuksia verrattuna vastaaviin rikittömiin nukleotideihin. Tärkeimmät näistä lienevätkin mekanistiset tutkimukset entsymologiaan liittyen sekä joidenkin tionukleotidien kyky vastustaa entsyymattista hajoamista ja niiden stabiloiva vaikutus molekyylissä. Kokeellisessa osuudessa korostuu tionukleotidien hydrolyyttisen pysyvyyden tärkeys niiden tulevaisuuden käyttökohteita ajatellen.

Kokeellinen osuus liittyy Dr. J. Vylen (Queen's University, Belfast)<sup>29</sup> aikaisempiin tutkimuksiin vastaavanlaisten tiosubstituoitujen yhdisteiden reaktiivisuudesta sekä niiden hydrolyysin kinetiikasta. Kokeellisessa osassa suoritettiin ATP:n, ATP $\gamma$ S:n, GTP:n ja GTP $\gamma$ S:n hydrolyysi erilaisissa pH- sekä lämpötilaolosuhteissa, tutkittiin hydrolyysin etenemistä sekä tunnistettiin erilaisissa olosuhteissa muodostuvia reaktiotuotteita. Tutkielman kokeellisessa osassa keskityttiin vain  $\gamma$ -rikkisubstituoitujen nukleosiditriposfaattien reaktioihin. Myös erään seleeni-analogin (diadenosiiniselenopyrofosfaatin) kemiallista pilkkoutumista ja sen kemiallisen pilkkoutumisen kinetiikkaa tutkittiin erilaisissa olosuhteissa aikaisempiin Dr. J. Vylen tutkimuksiin liittyen. Eri pH:issa suoritettujen hydrolyysireaktioiden avulla voitiin selvittää seleenianalogin soveltuvuutta entsyymi-inhibiittoriksi ja nukleiinihappojen *cap*-rakennemalliksi.

Kokeellisessa osassa suoritettujen reaktioiden seuraaminen ja reaktioreittien tunnistaminen (välituotteiden tunnistaminen) on tärkeää, jotta voidaan olla varmoja, miten reaktio on edennyt ja kuinka paljon pH- ja lämpötilaolosuhteilla on merkitystä reaktioiden etenemiseen. Vertaamalla eroja rikkianalogin sekä luonnollisen nukleotidin

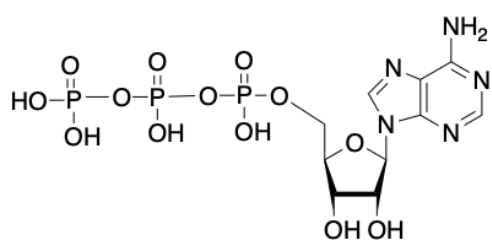
hajoamisen välillä eri olosuhteissa selvitettiin miten pysyviä tiosubstituoidut nukleotidit ovat erilaisissa olosuhteissa.

## 2. Kokeellinen osa

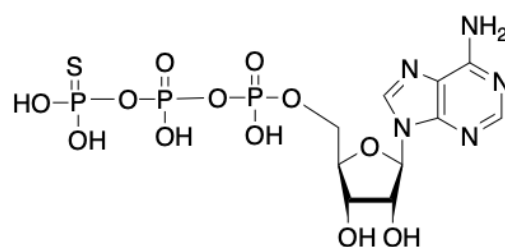
### 2.1. Reaktioiden suorittaminen

Kokeellisessa osassa tutkittiin kuvassa 8 esitettyjen lähtöaineiden ATP:n (1) ja ATP $\gamma$ S:n (adenosiini-5'-( $\gamma$ -tio)trifosfaatti (2)), sekä GTP:n (3) ja GTP $\gamma$ S:n (guanosiini-5'-( $\gamma$ -tio)trifosfaatti (4)) hydrolyysireaktiota erilaisissa pH- sekä lämpötilaolosuhteissa, tunnistettiin erilaisissa olosuhteissa muodostuvia reaktiotuotteita ja määritettiin reaktioiden nopeusvakioita.

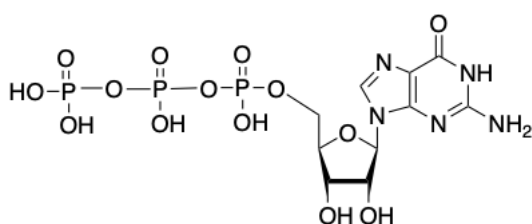
Kunkin lähtöaineen kantaliuoksesta laimennettiin noin 100-150  $\mu$ M liuos haluttuun olosuhteeseen: lähtöaine reagoi emäksisissä (NaOH), neutraaleissa (HEPES) tai happamissa (HCl) olosuhteissa vesihauteessa. Vesihauteen lämpötila säädettiin 60 °C:seen, tai vastaavasti tionukleotidien tapauksessa myös 25 °C:seen.



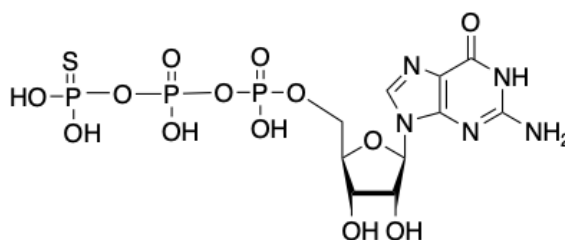
1, ATP



2, ATP $\gamma$ S eli adenosiini-5'-( $\gamma$ -tio)trifosfaatti



3, GTP



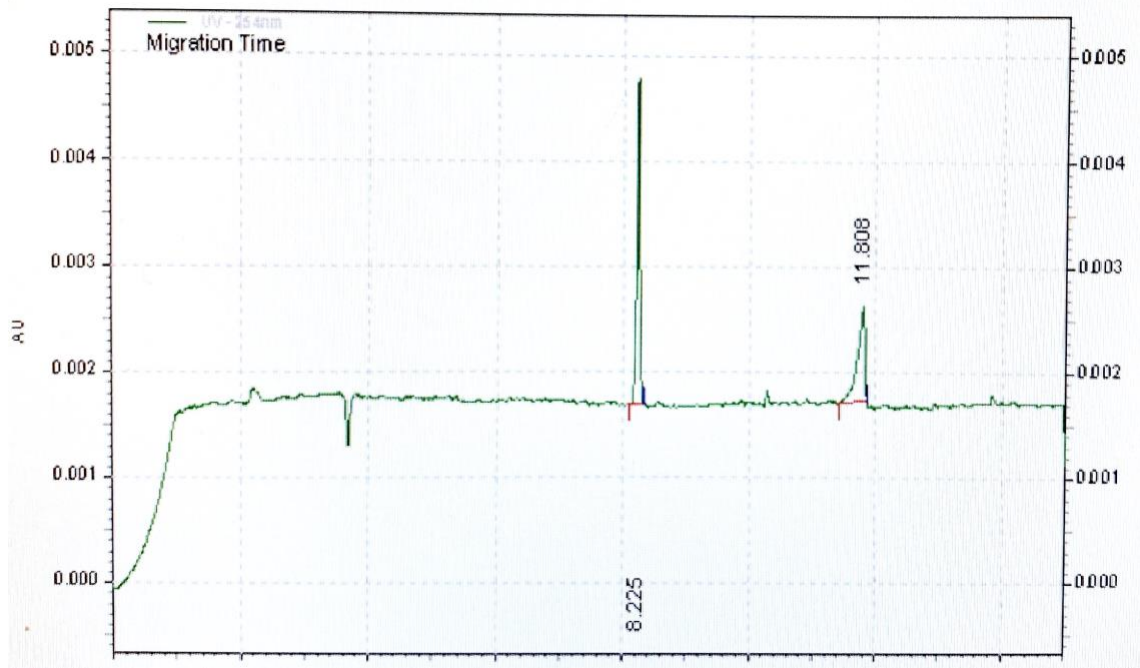
4, GTP $\gamma$ S eli guanosiini-5'-( $\gamma$ -tio)trifosfaatti

**Kuva 8.** Kokeellisessa työssä käytetyt lähtöaineet.



Reaktioita seurattiin ottamalla 6–9 näytettä (80–100  $\mu$ l) tietyin väliajoin noin 4–5 päivän kuluessa. Näytteiden määrän tarvetta sekä reaktioon tarvittavaa aikaa seurattiin reaktion edetessä. Otetut näytteet siirrettiin jäähauteeseen. ATP $\gamma$ S:n ja GTP $\gamma$ S:n reaktiot 60 °C:ssa HCl:ssä suoritettiin toiseen kertaan reaktioiden osoittautuessa ensimmäisellä kerralla erittäin nopeiksi. Kyseisten reaktioiden uusinnoissa reaktio pysäytettiin 0,5 M HEPES-liuoksella (noin 2 mikrolitraa) sekä jäähauteella. Reaktiosta otetut näytteet säilytettiin väliaikana pakkasessa ja analysoitiin kapillaarielektroforeesilla (CE).

CE:ssä yhdisteiden erottuminen toisistaan perustuu varattujen hiukkasten erilaiseen etenemisnopeuteen (migraatio) ohuessa kapillaarissa sähkökentän avulla. Hiukkasten etenemisnopeus riippuu esimerkiksi niiden koosta, massasta ja varauksesta, ja ne liikkuvat CE:ssä kohti vastakkaisen varauksen omaavaa elektroodia. Neutraalit yhdisteet sen sijaan jäävät CE:ssä erottumatta. CE detektoi yhdisteet UV-absorbanssin perusteella. Piikin pinta-ala jaettuna kuluneella ajalla eli migraatioajalla on verrannollinen yhdisteen pitoisuuteen. Reaktioille laskettiin nopeusvakiot seuraamalla pitoisuuksien pienenemistä reaktioajan funktiona ja soveltamalla ensimmäisen kertaluvun integroitua nopeusyhtälöä. Kuva 9 on esimerkki CE:n tuloksista (ATP $\gamma$ S, HCl, aikapiste noin 23 h 46 min). Nopeusvakioiden avulla saatiin muodostettua erilaisia kuvaajia.



**Kuva 9.** CE:n näytteistä detektoimien yhdisteiden piikkien pinta-alat sekä migraatioajat näkyvät CE:n näytöltä. Kyseisessä reaktiossa ATP $\gamma$ S on reagoanut noin vuorokauden ajan ja CE:ltä voidaan havaita sekä ADP-piikki noin 11,8 minuutin kohdalla että AMP-piikki noin 8,2 minuutin kohdalla.

## 2.2. Liuokset ja lähtöaineet

CE-analyysiä varten valmistettiin ajopuskuriksi 1:1  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -puskuriliuos, jonka kokonaiskonsentraatio oli 25 mM.

Emäksistä pH:ta vastaavia olosuhteita varten valmistettiin NaOH-liuos (10 mM), jonka ionivahvuus säädettiin NaCl:lla 0,1 M ( $\text{pH}_{\text{todellinen}} = 11,82$ ). Hapanta pH:ta varten valmistettiin HCl-liuos (10 mM), jonka ionivahvuus säädettiin NaCl:lla 0,1 M ( $\text{pH}_{\text{todellinen}} = 2,06$ ). Neutraalia pH:ta varten valmistettiin 20 mM HEPES-puskuriliuos ( $\text{pH}_{\text{teoreettinen}} = 7,5$ ,  $\text{pH}_{\text{todellinen}} = 7,58$ , johon lisättiin 150 mM NaCl ja 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ).

Käytetyt ATP, GTP,  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  ja  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  olivat valmistajalta Sigma-Aldrich GmbH, ja ne on esitetty taulukossa 1. Niistä valmistettiin noin 50 mM ( $\text{ATP}\gamma\text{S}$ ) tai vastaavasti 100 mM kantaliuos ( $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ), josta niin edelleen valmistettiin ajettavia näytteitä varten noin 200  $\mu\text{M}$  CE-näyteliuos liuotettuna halutun pH:n puskuriliuokseen.

**Taulukko 1.** Käytetyt nukleosiditrifosfaatit ja niiden rikkianalogit.

yhdiste	Valmistaja	Pakkauskoko	CAS
ATP	Sigma-Aldrich	5 g	34369-07-8
$\text{ATP}\gamma\text{S}$	Sigma-Aldrich	5 g	93839-89-5
GTP	Sigma-Aldrich	5 g	36051-31-7
$\text{GTP}\gamma\text{S}$	Sigma-Aldrich	5 g	94825-44-2

## 2.3. Käytetyt laitteistot ja ajo-ohjelmat

Käytetty CE-laitteisto oli Beckman Coulterin P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System. Lämpötila analyysin aikana oli 25 °C, mittausaallonpituus 254 mm ja käytetty jännite 25 KV. Kapillaarin efektiivinen pituus oli 57 cm ja sisähalkaisija 75  $\mu\text{m}$ .

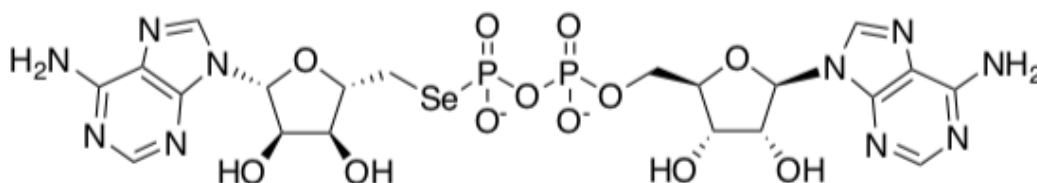
Ajo-ohjelman eteneminen on esitetty taulukossa 2. Tarvittaessa kapillaari huuhdeltiin päivän päätteeksi (Flush capillary 20 psi pressure,  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 min). CE:n huuhteluliuksena käytettiin noin 0,2 M NaOH-liuosta.

**Taulukko 2.** Kapillaarielektroforeesissa käytetty ajo-ohjelma sekä huuhtelut.

Ajo-ohjelman vaihe	Arvo	Kesto
Huuhtelu (rinse - pressure), H <sub>2</sub> O	20 psi	2 min
Huuhtelu (rinse - pressure), 0,2 M NaOH	20 psi	3 min
Injektointi (pressure)	0,5 psi	3,0 s
Erotus (voltage)	25 KV	15 – 20 min

## 2.4. Seleenianalogien pysyvyys

Dinukleosidipyrofosfaatti-seleenianalogin (kuva 10) pysyvyyttä ja hajoamistuotteita analysoitiin reaktion edetessä eri pH:issa. Seleenianalogi reagoi eri pH-arvon puskuriliuksissa vesihauteessa 90 °C:n lämpötilassa ja tämän hydrolyysireaktion etenemistä analysoitiin HPLC:llä sekä kapillaarielektroforeesilla (CE), ottaen reaktioliuoksesta tietyin väliajoin näytteitä. Reaktioille laskettiin nopeusvakiot.



**Kuva 10.** Lähtöaineena käytetty dinukleosidipyrofosfaatti-seleenianalogi. Seleenin on korvannut hapen toisessa fosfaattiryhmässä, bridging-hapessa.

Koska reaktio suoritettiin 90 °C:ssa, voimakkaasti lämpötilariippuvaisten puskuriliuosten MOPSO-, MOBS- ja CHES-puskurien pH-arvo 25 °C:ssa säädettiin 0,9 pH-yksikköä haluttua reaktio-pH:ta korkeammaksi. HPLC-analyysiä varten valmistettiin eluenteiksi kaksi asetaattipuskuri-MeCN-liuoksta, A (MeCN 2 %, asetaattipuskuri 98 %) ja B (80 % MeCN, asetaattipuskuri 20 %). Erottumisen parantamiseksi pH:n 4, 6, 7, 8 ja 9 reaktiota varten HPLC:n eluentin A koostumusta muutettiin, jolloin asetonitriilin pitoisuus oli 4 % ja asetaattipuskurin pitoisuus 96 %. Eluentti B pidettiin samana. Asetaattipuskuri (pH 4.3) valmistettiin liuottamalla 30 ml 1 M NaOH ja 3,43 ml HOAc 2 litraan vettä ja säädettiin

liuoksen ionivahvuus lisäämällä 10,70 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . CE-analyysiä varten valmistettiin ajopuskuriksi 1:1  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -puskuriliuos, jonka kokonaiskonsentraatio 25 oli mM.

### 3. Tulokset ja niiden tarkastelu

#### 3.1. Reaktioiden nopeusvakiot

Lähtöaineiden hydrolyysireaktioille laskettiin nopeusvakiot. Nopeusvakion laskemiseksi muodostettiin ensimmäisen kertaluvun integroidun nopeusyhtälön mukainen suora, jossa x-akselilla on reaktiossa kulunut aika  $t$  ja y-akselilla luonnollinen logaritmi mooliosuudesta ( $\ln x$ ). Mooliosuus  $x$  on

$$x = \frac{A}{\Sigma A}$$

missä  $A$  on valitun piikin normalisoitu pinta-ala CE:ssä ja  $\Sigma A$  piikkien yhteispinta-ala.

Nopeusvakio on  $\ln x/t$ -suoran kulmakertoimen vastaluku. Taulukkoa 3 (ATP / ATP $\gamma$ S) ja taulukkoa 4 (GTP / GTP $\gamma$ S) varten otettiin huomioon reaktion alusta 4–5 ensimmäistä näytettä, jotta saatiin tarkasteltua reaktioita kuvaajan lineaariselta osalta. ATP:n hydrolysoitumisnopeuden on arvioitu normaalipaineessa kasvavan kolmen suuruusluokan verran 75 K:n lämpötilamuutoksen johdosta<sup>32</sup>, ja tutkielmassa lasketuista ATP $\gamma$ S:n nopeusvakioista 60 °C:ssa ja 25 °C:ssa nähdään, että myös ATP $\gamma$ S:n hydrolyysin nopeusvakiot noudattavat suunnilleen tätä suuruusluokan muutosta lämpötilan muuttuessa.

**Taulukko 3.** ATP:n ja ATP $\gamma$ S:n hajoamisen nopeusvakioiden vertailu eri olosuhteissa. Vain ATP $\gamma$ S ajettiin 25 °C:ssa.

Olosuhteet	ATP, 60 °C (min <sup>-1</sup> )	ATP $\gamma$ S, 60 °C (min <sup>-1</sup> )	ATP $\gamma$ S, 25 °C (min <sup>-1</sup> )
NaOH, 10 mM	$3,2 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-3}$	$5,1 \times 10^{-5}$
HCl, 10 mM	$8,5 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-3}$
HEPES, 20 mM	$1,3 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-5}$

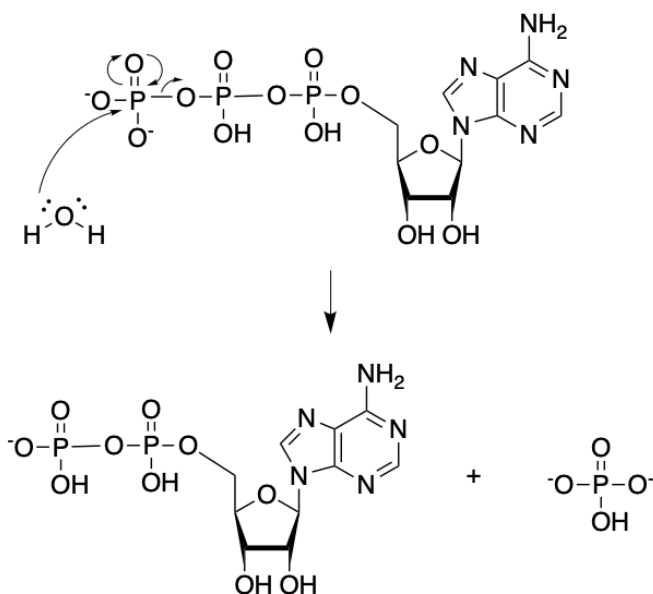
**Taulukko 4.** GTP:n ja GTP $\gamma$ S:n hajoamisen nopeusvakioiden vertailu eri olosuhteissa. GTP $\gamma$ S ajettiin 25 °C:ssa vain happamissa (HCl) olosuhteissa.

Olosuhteet	GTP, 60 °C (min <sup>-1</sup> )	GTP $\gamma$ S, 60 °C (min <sup>-1</sup> )	GTP $\gamma$ S, 25 °C (min <sup>-1</sup> )
NaOH, 10 mM	$3,7 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-3}$	–
HCl, 10 mM	$9,1 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-3}$
HEPES, 20 mM	$1,6 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-3}$	–

### 3.2. ATP- ja ATP $\gamma$ S-tulokset

Yksi tio-substituution tärkeimmistä ominaisuuksista on rikkiatomin kyky stabilisoida nukleosiditrifosfaatteja kuten GTP $\gamma$ S:ä tai ATP $\gamma$ S:ä, entsyymattista hajoamista vastaan. Aikaisemmissa tutkimuksissa entsyymikatalysoidun ATP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktio on todettu hitaammaksi kuin ATP:n, mutta suoria kemiallisia hydrolyysireaktioiden vertailuja ei ole aikaisemmin tehty<sup>33</sup>. Kuitenkin esimerkiksi ATP $\gamma$ S:n ja ATP:n hydrolyysissä lähteviä ryhmiä on tutkittu vastaavissa p-nitrofenyyylifosforotioaatin ja p-nitrofenyyylifosfaatin hydrolyysireaktioissa, joissa tiosubstituutio kasvatti hydrolyysin nopeutta emäksisissä olosuhteissa yli 10-kertaisesti<sup>34</sup>.

Pelkästään ATP:n ja ATP $\gamma$ S:n kemiallisia ominaisuuksia tarkastellessa ATP $\gamma$ S:n hydrolyysin voidaan arvella olevan ATP:n hydrolyysiä nopeampi, ja tässä tutkielmassa saadut tulokset vahvistavat tätä oletusta. ATP:n hydrolyysireaktion mekanismi on esitetty reaktiokaaviossa **2**, ja ATP $\gamma$ S reagoi oletettavasti samalla mekanismilla. ATP $\gamma$ S:n hydrolyysissä mahdollisesti tapahtuva kilpaileva reaktio voi olla desulfurisaatioreaktio, eli rikin korvautuminen molekyyllissä hapella ja ATP $\gamma$ S:n muuttuminen ATP:ksi, jonka on havaittu olevan dominoiva reaktio muun muassa fosforodiesteriyhdisteillä alhaisissa pH-arvoissa<sup>30,35</sup>. Fosforotioaatit voivat alhaisissa pH:issa reagoida diastereomeeriseksi 3',5'-fosfomonotioaateiksi. Desulfurisaatioreaktiota ei kuitenkaan havaittu kummallakaan tutkituista nukleosiditrifosfaateista, ei ATP $\gamma$ S:lla eikä GTP $\gamma$ S:lla.



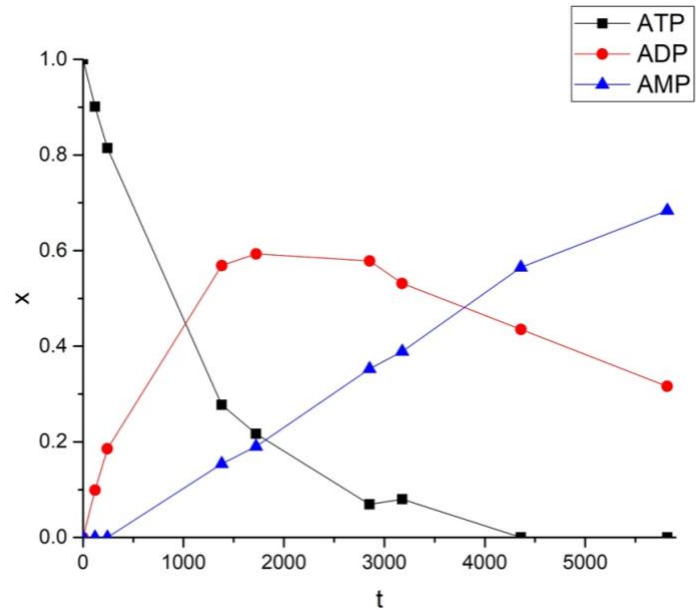
**Reaktiokaavio 2.** ATP:n hydrolyysin reaktiomekanismi. Hydrolyysissä syntyy ADP ja epäorgaaninen fosfaatti. ADP voi vielä reagoida eteenpäin AMP:ksi.

Rikkisubstituution todettiin vaikuttavan hydrolyysiä nopeuttavasti kaikissa olosuhteissa, mutta erityisen huomattavasti happamissa olosuhteissa (HCl, todellinen pH noin 2). Myös aikaisemmissa tutkimuksissa happamissa olosuhteissa suoritettujen tioanalogien hydrolyysireaktiot on todettu luonnollisia tionukleotideja nopeammiksi<sup>30</sup>. ATP on epästabiili hyvin happamissa olosuhteissa, ja tämä tutkimus vahvisti ATP $\gamma$ S:n olevan vielä epästabiilimpi hyvin alhaisissa pH-olosuhteissa.

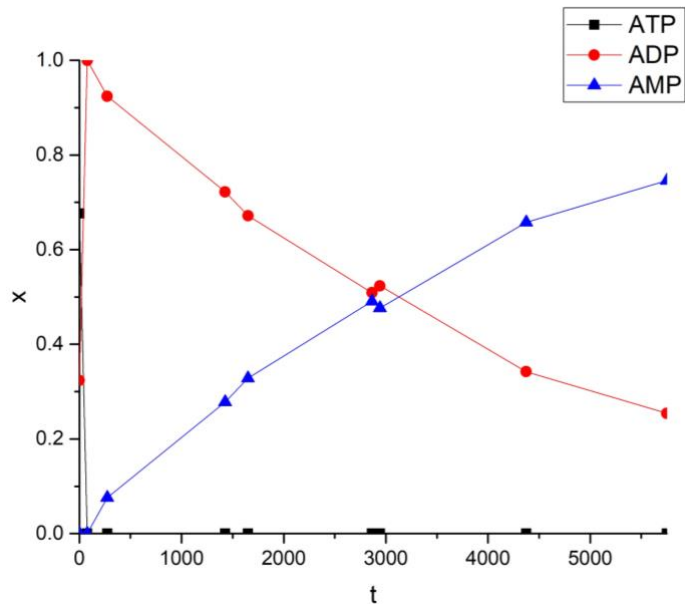
ATP ja ATP $\gamma$ S hajosivat HCl:ssa ADP:ksi ja ADP niin ikään vielä eteenpäin AMP:ksi reaktion alusta asti. ATP $\gamma$ S:n hydrolyysi ADP:ksi oli vielä huomattavasti ATP:n reaktiota nopeampi, ja tio-ATP-piikkiä ei ollut havaittavissa enää 8 minuutin jälkeen. ATP $\gamma$ S:n hydrolyysin nopeus oli jopa 400-kertainen ATP:n nopeuteen verrattuna, ja molemmissa reaktiossa nopeasti syntynyt ADP reagoi eteenpäin AMP:ksi. Kuvaajassa 1 on verrattu ATP $\gamma$ S:n sekä ATP:n hydrolyysireaktion etenemistä ja reaktiossa syntyvien yhdisteiden mooliosuuksia ajan funktiona HCl:ssa.



a) ATP



b) ATP $\gamma$ S

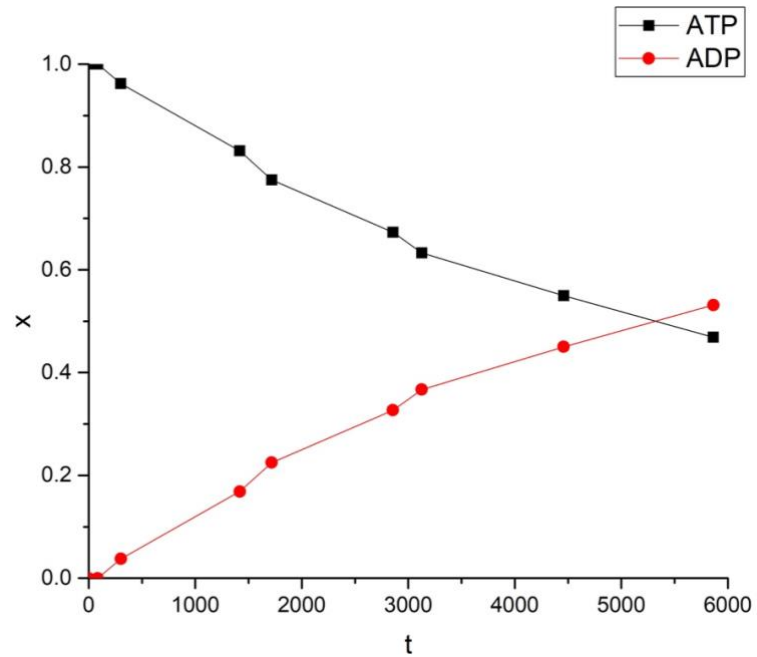


**Kuvaaja 1.** Hydrolyysireaktion eteminen HCl-liuoksessa, 60 °C:ssa. Kuvaajassa **a)** ATP:n ja vastaavasti kuvaajassa **b)** ATP $\gamma$ S:n sekä hydrolyysireaktioissa syntyvien tuotteiden mooliosuudet  $x$  on esitetty ajan  $t$  funktiona. Happamassa liuoksessa myös ADP reagoi nopeasti eteenpäin AMP:ksi.

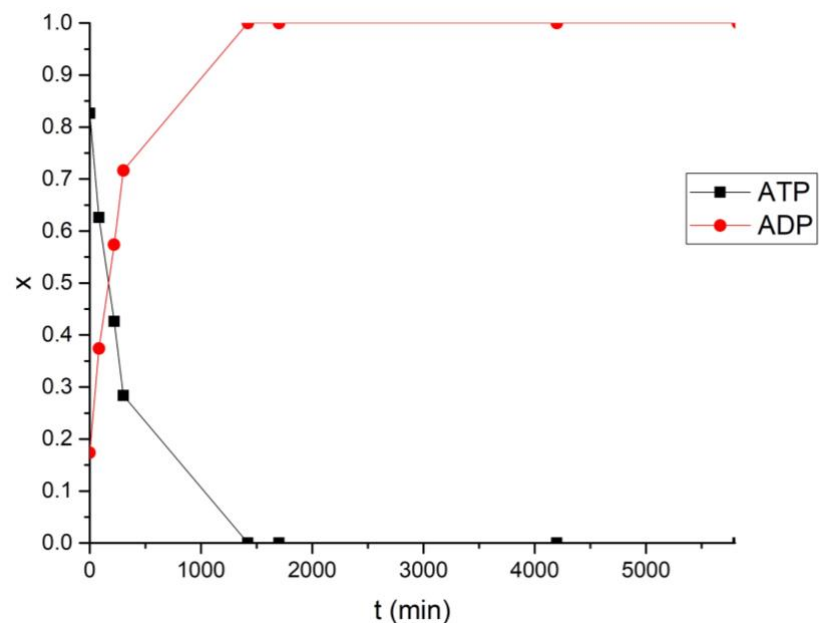
Vastaavissa tutkimuksissa rikkisubstituoitujen ja luonnollisten fosfodiesteriyhdisteiden hydrolyysireaktioiden nopeusero on todettu pienemmäksi muissa pH-arvoissa kuin happamassa pH:ssa. Myös esimerkiksi fosforoditioaattien ja monofosforotioaattien hajoamisen todettiin olevan happamissa olosuhteissa huomattavasti nopeampaa kuin kilpailevien reaktioiden, desulfurisaation ja isomerisaation<sup>30</sup>. Sen sijaan neutraaleissa

olosuhteissa, HEPES-puskuriliuoksessa, reaktio oli huomattavasti hitaampi (kuvaaja 2), eikä reaktio ehtinyt tutkitulla aikavälillä etenemään ADP:stä AMP:ksi. ATP $\gamma$ S:n hydrolyysin nopeus oli noin 40-kertainen, eli ero rikkisubstituoitujen ja luonnollisten nukleotidien hydrolyysireaktioiden välillä oli huomattavasti pienempi kuin happamissa olosuhteissa.

a) ATP



b) ATP $\gamma$ S

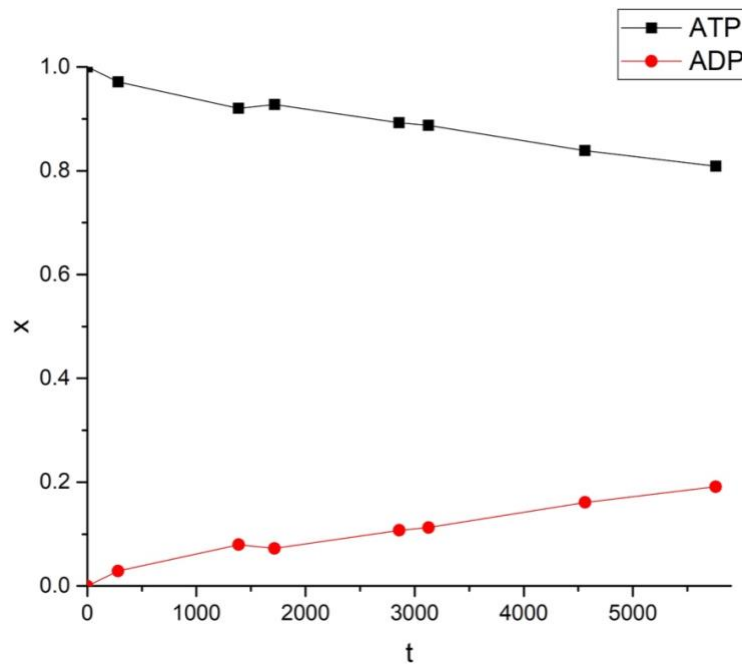


**Kuvaaja 2.** Hydrolyysireaktion eteminen HEPES-puskuriliuoksessa, 60 °C:ssa. Kuvaajassa **a)** ATP:n ja vastaavasti kuvaajassa **b)** ATP $\gamma$ S:n sekä syntyvien tuotteiden mooliosuudet x on esitetty ajan t funktiona.

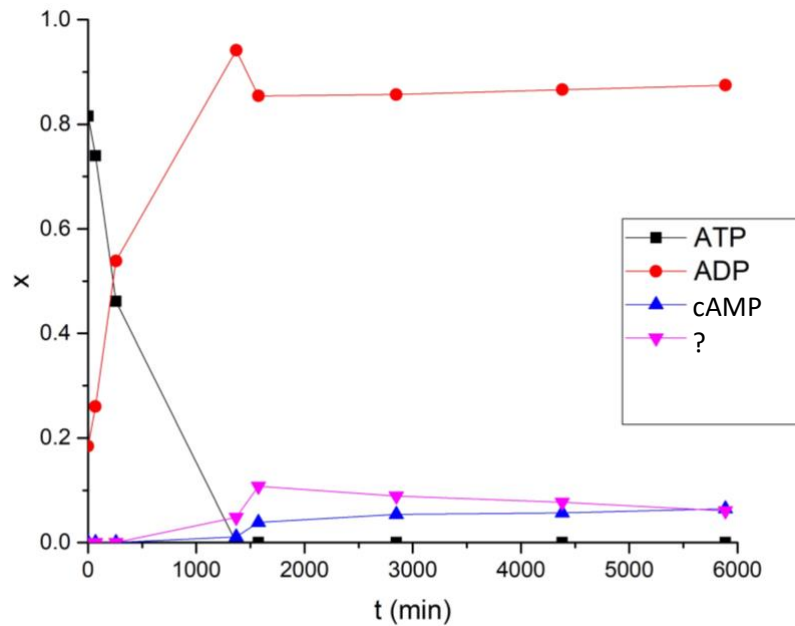
Emäksisissä olosuhteissa luonnollisen ja tiosubstituoidun ATP:n reaktion eteneminen erosi toisistaan jonkin verran. Hydrolyysin nopeus kasvoi noin 70-kertaiseksi tiosubstituution johdosta, ja reaktion eteminen NaOH-liuoksessa on esitetty kuvaajassa **3**. Emäksisissä olosuhteissa ATP $\gamma$ S:n hydrolyysissä syntyi yhdistettä, joka todettiin sykliseksi AMP:ksi (cAMP, *cyclic AMP*). cAMP:n rakenne on esitetty kuvassa **11**. Lisäksi ATP $\gamma$ S:n hydrolyysissä syntyi myös tuntematon yhdistepiikki, jota ei pystytty varmasti todentamaan. Kyseinen yhdiste voi mahdollisesti olla 3'-AMP, jota on osoitettu syntyvän cAMP:n hydrolysoituessa<sup>36</sup>.

Luonnollisten nukleosiditriposfaattien hajoamisen nopeus kasvoi pH:n laskiessa, mikä vastaa aikaisempia tietoja ATP:n ei-entsymaattisen hydrolyysin kinetiikasta<sup>37</sup>. Tiosubstituution myötä hydrolyysin nopeus kasvoi edelleen matalammassa pH:ssa, mutta happamassa pH:ssa reaktionopeuden kasvu verrattuna muihin pH-arvoihin oli huomattavaa.

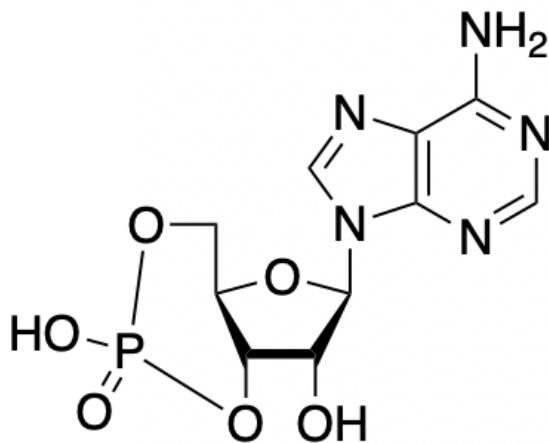
a) ATP



b) ATP $\gamma$ S



**Kuvaaja 3.** Hydrolyysireaktion eteminen 10 mM NaOH-liuoksessa, 60 °C:ssa. Kuvaajassa **a)** ATP:n ja vastaavasti kuvaajassa **b)** ATP $\gamma$ S:n sekä syntyvien tuotteiden mooliosuudet x on esitetty ajan t funktiona.

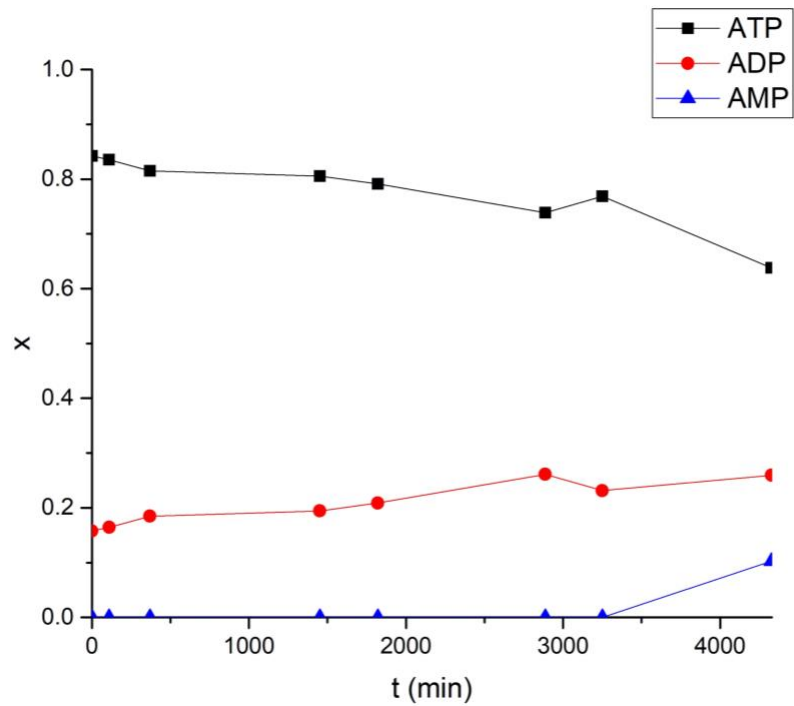


**Kuva 11.** cAMP, syklisen AMP:n rakenne.

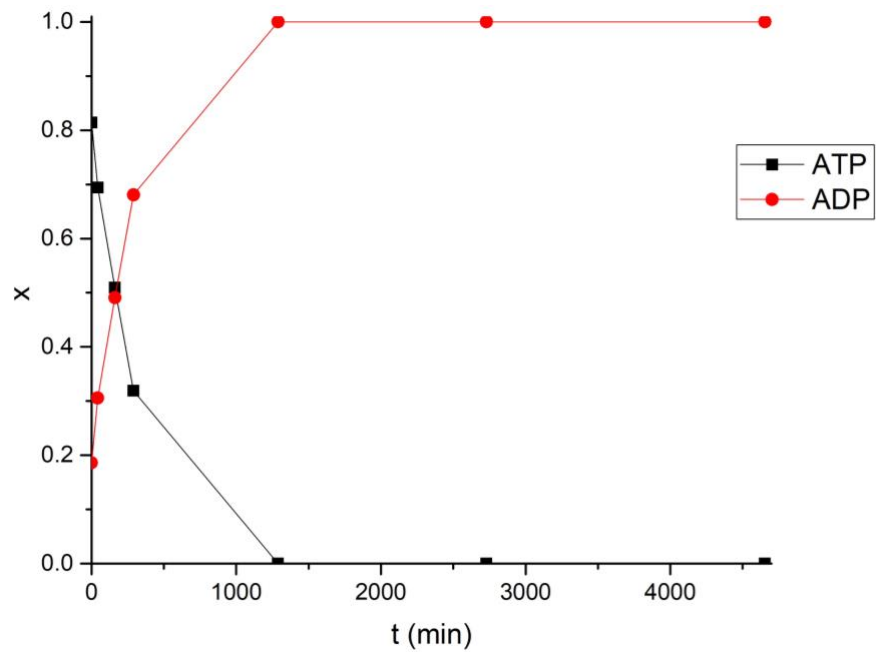
Lämpötilan vaikutusta nukleosiditriposfaattien hydrolyysiin tutkittiin suorittamalla ATP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktio 25 asteessa. Kaikki ATP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktiot olivat hitaita 25 asteessa, mutta emäksisissä olosuhteissa hydrolyysi eteni edelleen AMP:in muodostumiseen asti. HCl:ssä reaktio oli edelleen huomattavasti nopein, mutta matalammassa lämpötilassa ATP $\gamma$ S:n reaktion etenemistä ADP:stä AMP:ksi ei tutkitulla

aikavälillä havaittu, toisin kuin vastaavissa ATP $\gamma$ S- ja ATP-reaktioissa 60 asteessa. NaOH:ssa ATP $\gamma$ S:n hydrolyysi oli jopa nopeampi 25 °C:ssa kuin ATP:n reaktio 60 °C:ssa. Hydrolyysireaktioiden etenemistä 25 asteessa sekä syntyneiden tuotteiden mooliosuuksia ajan funktiona on kuvattu kuvaajassa 4.

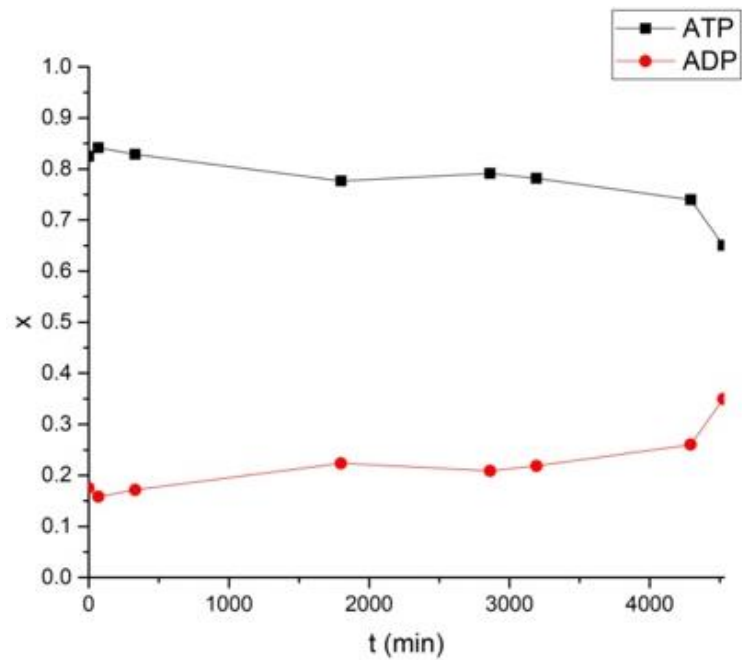
a) b) ATP $\gamma$ S, NaOH



b) ATP $\gamma$ S, HCl



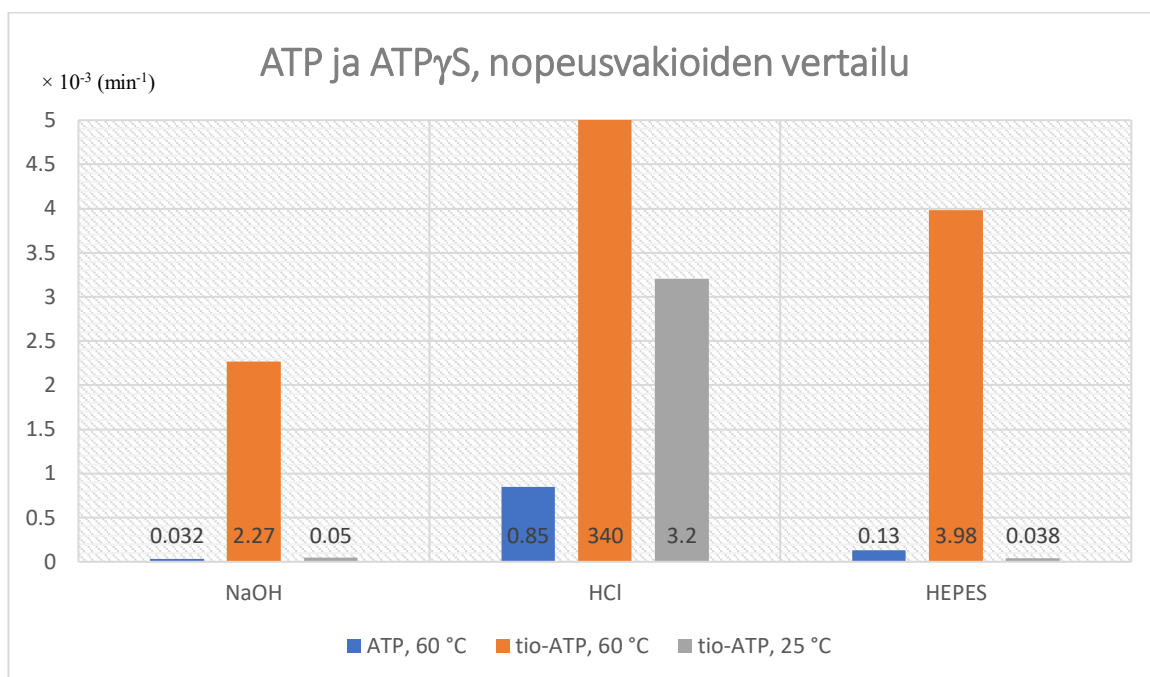
c) ATP $\gamma$ S, HEPES



**Kuvaaja 4.** ATP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktion eteneminen 25 °C:ssa. Kuvaajassa ATP $\gamma$ S:n sekä reaktiossa syntyvien tuotteiden mooliosuudet x on esitetty ajan t funktiona. Kuvaaja **a)** NaOH, 25 °C, ja **b)** HCl, 25 °C **c)** HEPES, 25 °C.

Suoritettujen reaktioiden perusteella tionukleotidien hydrolyysillä on hyvin suuri lämpötilariippuvuus. Taulukossa **5** on esitetty nopeusvakioiden vertailua tutkituissa olosuhteissa ATP- ja ATP $\gamma$ S-reaktioiden välillä.

**Taulukko 5.** ATP:n ja ATP $\gamma$ S:n nopeusvakioiden vertailu, 60 °C tai 25 °C.

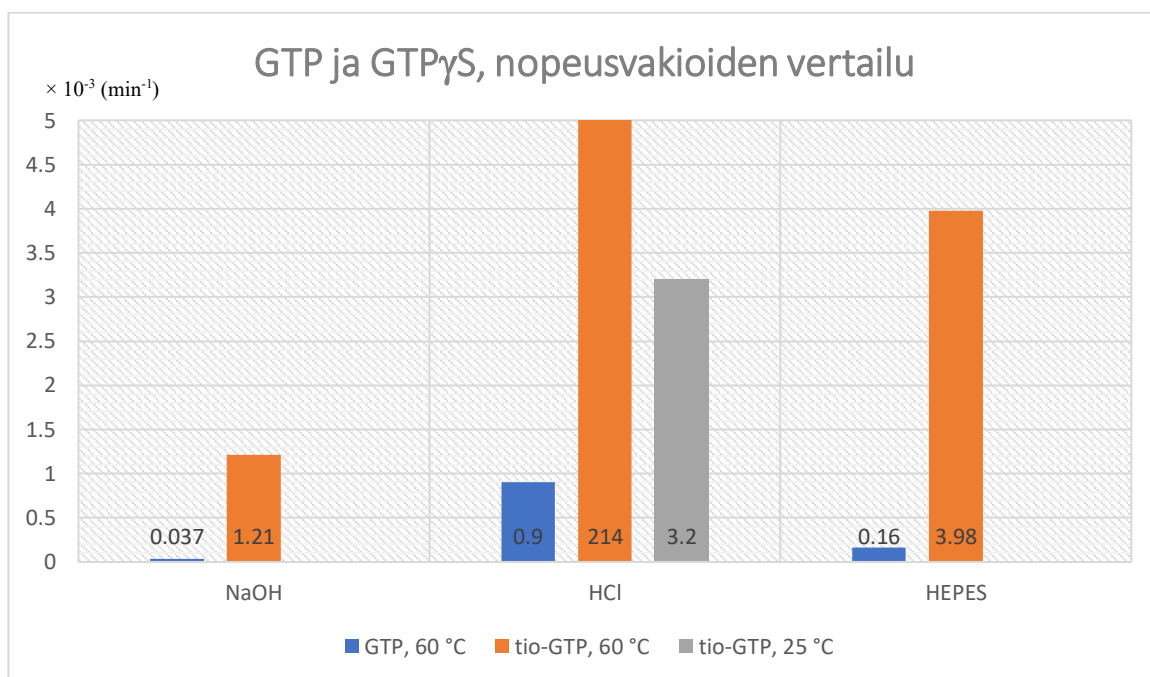


### 3.3. GTP- ja GTP $\gamma$ S-tulokset

Toinen kokeellisesti tutkittu nukleosiditriposfaatti oli GTP ja sen rikkianalogi GTP $\gamma$ S eli guanosiini-5'-( $\gamma$ -tio)trifosfaatti. Tio-GTP on tunnettu ja hyvin tutkittu tioyhdiste<sup>23,24</sup>. Kemiallisiin ominaisuuksiin perustuen GTP $\gamma$ S:n ei-entsymaattisen hydrolyysireaktion oletettiin olevan GTP:tä nopeampi. Hydrolyysissa GTP hajoaa GDP:ksi (guanosiinidifosfaatti) ja epäorgaaniseksi fosfaatiksi. GDP voi vielä reagoida eteenpäin GMP:ksi (guanosiinimonofosfaatti).

Myös GTP $\gamma$ S hajosi kaikissa testatuissa pH- ja lämpötilaolosuhteissa nopeammin kuin GTP. GTP $\gamma$ S:n hydrolyysi todettiin huomattavasti nopeimmaksi happamissa olosuhteissa (HCl, pH noin 2), rikkianalogin hydrolyysin nopeuden ollessa monisatakertainen verrattuna GTP:n hydrolyysiin. Tulokset vastaavat tunnettuja tietoja vastaavanlaisisten tioanalogien hydrolyysireaktioista happamissa olosuhteissa<sup>30</sup>. Taulukossa 6 on havainnollistettu GTP $\gamma$ S:n ja GTP:n hydrolyysireaktion nopeuksien vertailua.

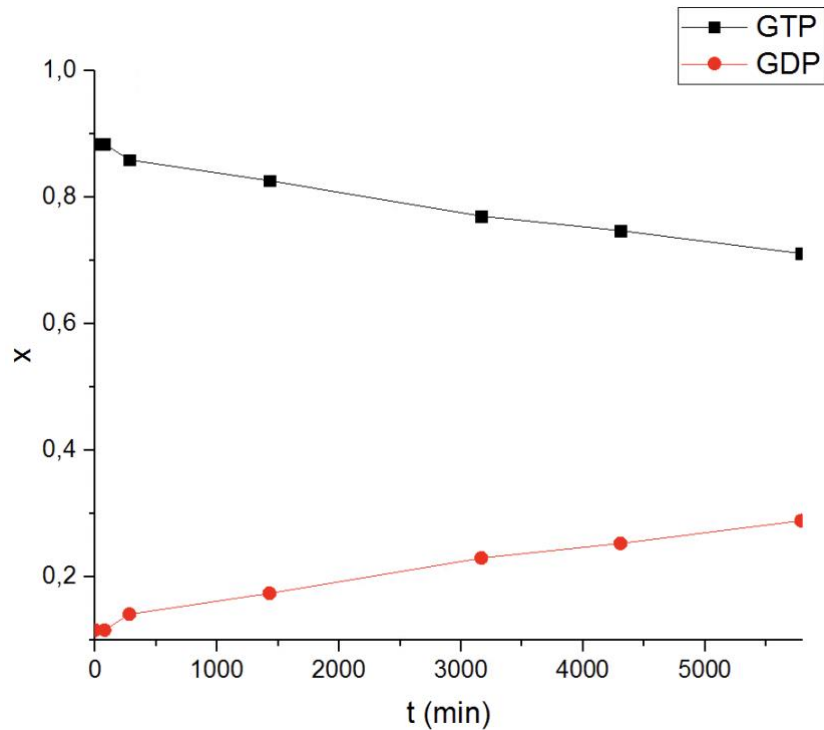
**Taulukko 6.** GTP:n ja GTP $\gamma$ S:n nopeusvakioiden vertailu, 60 °C tai 25 °C. Tiosubstituutio nopeutti hajoamista huomattavasti, erityisesti HCl:ssä.



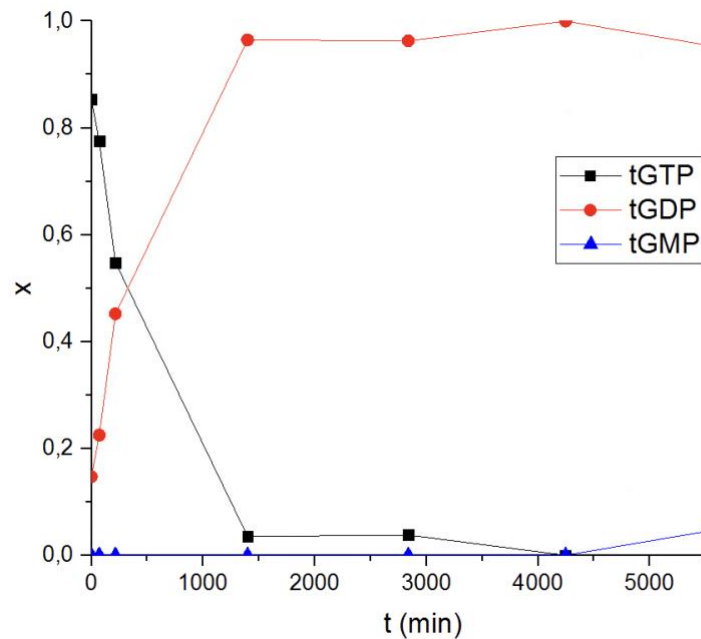


ATP:n ei-entsymaattisen hydrolyysin hajoamisnopeus on todettu hitaimmaksi korkeassa pH:ssa, mitä voitiin olettaa myös GTP:n hydrolyysistä<sup>37</sup>. Niin ikään GTP $\gamma$ S:n tapauksessa hydrolyysinopeus oli alhaisin emäksisessä pH:ssa. Emäksisissä olosuhteissa NaOH:ssa GTP $\gamma$ S:n hydrolyysi oli noin 32 kertaa nopeampi kuin GTP:n. GTP:n reaktio oli hidas, mutta koska rikkisubstituution myötä reaktiossa syntyi nopeasti GDP:tä, ehdittiin tutkitulla aikavälillä havaita myös GMP:n muodostuminen. Kuvaajassa 5 on esitetty GTP $\gamma$ S:n sekä GTP:n hydrolyysireaktion eteneminen NaOH:ssa ja reaktiossa syntyvien yhdisteiden mooliosuudet ajan funktiona.

a) GTP



b) GTP $\gamma$ S

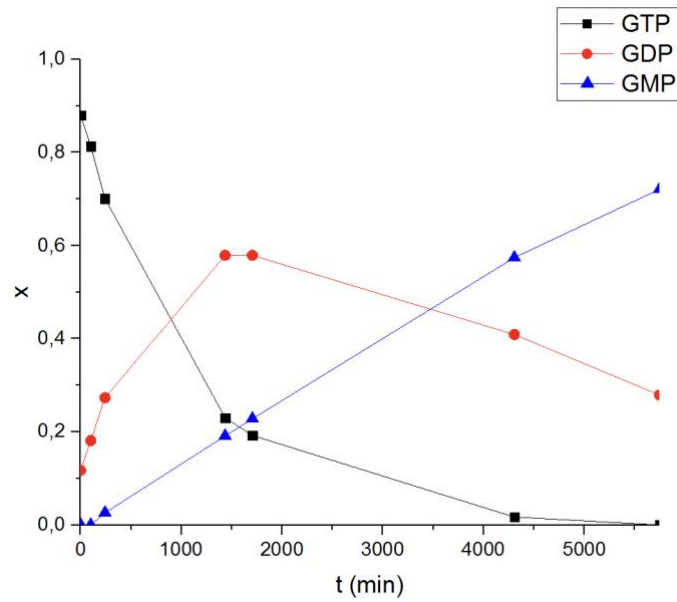


**Kuvaaja 5.** GTP:n ja GTP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktion etenemisen vertailu. Kuvaajassa **a)** GTP, NaOH, 60 °C **b)** GTP $\gamma$ S, NaOH, 60 °C. Lähtöaineiden sekä reaktiossa syntyvien tuotteiden mooliosuudet x on esitetty ajan t funktiona.

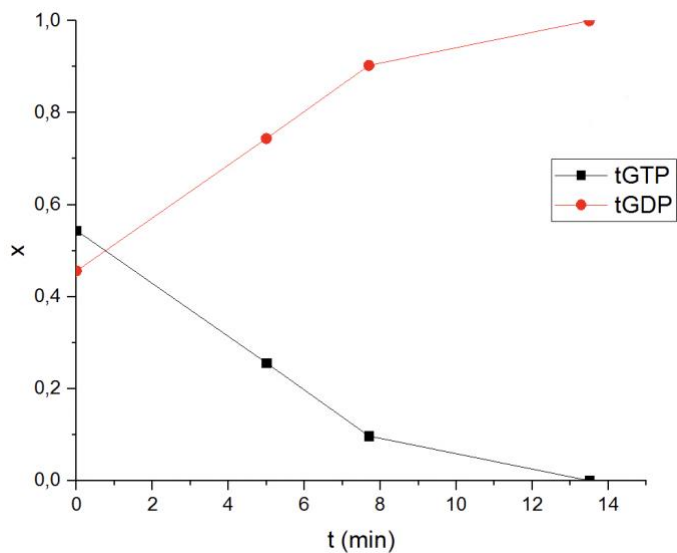
Toisin kuin GTP:n hydrolyysi HCl:ssa, jossa GDP reagoi alusta asti nopeasti eteenpäin GMP:ksi, GTP $\gamma$ S:n reaktion ei havaittu tutkitulla aikavälillä kummassakaan testatussa lämpötilassa etenevän GMP:n muodostumiseen asti. GTP $\gamma$ S:n hydrolyysin nopeus oli noin 230-kertainen verrattuna GTP:n hydrolyysiin.

GTP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktio HCl:ssa pysäytettiin 0,5 M HEPES-liuoksella (noin 2 mikrolitraa per näyte) sekä jäähauteella. Näytteitä säilytettiin väliaikana pakkasessa, ja ne analysoitiin CE:llä mahdollisimman nopeasti. GTP $\gamma$ S:sta saatiin vain 4 näytepistettä, sillä GTP $\gamma$ S hävisi alle 14 minuutin sisällä, mikä vaikuttaa huomattavasti tulosten tarkkuuteen. Kuvaaja 6 kuvaa GTP $\gamma$ S:n sekä GTP:n hydrolyysireaktioiden etenemistä HCl:ssa sekä reaktiossa syntyvien yhdisteiden mooliosuuksia ajan funktiona.

a) GTP



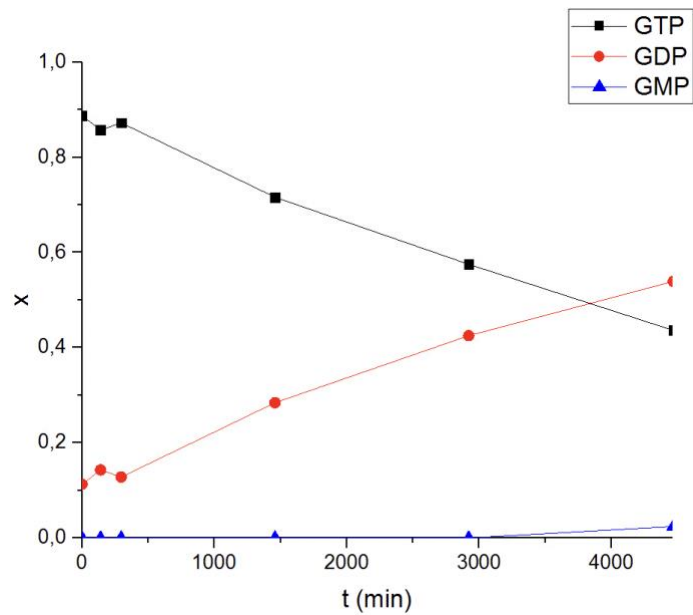
b) GTP $\gamma$ S



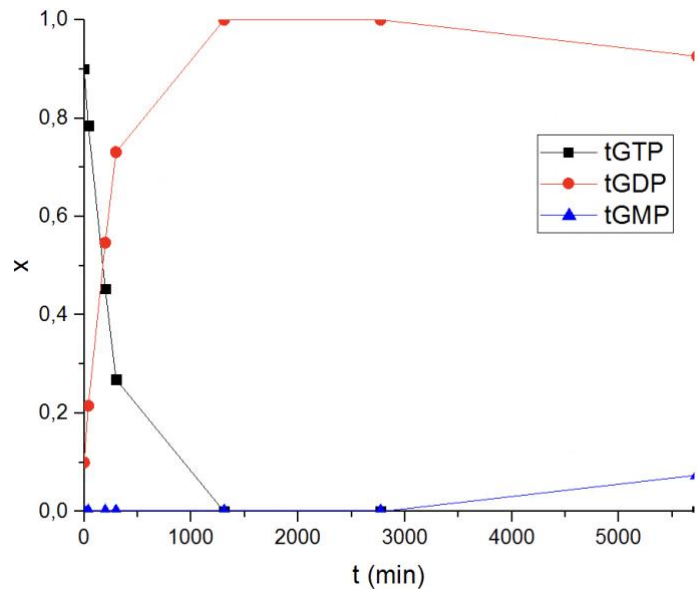
**Kuvaaja 6.** GTP:n ja GTP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktion etenemisen vertailu. Kuvaajassa **a)** GTP, HCl, 60 °C **b)** GTP $\gamma$ S, HCl, 60 °C. Lähtöaineiden sekä reaktiossa syntyvien tuotteiden mooliosuudet  $x$  on esitetty ajan  $t$  funktiona.

HEPES-puskuriliuoksessa GTP $\gamma$ S-reaktio oli noin 25 kertaa vastaavaa GTP:n hydrolyysia nopeampi. Kuvaajassa 7 on havainnollistettu GTP $\gamma$ S:n sekä GTP:n hydrolyysireaktion etenemistä HEPES-puskuriliuoksessa sekä reaktiossa syntyneiden yhdisteiden mooliosuuksia kuluneen ajan funktiona.

a) GTP

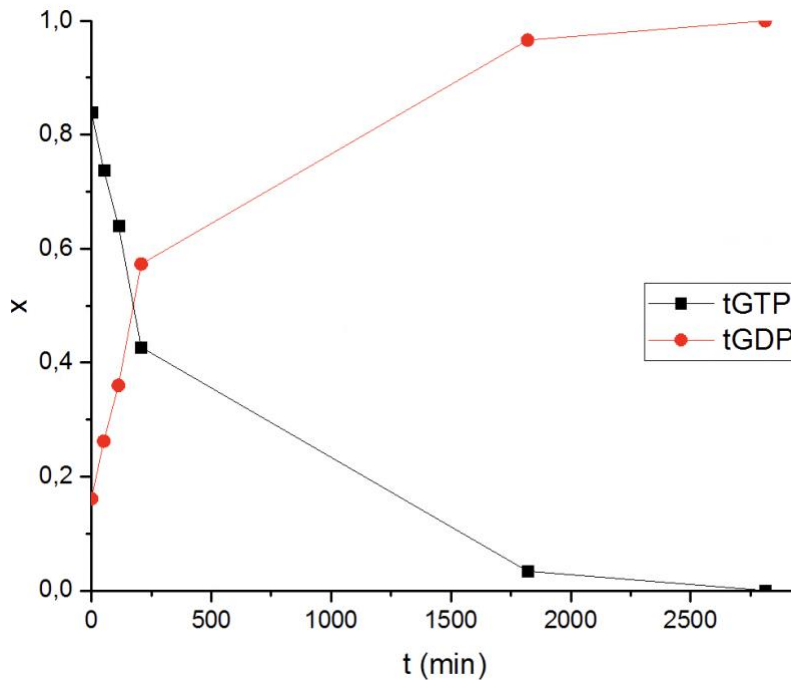


b) GTP $\gamma$ S



**Kuvaaja 7.** GTP:n ja GTP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktion etenemisen vertailu. Kuvaajassa **a)** GTP, HEPES, 60 °C ja **b)** GTP $\gamma$ S, HEPES, 60 °C. Lähtöaineiden sekä reaktiossa syntyvien tuotteiden mooliosuudet x on esitetty ajan t funktiona.

Lämpötilan vaikutusta hydrolyysin nopeuteen ja etenemiseen tutkittiin suorittamalla GTP $\gamma$ S:n reaktio HCl:ssa 25 asteessa. Reaktionopeus oli matalammassa lämpötilassa huomattavasti hitaampi kuten muissakin vastaavissa reaktioissa, mutta se oli silti noin 3 kertaa nopeampi kuin luonnollisen GTP:n hydrolyysi 60 °C:ssa. Hydrolyysin eteneminen on esitetty kuvaajassa **8**. GTP $\gamma$ S:n hydrolyysissa ei alhaisemmassakaan lämpötilassa havaittu GMP:n muodostumista, toisin kuin GTP:n reaktiossa.



**Kuvaaja 8.** GTP $\gamma$ S:n hydrolyysireaktion eteminen HCl:ssä, 25 °C:ssa.

### 3.4. Seleenianalogin hydrolyysin tulokset

Anu Nieminen (Turun yliopisto)<sup>38</sup> on tutkinut samankaltaisia seleenianalogeja aikaisemmin, ja seleenianalogeilla havaittiin, että osa hydrolyysireaktioista hidastui ja osa nopeutui reaktion edetessä. Tässä työssä haluttiin tarkastella seleenianalogien käyttäytymistä tarkemmin. Kahden rinnakkaismenetelmän avulla voitiin tunnistaa varmasti kaikki reaktiotuotteet molemmista analyyseistä sekä varmistaa tuotteiden suhteet oikein. Näin voitiin myös yrittää havaita, mikäli reaktioissa muodostuu nukleofiileja, jotka nopeuttavat reaktiota entisestään.

Dinukleosidipyrofosfaatti-seleenianalogin hydrolyysireaktio todettiin kohtalaisen nopeaksi neutraalilla pH-alueella 7, mikä saattaa haitata tutkitun seleenianalogin soveltuvuutta entsyymi-inhibiittoriksi. Reaktiossa syntyneet tuotteet voitiin todeta pääasiassa hyvin yhteneväisten HPLC- ja CE-tulosten avulla luotettavasti, mutta reaktioissa syntyi myös tuntemattomaksi jääneitä yhdisteitä, todennäköisesti selenonukleosidin pidemmälle hapettuneita muotoja, joiden arveltiin vaikuttavan hydrolyysireaktion nopeuden muutoksiin. Tulokset eivät tässä kohtaa olleet analyyysien

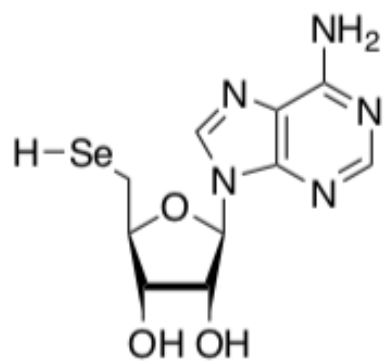
välillä täysin yhteneväiset, eikä pystytty varmasti sanomaan, miten HPLC:ssä näkyneet tunnistamattomat yhdisteet käyttäytyivät CE:ssä.

Kaikille reaktioille laskettiin nopeusvakiot niin HPLC- kuin CE-tuloksista. Nopeusvakiot on esitetty taulukossa 7, jota varten otettiin huomioon reaktion alusta 4–5 ensimmäistä näytettä, jotta saatiin tarkasteltua reaktioita kuvaajan lineaariselta osalta. Nopeusvakiot vastasivat hyvin toisiaan HPLC:n ja CE:n välillä.

**Taulukko 7.** Nopeusvakiot laskettuna lähtöaineen hajoamiselle sekä CE:n että HPLC:n mukaan.

pH	CE (min <sup>-1</sup> )	HPLC (min <sup>-1</sup> )
4	$4,4 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$
6	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$5,4 \cdot 10^{-5}$
7	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
8	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$
9	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$
11	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$

Dinukleosidipyrofosfaatti-selenianalogin reaktioissa voitiin todennäköisesti todeta syntyneen voimakkaita nukleofiilejä, joiden lisääntyminen reaktion edetessä aiheutti erilaisia reaktiotuotteita ja -reittejä ja sitä kautta reaktion nopeutumista tai hidastumista sen edetessä. Yksi reaktiotuotteista oli selenonukleosidi (kuva 12), jota havaittiin matalammissa pH:issa 4, 7 ja 6. Sitä ei havaittu muissa tutkituissa pH:issa, joten korkeamman pH:n arveltiin aiheuttavan selenoryhmän hapettumisen pidemmälle. Havainnot vahvistavat aiempia tutkimustuloksia selenianalogien hydrolyysireaktioiden hidastumisesta ja nopeutumisesta reaktion edetessä.



**Kuva 12.** Selenonukleosidin rakenne.

## 4. Johtopäätökset

Tutkielman perusteella tiosubstituutitujen nukleotiditriposfaattien hydrolyysireaktioiden todettiin olevan huomattavasti vastaavia happianalogeja nopeampia, erityisesti happamissa olosuhteissa, joissa ero oli 200-kertainen (GTP) tai jopa 400-kertainen (ATP). Emäksisissä ja neutraaleissa olosuhteissa tiosubstituoitu reaktio oli noin 25–70-kertaa nopeampi. Kokeellisessa osuudessa osoitettiin, että tionukleotidien hydrolyyttisen pysyvyyden muuttuminen rikkisubstituution seurauksena luo hyödyllistä datapohjaa seuraaviin tionukleotidien tutkimuksiin tai niiden käyttökohteita ajatellen. Rikkisubstituutitujen nukleosiditriposfaattien ei-entsymaattiset hydrolyysireaktiot ovat luonnollisten nukleosiditriposfaattien hydrolyysiä huomattavasti nopeampia, mikä on sopusoinnussa aikaisempien muilla tionukleotidijohdannaisilla tehtyjen tutkimusten kanssa. Nukleosiditriposfaattien hydrolyysin lämpötilariippuvuus todettiin hyvin suureksi.

Tio-analogien merkittävyys esimerkiksi lääketieteellisissä tai biokemiallisissa prosesseissa kasvane, kun tutkimuksia ja materiaalia niiden ominaisuuksista saadaan kerättyä lisää. Niiden ominaisuudet mahdollistavat hyvin monipuoliset lähtökohdat terapeuttisille sovelluksille tulevaisuudessa. Tutkielmassa esiteltyjen aikaisempien tionukleotiditutkimusten tulokset osoittavat, että tiosubstituutiolla on erityisiä sekä käytännöllisiä ominaisuuksia verrattuna vastaaviin rikittömiin nukleotideihin, minkä takia niiden tutkiminen on monesta näkökulmasta tärkeää.



## Lähdeluettelo

- (1) Regnier M.; Lee D.M.; Homsher E., ATP analogs and muscle contraction: mechanics and kinetics of nucleoside triphosphate binding and hydrolysis, *Biophys. J* **1998**, 74, 3044-3058
- (2) Dunn J.; & Grider M. H.; *Physiology, Adenosine Triphosphate* [online] StatPearls Publishing, High Point University, Yhdysvallat, **2020**. Viitattu 19.04.2020. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553175/?report=reader>
- (3) Yukawa A; Watanabe R.; Noji H., Effects of an ATP analogue, adenosine 5'-[ $\alpha$ -thio]-triphosphate, on F1-ATPase rotary catalysis, torque generation, and inhibited intermediated formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2015**, 458, 515-519
- (4) Mildred C.; Some Properties of the Phosphorothioate Analogues of Adenosine Triphosphate as Substrates of Enzymic Reactions, *Acc. Chem. Res* **1982**, 326-332
- (5) ATP & ADP – Biological Energy,  
<https://www.biologyonline.com/tutorials/biological-energy-adp-atp>, Viitattu 20.04.2020
- (6) Wojtczak B. A.; Sikorski P. J.; Fac-Dabrowska K.; Nowicka A.; Warminski M.; Kubacka D.; Nowak E.; Nowotny M.; Kowalska J.; Jemielity J., 5'-Phosphorothiolate Dinucleotide Cap Analogues: Reagents for Messenger RNA Modification and Potent Small-Molecular Inhibitors of Decapping Enzymes. *J. Am. Chem. Soc* **2018**, 140, 5987-5999
- (7) Wang M.; Qin L.; and Tang B.; MicroRNAs in Alzheimer's Disease, *Front. Genet.* **2019**, 10
- (8) Iyer S.; Hengge A. C., The Effects of Sulfur Substitution for the Nucleophile and Bridging Oxygen Atoms in Reactions of Hydroxyalkyl Phosphate Esters. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4819-4829

- (9) Cech T. R.; Herschlags D.; Piccirilli J. A.; Pylet A. M.; RNA Catalysis by a Group I Ribozyme, *J. Biol. Chem* **1992**, 267, 17479-17482
- (10) Li N.; Frederiksen J. K.; Piccirilli J. A., Synthesis, Properties, and Applications of Oligonucleotides Containing an RNA Dinucleotide Phosphorothiolate Linkage, *Acc. Chem. Res* **2011**, 44, 1257-1269
- (11) Wang L.; Chen S.; Xu T.; Koli T.; Wishnok J. S.; Zhou X.; You D.; Deng Z.; Dedon P. C., Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 11, 709-10
- (12) Eckstein F., Investigation of enzyme mechanisms with nucleoside phosphorothioates, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1975**, 14, 160-166
- (13) Eckstein F., Phosphorothioate Analogues of Nucleotides — Tools for the Investigation of Biochemical Processes, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 423-439
- (14) Diop-Frimpong B.; Prakash T. P.; Rajeev K. G.; Manoharan M.; Egli M., Stabilizing contributions of sulfur-modified nucleotides: crystal structure of a DNA duplex with 2'-O-[2-(methoxy)ethyl]-2-thiothymidines, *Nucleic Acids Res* **2005**, 33, 5297-5307
- (15) Wong K.; Gu H.; Zhang S.; Piccirilli J. A.; Harris M. E., York D. M., Characterization of the Reaction Path and Transition States for RNA Transphosphorylation Models from Theory and Experiment, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2012**, 51, 647-651
- (16) Scoles D. R.; Minikel E. V.; Pulst S. M.; Antisense oligonucleotides. *Neurol. Genet.* **2019**, 5, 1-13
- (17) Lorenz P.; Baker B. F.; Bennett C. F.; Spector D. L., Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides Induce the Formation of Nuclear Bodies. *Mol. Biol. Cell.* **1998**, 9, 1007-1023
- (18) Mori K.; Boiziaul C.; Cazenavel C.; Matsukura M.; Subasinghe C.; Cohen J. S.; Broder S.; Toulmé J. J.; Stein C. A., Phosphoroselenoate oligodeoxynucleotides:

synthesis, physico-chemical characterization, anti-sense inhibitory properties and anti-HIV activity, *Nucleic Acids Res* **1989**, 17, 8207-8219

(19) Watts J. K.; Johnston B. D.; Jayakanthan K.; Wahba A. S.; Pinto B. M.; Damha M. J., Synthesis and Biophysical Characterization of Oligonucleotides Containing a 4'-Selenonucleotide, *J. Am. Chem. Soc* **2008**, 130, 8578-8579

(20) Frederiksen J. K.; Li N.; Das R.; Herschlag D.; Piccirilli J. A., Metal-ion rescue revisited: biochemical detection of site-bound metal ions important for RNA folding, *RNA (Cambridge)*, **2012**, 18, 1123-1141

(21) Frederiksen J. K.; Piccirilli J. A., Identification of catalytic metal ion ligands in ribozymes, *Methods (San Diego, Calif.)* **2009**, 49, 148-166

(22) Milligan J. F.; Uhlenbeck O. C., Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase, *Methods Enzymol.* **1989**, 180, 51-62

(23) Carroll A. G.; Rhoads A. R.; Wagner P. D., Hydrolysis-resistant GTP analogs stimulate catecholamine release from digitonin-permeabilized PC12 cells, *J. Neurochem.* **1990**, 930-936

(24) Denis D.; Riendeau D., Activation of 5-Lipoxygenase Guanosine 5'-0-(3-Thiotriphosphate) and Other Nucleoside Phosphorothioates: Redox Properties, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, 273, 592-596

(25) Karim A. M.; Thompson R. C., Guanosine 5'-0-(3-Thiotriphosphate) as an Analog of GTP in Protein Biosynthesis, *J. Biol. Chem* **1986**, 261, 3238-3243

(26) Gurer C.; Hoglund A.; Hoglund S.; Luban J., ATP S Disrupts Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virion Core Integrity, *J. Virol.* **2005**, 79, 5557-5567

(27) Guga P.; Koziółkiewicz M., Phosphorothioate Nucleotides and Oligonucleotides - Recent Progress in Synthesis and Application, *Chem. Biodivers.* **2011**, 8, 1642-1681

(28) Umemoto T.; Wada T., Nitromethane as a scavenger of acrylonitrile in the deprotection of synthetic oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 4251-4253

- (29) Eguaojie O.; Cooke L. A.; Martin P. M. L.; Ravalico F.; Conway L. P.; Hodgson D. R. W.; Law C. J.; Vyle J. S., Synthesis of novel pyrophosphorothiolate-linked dinucleoside cap analogues in a ball mill, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 1201-1205
- (30) Ora M.; Järvi J.; Oivanen M.; Lönnberg H., Hydrolytic Reactions of the Phosphorodithioate Analogue of Uridylyl(3',5')uridine: Kinetics and Mechanisms for the Cleavage, Desulfurization, and Isomerization of the Internucleosidic Linkage, *J. Org. Chem.* **2000**, 2651-2657
- (31) Elzagheid M.; Oivanen M.; Lönnberg H.; Klika K. D.; Jones B. C. N. M.; Cosstick R., Hydrolytic Reactions of 3'-Deoxy-3'-thioinosylyl-(3'→>5')-uridine; An RNA Dinucleotide Containing a 3'-S-Phosphorothiolate Linkage, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **1999**, 18, 2093-2108
- (32) Leibrock E.; Bayer P.; Lüdemann H.-D.; Nonenzymatic hydrolysis of adenosinetriphosphate (ATP) at high temperatures and high pressures, *Biophys. Chem.* **1995**, 175-180
- (33) Peck M. L.; Herschlag D.; Adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate (ATP S) is a substrate for the nucleotide hydrolysis and RNA unwinding activities of eukaryotic translation initiation factor eIF4A, *RNA* **2003**, 9, 1180-1187
- (34) Irina E.; Hengge C.; Hengge A. C., Comparisons of Phosphorothioate and Phosphate Monoester Transfer Reactions: Activation Parameters, Solvent Effects, and the Effect of Metal Ions. *J. Am. Chem. Soc* **1999**, 121, 2156–2163
- (35) Almer H.; Strömberg R., Base Catalysis and Leaving Group Dependence in Intramolecular Alcoholysis of Uridine 3'-(Aryl phosphorothioate)s. *J. Am. Chem. Soc* **1996**, 118, 7921-7928
- (36) Mikkola S., Hydrolytic reactions of diadenosine 5',5'-triphosphate, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 770–776
- (37) Taqui Khan M. M.; Srinivas Mohan M., Kinetics of adenosine-5'-triphosphate hydrolysis, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1974**, 36, 707-709

(38) Anu Nieminen, *Nukleotidien HPLC-ESI-MS -analyysimenetelmät*, pro gradu -  
tutkielma, Turun yliopisto, **2018**