

Hg(II)-välitteinen emäspariutuminen DNA-templatoidussa N(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiassa

Heidi Kähkölä

Pro gradu -tutkielma

Lääkekehityksen kemia

Kemian laitos

Turun yliopisto

Maaliskuu 2022

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

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

KÄHKÖLÄ, HEIDI: Hg(II)-välitteinen emäspariutumisen DNA-templatoitussa *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioissa

Pro gradu -tutkielma, 44 s., liitteet 20 s.

Maaliskuu 2022

Neljän eri nukleoemäksen muodostamista sekvensseistä koostuva DNA sisältää kaiken elämälle tarvittavan geneettisen informaation. DNA:lla on monia ainutlaatuisia ominaisuuksia, kuten esimerkiksi kyky monistaa ja siirtää geneettistä informaatiota. Näiden ominaisuuksien ansiosta sillä onkin keskeinen rooli kemiallisessa evoluutiossa. Viime vuosikymmenten aikana on kuitenkin herännyt kiinnostus luoda vaihtoehtoisia emäsparijärjestelmiä luonnollisen Watson-Crick-emäsparijärjestelmän rinnalle. Vaihtoehtoisten emäsparijärjestelmien luominen mahdollistaisi geneettisen koodin laajentamisen ja sitä kautta muun muassa uusien biopolymeerien luomisen.

Metalli-ionivälitteistä emäspariutumista on tutkittu yhtenä vaihtoehtona Watson-Crick-emäspariutumiseksi. Kyseinen emäspari muodostuu kahden ligandina toimivan nukleosidin tai niiden analogin sitoutuessa koordinaatiosidoksella samaan metalli-ioniin. Metallionin valinnalla voidaan vaikuttaa metalloitujen emäsparien koordinaatio-ominaisuuksiin, kuten esimerkiksi selektiivisyyteen ja termodynaamiseen stabiiliuteen. Metallionivälitteistä emäspariutumista on hyödynnetty muun muassa nanoteknologiassa ja lääketieteessä.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, kuinka merkuroidun sytydiinin elohopeaionivälitteinen emäspariutumisen eri vastinemästen kanssa vaikuttaa DNA-templatoitun *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktion nopeuteen ja tasapainoon. Tutkimuksessa selvisi, että hyödyntämällä metallionivälitteistä emäspariutumista *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktion tasapainoa voidaan siirtää enemmän tuotteiden puolelle verrattuna reaktioon, jossa metallionivälitteistä emäspariutumista ei käytetä. *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioissa metyyliaminoryhmän tyyppi ja sokerimolekyylin anomeerinen hiili reagoivat muodostaen *N*(Me)-alkoksiamiinoglykosididoksen. Reaktiomekanismi on tunnettu ja sitä hyödynnetään useiden erilaisten glykokonjugaattien valmistuksessa. *N*-glykosididoksen muodostumista voidaan kontrolloida pH:n avulla, sillä kyseinen reaktio on reversiibeli pH:ssa 5 ja lähes irreversiibeli pH:ssa 7.

Avainsanat: elohopea, metallionivälitteinen emäspariutumisen, DNA-templaatti, glykosylaatio

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
1.1. Metallionivälitteinen emäspariutuminen.....	3
1.1.1. Metallionivälitteiset Watson-Crick-emäsparit.....	4
1.1.2. Väärinpariutuneet metallionivälitteiset emäsparit	5
1.1.3. Keinotekoiset metallionivälitteiset emäsparit.....	7
1.2. Merkuroidun 2'-deoksisytidiinin elohopeaionivälitteinen emäspariutuminen...8	
1.2.1. Elohopeaionivälitteinen emäspariutuminen monomeerinä	9
1.2.2. Elohopeaionivälitteinen emäspariutuminen oligonukleotidissa.....	10
1.3. DNA-templatoituvat reaktiot.....	12
1.3.1. Tioetterin muodostuminen	13
1.3.2. Atsidi-alkyyni sykloadditio (Click-reaktio)	14
1.3.3. Aldolikondensaatio	15
1.3.4. N(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio	16
1.4. Metallionivälitteinen emäspariutuminen DNA-templatoituvissa reaktiossa....	20
2. Tulokset ja niiden tarkastelu	20
2.1. Dimeerin synteesi	20
2.2. 5'-O-(Metyyliamino)tymidiinin fosforamidiittirakennuspalikan synteesi	22
2.3. Oligonukleotidien synteesi	23
2.4. Ligaatiotutkimukset.....	24
3. Johtopäätökset ja yhteenveto	30
4. Kokeelliset menetelmät.....	32
4.1. Yleiset menetelmät	32
4.2. 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosin (15) synteesi	32
4.2.1. 6-Trityyli-d-glukoosi-1,2,3,4-tetra-asetatti (TGTA, 10)	32
4.2.2. D-glukoosi-1,2,3,4-tetra-asetatti (GTA, 11).....	32
4.2.3. (1,2,3,4-Tetra-O-asetyyli-glukos-6-yyli)-(2-syanoetyyli)-[N ⁶ -bentsoyyli-5'-O-(4,4'-dimetoksitriityyli)-2'-deoksisytidin-3'-yyli]fosfaatti (12).....	33
4.2.4. 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityyli)-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (13)....	34
4.2.5. 2'-Deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (14)	34
4.2.6. 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (15).....	35
4.3.1. 5'-O-(Metyyliamino)tymidiini (2)	37
4.3.2. 5'-O-[N-(9-Fluorenyylimetoksikarbonyyli)metyyliamino]tymidiini (16)	37
4.3.3. 3'-O-[(2-Syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyliamino)fosfinyyli]-5'-O-[N-(9-fluorenyylimetoksikarbonyyli)metyyliamino]tymidiini (17)	38

4.4	Oligonukleotidien synteesi	38
4.5	Ligaatiotutkimukset	39
	Viitteet	40
	Liitteet	45

Lyhenteet

ACN	Asetonitrili
B-DNA	Oikeakätinen B-tyypin DNA-kaksoiskierre
Bz	Bentsoyyli
CD	Sirkulaarinen dikroismi
CuAAC	Kuparikatalysoitu atsidi-alkyyini sykloadditioreaktio
DCM	Dikloorimetaani
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DMTr	4,4'-Dimetoksitriityli
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
DTS	DNA-templatoitu synteesi
ESI-TOF	Sähkösumutusionisaatio-lentoaika
Fmoc	9-Fluorenyylimetyylioksidikarbonyyli
HAA	Heksyyliammoniumasetaatti
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
PNA	Peptidinukleiinihappo
RNA	Ribonukleiinihappo
RP-HPLC	Korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografia
SPAAC	Rengasjännityksen aiheuttama atsidi-alkyyini sykloadditioreaktio
TEA	Trietyyliamiini
TEAA	Trietyyliammoniumasetaatti
THF	Tetrahydrofuraani
TLC	Ohutkerroskromatografia
UV	Ultraviolettisäteily
Z-DNA	Vasenkätinen Z-tyypin DNA-kaksoiskierre

1. Johdanto

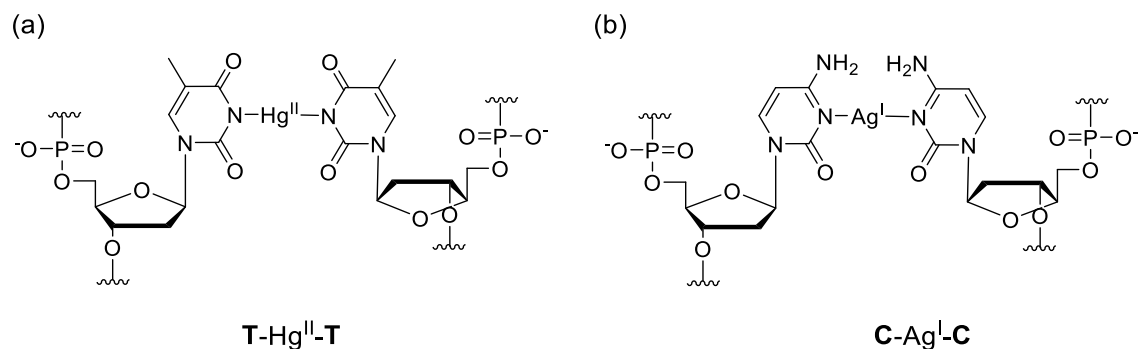
DNA:lla on keskeinen rooli kemiallisessa evoluutiossa ainutlaatuisten ominaisuuksiensa ansiosta. DNA koostuu neljästä erilaisesta heterosyklisestä aromaattisesta nukleoemäksestä, jotka ovat liittyneenä sokeri-fosfaattirunkoon. Tätä sokeri-fosfaattirunkoa pitää yhdessä fosfodiesterisidokset. DNA pystyy varastoimaan, monistamaan ja siirtämään geneettistä informaatiota, joka on taltioitu näihin neljästä erilaisesta nukleoemäksestä, adeniinista, guaniinista, tymiinistä ja sytosiinista, muodostuviin sekvensseihin. DNA:n ainutlaatuiset ominaisuudet perustuvat siihen, että nämä neljä erilaista emästä pystyvät sitoutumaan toisiinsa vain tietyllä tavalla: adeniini pariutuu tymiinin kanssa ja sytosiini pariutuu guaniinin kanssa. Tätä spesifistä emäspariutumista kutsutaan Watson-Crick-emäspariutumiseksi.¹

Viime vuosikymmeninä tutkijoita on alkanut kiinnostaa vaihtoehtoisten emäsparijärjestelmien luominen Watson-Crick-emäsparijärjestelmän rinnalle.² Vaihtoehtoisten emäsparijärjestelmien luominen mahdollistaisi geneettisen koodin laajentamisen ja sitä kautta tarjoaisi uusia mekanismeja luoda uusia biopolymeerejä. Useimmat kehitetyistä vaihtoehtoista emäsparijärjestelmistä perustuvat joko siihen, että emäsparin muodostavat molekyylit sopivat yhteen muotonsa ansiosta tai siihen, että vetysidokset muodostuvat tavallisten emästen sijaan eri rakenteiden välille.³

Myös metalli-ionivälitteistä emäspariutumista on tutkittu vaihtoehtona Watson-Crick-emäspariutumiseksi.¹ Tällainen emäspari muodostuu, kun kaksi ligandina toimivaa nukleosidia tai niiden analogia sitoutuvat molemmat samaan metalli-ioniin koordinaatiosidoksella.^{1,4} Emäsparissa voi olla myös useita metalli-ioneja.⁵ Metallionivälitteisen emäsparin etuna muihin vaihtoehtoisiin emäsparinmuodostusjärjestelmiin verrattuna on se, että metalloidun emäsparin muodostuminen DNA-kaksoiskierteessä usein stabiloi rakennetta. Lisäksi metalli-ionivälitteisen emäsparin muodostamisessa voidaan käyttää useita erilaisia metalli-ioneja, jolloin näiden erilaisia kemiallisia ja fysikaalisia ominaisuuksia voidaan hyödyntää DNA-rakenteessa.⁴ Metallionin valinnalla voidaankin vaikuttaa metalloitujen emäsparien koordinaatio-ominaisuuksiin, kuten esimerkiksi selektiivisyyteen, rakenteeseen ja termodynaamiseen stabiiliuteen.¹ Metallionivälitteistä emäspariutumista voidaan hyödyntää muun muassa DNA-nanoteknologiassa⁶, molekyylikoettimissa⁷, diagnostiikassa ja kemoterapiassa⁸.

Ensimmäiset julkaisut metallivälitteisistä emäspareista ovat peräisin 1960-luvulta, kun Katz⁹ havaitsi Hg^{II}-ionin sitoutuvan kahteen deprotonoituneeseen tymidiiniin. Kuvassa

Ia on esitetty kyseinen emäspari DNA-kaksoiskierteessä. Myöhemmin on havaittu, että myös esimerkiksi Ag^{I} -ioni pystyy muodostamaan vastaavan ”mismatch”-parin kahden sytosiinin kanssa (Kuva 1b). Hg^{II} - ja Ag^{I} -ionien lisäksi metallettiin emäspareihin voidaan käyttää muitakin siirtymämetalli-ioneja, kuten esimerkiksi Cu^{II} , Ni^{II} , Pd^{II} ja Mn^{III} . Nämä metalli-ionit pystyvät muodostamaan neljä koordinaatiosidosta.⁴



Kuva 1. (a) Hg^{II} -välitteinen tyymiini—tyymiini-emäspari; (b) Ag^{I} -välitteinen sytosiini—sytosiini-emäspari. Kuva mukailtu lähteestä ⁴.

Nukleiinihapoilla ja niiden keinotekoisilla analogeilla on useita käyttökohteita muun muassa lääketieteessä sekä bio- ja nanoteknologiassa.⁵ Yksi mielenkiintoinen mahdollisuus on käyttää nukleiinihapposekvenssiä muiden reaktioiden kuin luonnollisen polymeraation ohjelmointiin.

DNA-templatoidulla synteesillä (DTS) tarkoitetaan reaktiota, jossa DNA-juostetta käytetään templaattina reaktion lähtöaineille. DTS:ssä reaktion lähtöaineet hybridisoituvat spesifisesti DNA-juosteen kanssa, jolloin lähtöaineiden reaktiiviset osat sijoittuvat lähelle toisiaan ja näin ollen reaktio tapahtuu todennäköisemmin.^{10,11} DNA-templaatin avulla jopa kosteusherkät reaktiot voidaan saada tapahtumaan vesipitoisessa ympäristössä. Hesser ja hänen tutkimusryhmänsä¹² raportoivat artikkelissaan DNA-katalyyteinä toimivista deoksiribotsyymeistä, jotka pystyvät katalysoimaan aryylyglykosidin ja DNA:n 3’-päässä olevan hydroksyylyryhmän välistä glykosylaatioreaktiota.

DNA:n lisäksi myös RNA-juostetta voidaan käyttää templaattina. Vasseur ja hänen tutkimusryhmänsä¹³ ovat hyödyntäneet DNA-templaatin lisäksi RNA-templaattia lyhyiden bifunktionaalisten oligonukleotidien yhteen liittämässä. Tässä oligonukleotidien välisessä ligaatioreaktiossa toisen oligonukleotidin 5’-päässä olevan boronihapon hydroksyylyryhmät korvautuvat toisen oligonukleotidin 3’-päässä olevan riboosisokerin alkoksyylyryhmillä, minkä seurauksena muodostuu boronaattiesteri.

Denaturaatiotutkimuksessa huomattiin, että RNA-juosteet, joiden 5'-päässä on boronihappo, pystyvät muodostamaan myös RNA-silmukan RNA-templaatin avulla.¹³

DNA-templaattia voidaan hyödyntää myös *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktiossa. Virta tutkimusryhmineen¹⁴ on hyödyntänyt oligonukleotiditemplaattia lyhyempien oligonukleotidien liittämiseksi toisiinsa *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiolla. Tässä glykosylaatioreaktiossa *N*(Me)-amino-oksiryhmän tyyppi ja sokerimolekyylin anomeerinen hiili reagoivat muodostaen *N*(Me)-alkoksiaminoglykosididoksen. Reaktiomekanismi on hyvin tunnettu ja sitä onkin hyödynnetty muun muassa erilaisten glykokonjugaattien valmistuksessa. Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu, että *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktion nopeus ja tasapainosaanto kasvavat huomattavasti DNA-templaattia käytettäessä verrattuna reaktioon, jossa sitä ei käytetä.¹⁴

1.1. Metallionivälitteinen emäspariutumisen

Metallionivälitteinen emäspari muodostuu, kun komplementaaristen nukleoemästen väliset vetysidokset korvataan kaksoiskierteen sisällä olevan metallionin ja emästen välisillä koordinaatiosidoksilla. Emäkset voivat koordinoitua joko yhteen tai useampaan metallioniin.¹⁵ Koordinaatiosidos muodostuu, kun Lewisin emäs luovuttaa vapaan elektroniparin Lewisin hapon tyhjälle orbitaalille. Metallionivälitteisten emäsparien tapauksessa emästen elektronirikkaat atomit toimivat Lewisin emäksinä ja metallioni toimii Lewisin hapon.

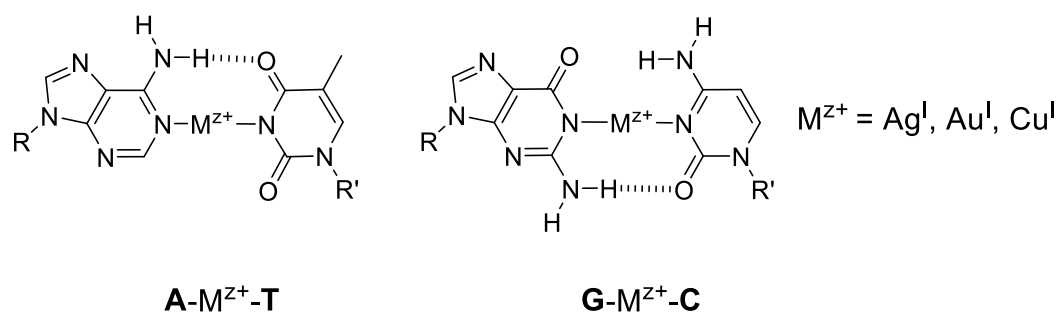
Teoriassa metallionit voivat sitoutua nukleoemästen elektroneja luovuttavien atomien lisäksi DNA:n tai RNA:n fosfaattirunkoon. Metallionista riippuen sen sitoutumispaikka voi vaihdella, minkä seurauksena kaksoiskierrerakenne voi joko stabiloitua tai destabiloitua.¹⁶ Yleensä metallionin sitoutuminen negatiivisesti varautuneeseen fosfaattiryhmään stabiloi kaksoiskierrerakennetta, kun taas sitoutuminen emäkseen destabiloi. Esimerkiksi magnesium- ja kalsiumionit sitoutuvat ensisijaisesti fosfaattiryhmiin, minkä seurauksena DNA:n kaksoiskierre stabiloituu negatiivisten varausten aiheuttaman repulsion vähentyessä. Toisaalta taas esimerkiksi alumiini- ja kupari-ionit voivat sitoutua fosfaattirungon lisäksi myös emäksiin, jolloin metallionit kilpailevat vetysidoksiin osallistuvien protonien kanssa nukleinihappoemästen elektronirikkaista donoriatomeista destabiloiden kaksoiskierrerakennetta.¹⁷ Tavallisten puriini- ja pyrimidiinukleosidien lisäksi metallionivälitteisen emäsparin voivat muodostaa myös keinotekoiset nukleosidit.¹⁸

1.1.1. Metallionivälitteiset Watson-Crick-emäsparit

Metalli-ionivälitteinen A-T-emäspari muodostuu, kun adeniinin N1-atomi sitoutuu metalli-ionin välityksellä tymiinin deprotonoituneeseen N3-atomiin (Kuva 2). Metallionin ollessa Ag^I , Au^I tai Cu^I emäspari on rakenteeltaan tasomainen. Metallionin muodostaman koordinaatiosidoksen lisäksi emäksiä yhdistää yksi vetysidos, joka muodostuu adeniinin N6-H- ja tymiinin O4-atomien välille. Verrattuna kupari-ioniin A- Cu^I -T-emäsparissa hopeaioni on sitoutunut heikommin adeniiniin ja tymiiniin A- Ag^I -T-emäsparissa. Tämä nähdään vertailemalla emäsparien sidospituuksia: N1- Cu^I -sidoksen pituus on 1,903 Å, kun taas N1- Ag^I -sidoksen pituus on 2,153 Å. Vastaavasti Cu^I -N3-sidoksen pituus on 1,872 Å ja Ag^I -N3-sidoksen 2,097 Å. Pidempien sidosten vuoksi A- Ag^I -T-emäsparin sidoskulma on pienempi kuin A- Cu^I -T-emäsparissa, jonka sidoskulma on 165°. Tämä johtuu siitä, että mikäli kulma olisi yhtä suuri kuin A- Cu^I -T-emäsparissa, adeniinin N6-H-atomi ja tymiinin O4-atomi eivät pystyisi muodostamaan rakennetta stabiloivaa vetysidosta.¹⁶

Au^I -välitteisen A-T-emäsparin sidospituudet ovat pituudeltaan A- Cu^I -T- ja A- Ag^I -T-emäsparien väliltä: N1- Au^I -sidoksen pituus on 2,101 Å ja Au^I -N3-sidoksen 2,054 Å. Emäsparin N1- Au^I -N3-sidoskulma poikkeaa lineaarisuudesta 15°.¹⁶

Metalli-ionivälitteinen G-C-emäspari muodostuu metalli-ionin koordinoituessa guaniinin deprotonoituneeseen N1-atomiin sekä sytosiinin N3-atomiin (Kuva 2). Hopeaionivälitteisen G-C-emäsparin rakenne osana metalloitua DNA-nanolankaa on määritetty röntgenkristallografialla. Kyseisen nanolangan rakenne muistuttaa hyvin paljon tavallisen B-DNA:n rakennetta. Tässä DNA-nanolangassa olevassa G- Ag^I -C-emäsparissa on metalli-ionin muodostaman koordinaatiosidoksen lisäksi vain yksi, guaniinin N2-H-atomin ja sytosiinin O2-atomin välinen, vetysidos. N1- Ag^I -sidoksen pituus on noin 2,2 Å ja Ag^I -N3-sidoksen pituus noin 2,3 Å.¹⁹

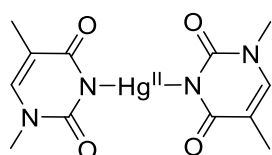


Kuva 2. Metallionivälitteiset Watson-Crick-emäsparit. Kuva mukailtu lähteistä ¹⁶ ja ¹⁹.

1.1.2. Väärinpariutuneet metalli-ionivälitteiset emäsparit

Tavallisten Watson-Crick-emäsparien lisäksi myös esimerkiksi T-Hg^{II}-T, C-Ag^I-C ja C-Ag^I-A -parit ovat mahdollisia.¹⁸ Tällaisissa tapauksissa emäsparin muodostavat kaksi sellaista emästä, jotka eivät normaalisti Watson-Crick-emäspariutumissääntöjä noudattaen pariutuisi.

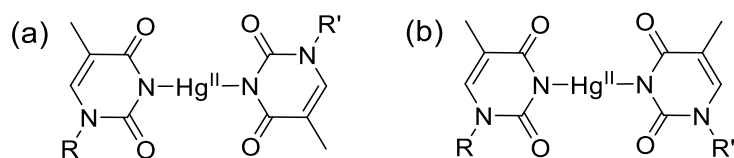
Vuonna 1963 Katz⁹ ehdotti ensimmäistä kertaa mahdollista rakennetta T-Hg^{II}-T-emäsparille, joka myöhemmin on osoitettu oikeaksi. Vuonna 1974 Stewart tutkimusryhmineen²⁰ julkaisi artikkelin, jossa he olivat selvittäneet [Hg(1-metyylityminaatti)₂]-kompleksin rakenteen röntgenkristallografian avulla. Tutkimuksen mukaan 1-metyylityminaatit ovat koordinoituneena Hg^{II}-ioniin deprotonoituneiden N3-atomien kautta (Kuva 3).²⁰



Kuva 3. [Hg(1-metyylityminaatti)₂]-kompleksin rakenne.²⁰

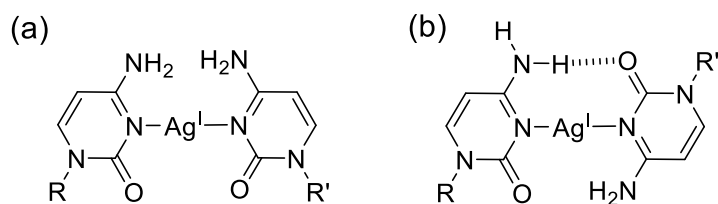
Stewartin määrittämän emäsparin rakenne eroaa kuitenkin Katzin vuonna 1963 ehdottamasta rakenteesta 1-metyylityminaattien N1-atomien suuntautumisen suhteen. Röntgenkristallografian perusteella N1-atomit ovat transoidisessa asemassa toisiinsa nähden (Kuva 4a), vaikka B-DNA-kaksoisjuosteessa ollessaan niiden pitäisi olla cisoidisessa asemassa (Kuva 4b) vastakkaisuuntaisten juosteiden vuoksi.¹⁸ B-DNA:n sijaan kyseinen emäspari voisikin olla osana sellaista DNA:ta, jossa juosteet ovat samansuuntaiset. Tällaisissa rakenteissa emäsparien glykosididokset ovat transoidisessa asemassa toisiinsa nähden.¹⁵

Myöhemmin T-Hg^{II}-T-emäsparin rakenne tavallisessa B-DNA:ssa on selvitetty niin NMR-spektroskopiolla²¹ kuin röntgenkristallografiälläkin²². Ono tutkimusryhmineen²² julkaisi vuonna 2014 tutkimuksen, jossa he olivat selvittäneet röntgenkristallografian avulla kaksi elohopeaionivälitteistä T-T-emäsparia sisältävän B-DNA:n rakenteen. Nämä kaksi metalli-ionivälitteistä emäsparia eivät juurikaan vaikuttaneet B-DNA:n konformaatioon.²² Emäsparin rakenne oli yhtenevä Stewartin aiemmin toteaman [Hg(1-metyylityminaatti)₂]-kompleksin kanssa ja, kuten Katz oli jo vuonna 1963 ehdottanut, ollessaan osana B-DNA:ta tyymiinien N1-atomit olivat cisoidisessa asemassa.



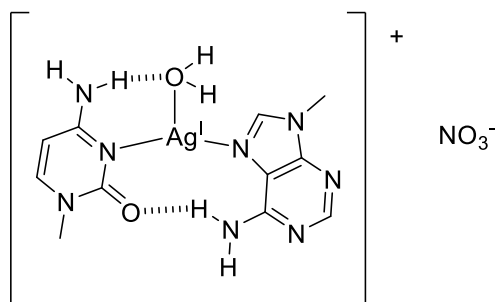
Kuva 4. (a) T-Hg^{II}-T-emäspari, jossa N1-atomit ovat transoidisessa asemassa¹⁸; (b) T-Hg^{II}-T-emäspari, jossa N1-atomit ovat cisoidisessa asemassa.⁵

T-Hg^{II}-T-emäsparin lisäksi C-Ag^I-C-emäspari on ollut yksi tutkituimmista metalli-ionivälitteisistä emäspareista. Tätä emäsparia on tutkittu niin vastakkaisuuntaisissa kuin samansuuntaisissakin DNA-kaksoiskierteissä.¹⁵ Myös C-Ag^I-C-emäsparin rakenne on selvitetty B-DNA:ssa niin röntgenkristallografialla¹⁹ kuin NMR-spektroskopiallakin²³ (Kuva 5a). Huomattavaa on, että kyseisen emäsparin transoidisessa konformaatioissa (Kuva 5b) muodostuu metalli-ionin koordinaatiosidoksen lisäksi amino- ja karbonyyliryhmän välinen vetysidos. Yhden emäsparin tapauksessa transoidinen konformaatio onkin cisoidista konformaatiota vallitsevampi muoto, sillä vetysidos stabiloi rakennetta.¹⁵ Ollessaan osana B-DNA:ta C-Ag^I-C-emäspari on kuitenkin cisoidisessa konformaatioissa.⁵



Kuva 5. (a) C-Ag^I-C-emäsparin cisoidinen konformaatio; (b) C-Ag^I-C-emäsparin transoidinen konformaatio.¹⁵

Toisin kuin kaksi edellä mainittua metalli-ionivälitteistä emäsparia, C-Ag^I-A-emäspari koostuu kahdesta eri nukleoemäksestä. Lippert tutkimusryhmineen²⁴ julkaisi vuonna 1992 artikkelin, jossa he esittivät röntgenkristallografialla selvitetyn [Ag(1-metyylisytyosiini)(9-metyyliadeniini)(H₂O)]NO₃-kompleksin rakenteen (Kuva 6). Kompleksissa hopeaioni on sitoutunut koordinaatiosidoksella sytyosiinin N3-atomiin ja adeniinin N7-atomiin. Verrattuna aiempiin metalli-ionivälitteisiin emäspareihin erona tässä emäsparissa on ligandina toimiva vesimolekyyli. Akvaligandin vuoksi N3-Ag^I-N7-sidoksen siduskulma ei ole lineaarinen, vaan 165,8°, minkä vuoksi adeniinin aminoryhmä ja sytyosiinin karbonyyliryhmä pystyvät muodostamaan rakennetta stabiloivan vetysidoksen. Tämän lisäksi myös vesimolekyylin ja sytyosiinin aminoryhmän välille muodostuu vetysidos.²⁴



Kuva 6. [Ag(1-metyylisytosiini)(9-metyyliadeniini)(H₂O)]NO₃-kompleksin rakenne. Kuva mukailtu lähteestä ²⁴.

Sytosiinin N1-atomin ja adeniinin N9-atomin transoidisen aseman vuoksi C-Ag^I-A-emäspari ei todennäköisesti ole yhteensopiva B-DNA-rakenteen kanssa, mutta voisi sen sijaan olla osana kaksoiskierrettä, jonka juosteet ovat hybridisoituneet käänteisen Hoogsteen-emäspariutumisen kautta.¹⁸

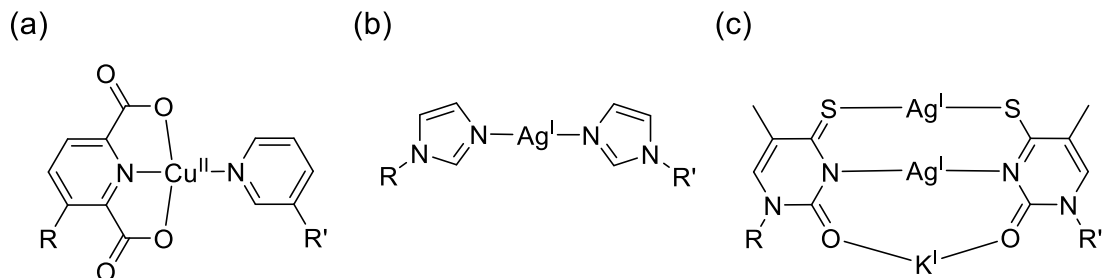
1.1.3. Keinotekoiset metalli-ionivälitteiset emäsparit

Metalli-ionivälitteisiä emäspareja on luotu luonnollisten nukleoemästen lisäksi myös keinotekoisista rakenneyksiköistä. Vuonna 2001 Schultz tutkimusryhmineen²⁵ selvitti ensimmäisen metallivälitteisen emäsparin sisältävän DNA:n kaksoiskierteen rakenteen röntgenkristallografialla. Kyseinen DNA sisälsi kaksi Dipic-Cu^{II}-Pyr-emäsparia, jossa kolmihampainen pyridiini-2,6-dikarboksylaatti-ligandi (Dipic) sekä yksihampainen pyridyyli-ligandi (Pyr) ovat koordinoituneena kupari-ioniin (Kuva 7a). Röntgenkristallografian perusteella DNA oli konformaatioltaan Z-muotoa. CD-mittauksissa kuitenkin selvisi, että kaksoiskierteen konformaatio liuoksessa oli eri kuin kiteisessä muodossa. Liuoksessa ollessaan kaksoiskierre oli B-DNA:n ja Z-DNA:n välimuotoa. Näin ollen kyseinen DNA-kaksoiskierre voi olla konformaatioltaan myös B-DNA, mutta vain Z-DNA kiteytyy.²⁵

Ensimmäinen todistetusti B-DNA:ssa oleva metalli-ionivälitteinen emäspari oli Im-Ag^I-Im-emäspari, jossa hopeaioni on koordinoituneena kahteen imidatsoliligandiin (Im) (Kuva 7b).¹⁸ Müller tutkimusryhmineen²⁶ selvitti tämän kolme Im-Ag^I-Im-emäsparia sisältävän B-DNA:n rakenteen NMR-spektroskopian avulla vuonna 2010. Im-Ag^I-Im-emäspari on yksi kaikkien aikojen tutkituimmista keinotekoisista metalli-ionivälitteisistä emäspareista. Tämän lisäksi useita imidatsolijohdannaisia on käytetty muiden metallivälitteisten emäsparien kehittämisessä.^{27,28,29}

Edellä esitetyt metalli-ionivälitteiset emäsparit ovat pääasiassa sisältäneet vain yhden metalli-ionin. Kuitenkin myös kaksi³⁰ ja jopa kolme³¹ metalli-iona sisältäviä emäspareja

on kehitetty. Ono tutkimusryhmineen³⁰ julkaisi vuonna 2017 kaksi S-2Ag^I-S-emäsparia, jossa S viittaa 4-tiotymiiniin, sisältävän B-DNA:n rakenteen. Rakenne selvitettiin röntgensädekristallografialla. Hopeaionien lisäksi emäsparissa on 4-tiotymiinien karbonyyliryhmät yhdistävä kaliumkationi (Kuva 7c).³⁰

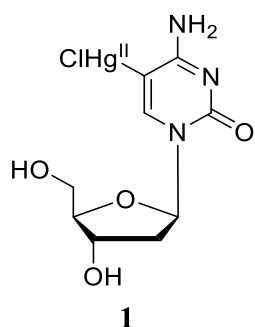


Kuva 7. (a) Dipic-Cu^{II}-Pyr-emäsparin rakenne²⁵; (b) Im-Ag^I-Im-emäsparin rakenne²⁶; (c) S-2Ag^I-S-emäsparin rakenne³⁰.

1.2. Merkuroidun 2'-deoksisytidiinin elohopeaionivälitteinen emäspariutuminen

Elohopea voi esiintyä hapetusasteilla I, II, III ja IV, joista yleisimmät ovat I ja II.^{32,33} Hg^{II}-ioni on vahvasti polarisoituva, minkä ansiosta sen muodostamat sidokset ovat luonteeltaan enemmän kovalenttisia kuin ionisia. Kova-pehmeä happo-emäs -teorian mukaan Hg^{II}-ioni on pehmeä happo, minkä vuoksi se sitoutuu vahvimmin pehmeiden emästen, kuten esimerkiksi rikin, typen ja fosforin, kanssa. Hg^{II}-ionin muodostamat kompleksit yksihampaisten ligandien kanssa ovat yleensä geometrialtaan lineaarisia tai tetraedrisia.³²

Lönnberg tutkimusryhmineen³⁴ tutki 5-kloorimerkuri-2'-deoksisytidiinin (**1**, Kuva 8) elohopeaionivälitteistä emäspariutumista monomeeri- ja oligonukleotiditasolla. Monomeeritasolla elohopeaionivälitteistä emäspariutumista tutkittiin NMR-titrauksilla ja oligonukleotidissa UV-sulamislämpötilamittauksilla. Tutkimuksessa havaittiin, että 5-kloorimerkuri-2'-deoksisytidiini (**1**) pystyy edelleen muodostamaan tavallisen Watson-Crick-emäsparin, vaikka sen C5-atomi on merkuroitu.³⁴ Samanlainen ilmiö on havaittu jo aiemmin 5-hydroksiurasiililla. 5-hydroksiurasiili pystyy muodostamaan sekä Gd^{III}-välitteisen emäsparin toisen 5-hydroksiurasiilimolekyylin kanssa, että tavallisen Watson-Crick-emäsparin adeniinin kanssa.³⁵ Toisin sanoen metalli-ionivälitteinen emäspariutumisen tarjoaa vaihtoehtoisen emäspariutumistavan Watson-Crick-emäspariutumiseksi, minkä vuoksi sitä voidaan hyödyntää parantamaan oligonukleotidien hybridisaatioaffiniteettiä.³⁴



Kuva 8. 5-kloorimerkuri-2'-deoksisytidiinin (**1**) rakenne.

1.2.1. Elohopeaionivälitteinen emäspariutuminen monomeerinä

Lönnberg tutkimusryhmineen³⁴ tutki yhdisteen **1** affiniteettia luonnollisten nukleosidien 5'-monofosfaatteihin NMR-titrauksilla 25 °C:ssa ja pH:ssa 7,2. 5'-monofosfaatteja oli 5 erilaista: 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-IMP ja 5'-UMP, joissa jokaisessa oli eri emäs: adeniini, sytosiini, guaniini, hypoksantiini ja urasiili. NMR-titrauksia varten valmistettiin kantaliuos DMSO-*d*₆/240 mM fosfaattipuskuriliuos D₂O:ssa (1:1, *v/v*), jossa sekä yhdisteen **1** että nukleosidi-5'-monofosfaatin konsentraatio oli 10 mM. NMR-titrauksen edetessä kantaliuoksesta laimennettiin vähitellen eri vahvuisia laimennoksia lisäämällä aina sama määrä DMSO-*d*₆- ja fosfaattipuskuriliuosta näytteeseen. Laimennoksissa pH ja ionivahvuus pysyivät kuitenkin koko ajan vakioina. Referenssinäytteenä oli vastaavan vahvuinen näyte pelkästään yhdisteestä **1**.³⁴

NMR-titrauksessa seurattiin yhdisteen **1** H6-protonin kemiallisen siirtymän muutosta. H6-protonin kemiallisen siirtymän muutoksesta voidaan arvioida, onko metalli-ionivälitteistä emäspariutumista tapahtunut. 5-Merkuri-2'-deoksisytidiini (**1**) on *syn*-konformaatioissa ollessaan osana elohopeaionivälitteistä emäsparia, sillä tällöin elohopeasubstituentti on emäsparin keskellä.³⁴ *Syn*-konformaatioissa H6-protoni on vähemmän varjostunut kuin *anti*-konformaatioissa, jossa 2'-deoksisytidiini olisi tavallisesti. Tämän vuoksi H6-protonin kemiallisen siirtymän kasvu viittaisi siihen, että H6-protonin varjostus vähenee eli merkuroitu 2'-deoksisytidiini on *syn*-konformaatioissa osana elohopeaionivälitteistä emäsparia. H6-protonin kemiallisen siirtymän lasku puolestaan viittaisi siihen, että H6-protonin varjostus on lisääntynyt eli merkuroitu 2'-deoksisytidiini on *anti*-konformaatioissa eikä elohopeavälitteistä emäspariutumista ei ole tapahtunut. Tämän lisäksi 5-merkuri-2'-deoksisytidiinin (**1**) elektronitiheys muuttuu nukleoemäksen koordinoituessa elohopeaan, mikä myös vaikuttaa H6-protonin kemiallisen siirtymän muutokseen.

NMR-titrausten tulokset voidaan jakaa karkeasti kahteen eri kategoriaan: niihin, joissa lähtöaineiden konsentraation kasvaessa H6-protonin kemiallinen siirtymä kasvoi ja niihin, joissa lähtöaineiden konsentraation kasvaessa H6-protonin kemiallinen siirtymä pieneni. Tämän lisäksi havaittiin, että **1** ja 5'-sytosiinimonofosfaatti eivät sitoutuneet toisiinsa lainkaan, sillä H6-protonin kemiallisen siirtymän muutos vastasi tilannetta, jossa näytteessä oli pelkästään merkuroitua 2'-deoksisytidiiniä. Tässä vertailureaktion tapauksessa H6-protonin kemiallinen siirtymä kasvoi hieman merkuroidun 2'-deoksisytidiinin konsentraation kasvaessa, mutta H6-protonin kemiallisen siirtymän muutos oli suhteellisen pieni verrattuna muihin näytteisiin.³⁴

H6-protonin kemiallinen siirtymä kasvoi lähtöaineiden konsentraation kasvaessa näytteissä, joissa oli 5-kloorimerkuri-2'-deoksisytidiinin lisäksi joko 5'-GMP, 5'-IMP tai 5'-UMP. H6-protonin kemiallisen siirtymän kasvu viittaisi siihen, että **1** on koordinoitunut elohopeaionin kautta kyseisiin nukleosidimonofosfaatteihin. Näitä kolmea nukleosidimonofosfaattia yhdistää niiden suhteellisen hapan protoni emäsosassa. Tutkimuksen mukaan elohopeaionivälitteinen emäspariutuminen on mahdollista siksi, että elohopeaioni pystyy koordinoitumaan näihin deprotonoituneisiin rakenteisiin: guaniinin ja hypoksantiinin N1-atomeihin sekä urasiilin N3-atomiin. Tutkimuksessa myös määritettiin näiden 5-merkuri-2'-deoksisytidiinin ja nukleosidimonofosfaattien muodostamien kompleksien pysyvyysvakiot: 5'-GMP = $1000 \pm 200 \text{ M}^{-1}$, 5'-IMP = $290 \pm 30 \text{ M}^{-1}$, ja 5'-UMP = $400 \pm 100 \text{ M}^{-1}$.³⁴

H6-protonin kemiallinen siirtymä puolestaan pieneni lineaarisesti lähtöaineiden konsentraation kasvaessa näytteessä, jossa oli 5-kloorimerkuri-2'-deoksisytidiinin lisäksi 5'-adenosiinimonofosfaatti. Tämä viittaisi siihen, että **1** ei ole koordinoitunut 5'-adenosiinimonofosfaattiin yhtä vahvasti kuin 5'-GMP:n, 5'-IMP:n tai 5'-UMP:n tapauksessa.³⁴

1.2.2. Elohopeaionivälitteinen emäspariutuminen oligonukleotidissa

Lönnberg tutkimusryhmineen³⁴ tutki 5-kloorimerkuri-2'-deoksisytidiinin (**1**) emäspariutumista myös oligonukleotidissa. Merkuroidun oligonukleotidin (**ON1c-Hg**) hybridisaatiota merkuroimattomien vastinjuosteiden (**ON2a**, **ON2c**, **ON2g** ja **ON2t**) kanssa tutkittiin UV-sulamislämpötilamittausten avulla. UV-sulamislämpötilamittauksissa kaksoisjuosteen denaturoituminen havaitaan UV-absorption kasvuna lämpötilan noustessa. Vastinjuosteet olivat sekvenssiltään muuten samanlaiset, mutta yhdisteen **1** vastinemäs oli jokaisessa juosteessa eri (Taulukko 1). Mittauksia varten valmistettiin näytteet, joissa oligonukleotidi **ON1-Hg** (3,0 μM) oli

liuotettu eri **ON2**-oligonukleotidien (3,0 μM) kanssa 20 mM kakodylaattipuskuriliuokseen (pH 7,4) ja liuosten ionivahvuus oli säädetty 0,1-molaariseksi natriumperklooraatin avulla. UV-sulamislämpötilamittauksissa oligonukleotidien absorbanssi mitattiin aallonpituudella 260 nm ja mittaukset tehtiin 10–90 °C:ssa. Vastaavat sulamislämpötilamittaukset tehtiin myös merkuroimattomalle oligonukleotidille **ON1c** vertailun vuoksi.³⁴

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytettyjen oligonukleotidien sekvenssit. C^m tarkoittaa 5-metyylisytyosiinia ja C^{Hg} 5-kloorimerkurisytyosiinia (**1**). Punaisella merkitty emäs on eri jokaisessa sekvenssissä.³⁴

ON1c	5'-C ^m GAGC ^m C ^m TGGC ^m -3'
ON1c-Hg	5'-C ^m GAGC ^m C ^{Hg} C ^m TGGC ^m -3'
ON2a	5'-GCCAG A GCTCG-3'
ON2c	5'-GCCAG C GCTCG-3'
ON2g	5'-GCCAG G GCTCG-3'
ON2t	5'-GCCAG T GCTCG-3'

Tutkimuksessa selvisi, että yhdisteen **1** sisältävä oligonukleotidi sitoutui voimakkaimmin juosteeseen, jossa vastinemäksenä oli tymiini. Tämän **ON1c-Hg:ON2t**-kaksoiskiirteen sulamislämpötila oli lähes yhtä korkea kuin merkuroimattoman **ON1c:n** ja **ON2g:n** muodostaman kaksoiskiirteen, jossa sytyosiini on pariutunut tavallisella Watson-Crick-emäspariutumisella guaniiniin, sulamislämpötila. Todistaakseen, että **ON1c-Hg:ON2t**-kaksoiskiirteen pysyvyys johtui nimenomaan yhdisteen **1** ja tymiinin elohopeavälitteisestä emäspariutumisesta, tutkimusryhmä toisti sulamislämpötilamittaukset niin, että näytteessä oli mukana merkapttoetanolia (30 μM). Merkapttoetanoli koordinoituu yhdisteessä **1** olevaan elohopeaioniin, jolloin elohopea ei pysty enää muodostamaan koordinaatiosidosta tymiinin kanssa. Merkapttoetanolin läsnä ollessa havaittiin, että **ON1c-Hg:ON2t**-kaksoiskiirteen sulamislämpötila laski merkittävästi, mikä todisti kaksoiskiirteen pysyvyyden johtuvan elohopeaionivälitteisestä emäspariutumisesta.³⁴

Tutkimuksessa havaittiin myös, että **ON1c-Hg:ON2g**-kaksoiskiirteen sulamislämpötila oli alhaisempi kuin merkuroimattoman **ON1c:ON2g**-kaksoiskiirteen sulamislämpötila. Kiinnostavaa oli kuitenkin se, että merkapttoetanolin läsnä ollessa **ON1c-Hg:ON2g**-kaksoiskiirteen sulamislämpötila oli lähes yhtä korkea kuin **ON1c:ON2g**-

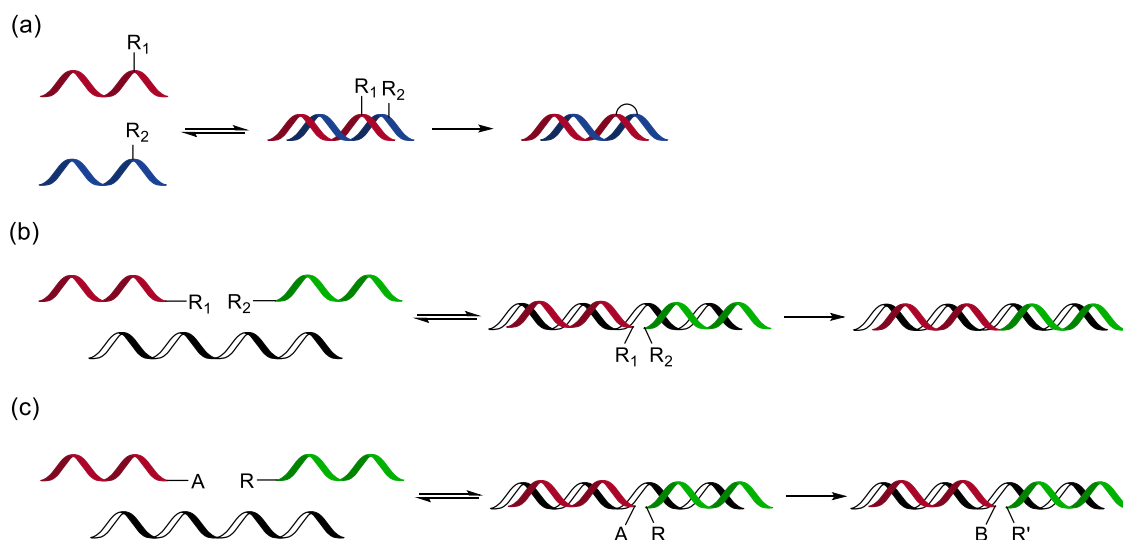
kaksoiskierteen sulamislämpötila. Tämä johtui siitä, että kun elohopeaionin koordinoituminen vastinemäkseen estettiin merkaptoetanolilla, emäspariutumisen tapahtui jälleen Watson-Crick-emäspariutumisen kautta. Merkuroiduista kaksoiskierteistä alhaisin sulamislämpötila oli **ON1c-Hg:ON2a**-kaksoiskierteellä ja toiseksi alhaisin **ON1c-Hg:ON2c**-kaksoiskierteellä. Kaksoiskierteiden sulamislämpötilat ovat sopusoinnussa NMR-titrauksilla saatujen pysyvyyksivakioiden kanssa.³⁴

1.3. DNA-templatoituvat reaktiot

Templatoitujen kemiallisten reaktioiden historia juontaa juurensa aina elämän alkuaajoille asti. Tästä inspiroituneena oligonukleotideja onkin myöhemmin käytetty templaattina erilaisille reaktioille, kuten esimerkiksi nukleofilisille substituutio-, kondensaatio- ja sykloadditioreaktioille. Nukleinihappotemplatoituja reaktioita voidaan hyödyntää erilaisten toimintojen ohjaamiseen aina pienmolekyylisynteisistä nukleinihappojen tunnistukseen sekä nukleinihappopohjaiseen kokoamiseen. DNA:n lisäksi templaattina voidaan käyttää RNA:ta tai näiden synteettisiä analogeja.³⁶

Bimolekulaarisen reaktion nopeuteen vaikuttaa, kuinka todennäköisesti reaktioon osallistuvat reagenssit törmäävät toisiinsa sekä reagoivien orbitaalien avaruudellinen suuntautuminen törmäyksen aikana. Bimolekulaariset reaktiot ovatkin voimakkaasti konsentraatiiriippuvaisia, sillä korkeammassa konsentraatioissa reagenssien törmäys toisiinsa on todennäköisempää kuin alhaisemmissa konsentraatioissa.³⁷ DNA-templatoituvissa reaktioissa DNA-juosteen kanssa komplementaariset reagenssit hybridisoituvat samaan DNA-juosteeseen, minkä seurauksena niiden paikallinen konsentraatio ja näin ollen reaktionopeus kasvavat.^{36,37}

Nukleinihappotemplatoituvat reaktiot voidaan jakaa karkeasti kolmeen eri kategoriaan: templatoitu juosteiden välinen sitoutuminen, templatoitu juosteiden välinen ligaatioreaktio sekä templatoitu transformaatio (Kuva 9). Templatoituvissa juosteiden välisessä sitoutumisessa kahden komplementaarisen juosteen välille muodostuu kovalenttinen sidos. Templatoituvissa juosteiden välisessä ligaatioreaktiossa templaatin kanssa komplementaariset reagenssit sitoutuvat samaan templaattiin, minkä ansiosta reagenssien reaktiiviset osat sijoittuvat lähelle toisiaan mahdollistaen niiden välisen ligaatioreaktion. Yleensä syntyvällä ligaatiotuotteella on suuri affiniteetti templaattiin, mutta tuote saadaan irrotettua templaattista esimerkiksi lämmön avulla. Myös templatoituvissa transformaatioissa templaatti auttaa tuomaan reagenssien reaktiiviset osat lähekkäin mahdollistaen reaktion tapahtumisen. Tässä tapauksessa ei kuitenkaan tapahdu ligaatiota.³⁶

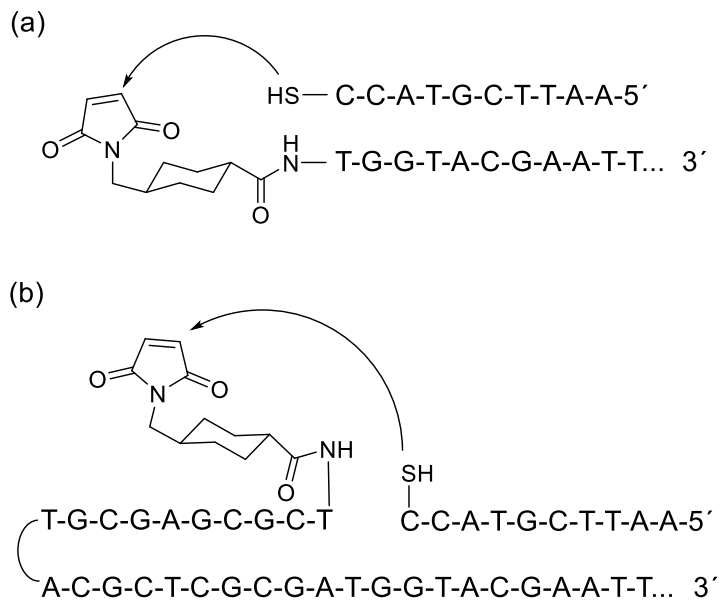


Kuva 9. (a) Templatoitu juosteiden välinen sitoutuminen; (b) templatoitu juosteiden välinen ligaatioreaktio; (c) templatoitu transformaatio. Kuva mukailtu lähteestä ³⁶.

Ensimmäiset DNA-templatoitujen ligaatioreaktioiden keskittyivät lähinnä fosfodiesterien muodostamiseen. Näissä ensimmäisissä DNA-templatoituissa reaktioissa hyödynnettiin vain muutamia kemiallisia reaktioita. Myöhemmin DNA-templatoituissa reaktioissa on hyödynnetty useita erilaisia reaktioita, mikä on mahdollistanut niiden käytön useissa erilaisissa sovelluskohteissa, kuten esimerkiksi sensoreissa, lääkeaineiden kuljettamisessa, ohjelmoiduissa monivaiheisissa synteesissä sekä kemiallisten kirjastojen luomisessa.³⁸

1.3.1. Tioetterin muodostuminen

Liu tutkimusryhmineen³⁹ olivat yksiä edelläkävijöitä DNA-templatoitujen synteesin saralla. Vuonna 2001 he raportoivat DNA-templatoitujen tioetterin valmistuksesta niin tavallisessa DNA-kaksoiskierteessä kuin hiuspinnirakenteessa (Kuva 10). Tutkimuksessa sekä hiuspinniin että yksijuosteiseen DNA:han liitettiin elektrofiilinen maleimidi, joka reagoi komplementaariseen DNA-juosteeseen liitetyn tiolin kanssa muodostaen tioetterin. Vastaavaa reaktiota tutkittiin myös sellaisilla DNA-juosteilla, jotka eivät olleet komplementaarisia toistensa kanssa. Tällöin tioetterin muodostumista ei havaittu. α,β -Tyydyttymättömien karbonyyliyhdisteiden Michael-additioreaktion lisäksi DNA-templatoitua synteesiä kokeiltiin myös vinyylisulfonien Michael-additioreaktiolla sekä S_N2-substituutioreaktiolla. Nukleofiileinä kokeiltiin tiolien lisäksi primaarisia amiineja ja elektrofiileinä maleimidin lisäksi jodiasetamidia, bromiasetamidia sekä vinyylisulfonia. Kaikki tutkitut DNA-templatoitujen reaktioiden tapahtuivat hyvillä saannoilla sekä hyvällä selektiivisyydellä.^{37,39}



Kuva 10. DNA-templatoitu tioetterisynteesi (a) DNA-kaksoiskierteen päässä; (b) hiuspinnirakenteessa. Kuva mukailtu lähteestä ³⁹.

Tutkimuksessa havaittiin myös, että DNA-templatoitu synteesi on lähes riippumaton reagoivien funktionaalisten ryhmien välisestä etäisyydestä. Tioliryhmän ja maleimidiryhmän väliin voitiin liittää jopa 30 emästä ja ryhmät reagoivat silti toistensa kanssa muodostaen tioetterin. Tämä viittaa siihen, että reagenssien paikallisen konsentraation kasvu vaikuttaa enemmän DNA-templatoitujen reaktion tapahtumiseen kuin hybridisaation aikaansaamaa funktionaalisten ryhmien kohdennus.^{37,39}

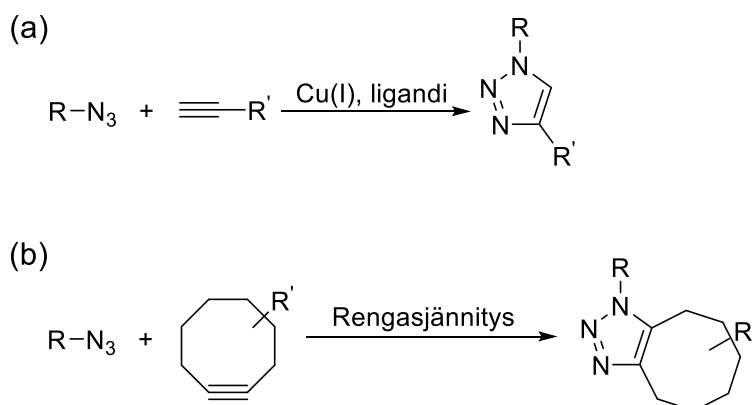
1.3.2. Atsidi-alkyyni sykloadditio (Click-reaktio)

Click-reaktioksi kutsutaan sellaista reaktiota, jossa kaksi molekyyliä liittyy yhteen selektiivisesti niin, että reaktion saanto on korkea eikä reaktiossa juurikaan synny sivutuotteita. Kuparikatalysoitu atsidi-alkyyni sykloadditioreaktio (CuAAC) on yksi tällaisista Click-reaktioista (Kuva 11a). CuAAC-reaktiossa terminaalinen alkyyni reagoi alifaattisen atsidin kanssa 1,3-dipolaarisella sykloadditioreaktiolla muodostaen 1,4-disubstituoidun 1,2,3-triatsolin kuparin katalysoidessa reaktiota. CuAAC-reaktiolla on monia sovelluskohteita eri kemian osa-alueilla. CuAAC-reaktiota on hyödynnetty esimerkiksi aminohappo-triatsoli-johdannaisien, syklisten peptidien ja nukleotidien valmistamisessa. Lisäksi reaktiota voidaan hyödyntää peptidien yhteen liittämässä, sillä muodostuva triatsolisidos vastaa ominaisuuksiltaan peptidisidosta.⁴⁰

Vuonna 2010 Winssinger tutkimusryhmineen⁴¹ tutkivat, olisiko PNA-juosteita mahdollista liittää toisiinsa sekä DNA-templaattia että CuAAC-reaktiota hyödyntämällä. Peptidinukleiinihapot (PNA) ovat luonnollisten oligonukleotidien peptideistä koostuvia

keinotekoisia analogeja. Tutkimusryhmä valmisti alkyyniryhmän sisältäviä PNA-juosteita ja atsidiryhmän sisältäviä PNA-juosteita. PNA-juosteiden kanssa komplementaarisen DNA-templaatin avulla PNA-juosteet sitoutuivat toisiinsa spesifisesti. Ligaatioreaktiota ei havaittu, kun toinen PNA-juosteista ei ollut komplementaarinen DNA-templaatin kanssa. Tutkimustulosten perusteella CuAAC-reaktiota voidaan hyödyntää PNA-juosteiden yhteen liittämässä DNA-templaatin avulla.⁴¹

DNA-templatoitun CuAAC-reaktion rajoitteena on kuitenkin katalyyttinä toimiva kupari. Kupari voi muodostaa reaktiivisia happiradikaaleja, jotka hapettavat nukleinihappoja.³⁶ Lisäksi kuparijäämät voivat aiheuttaa myöhemmin ongelmia valmistettujen molekyylien sovelluskohteissa, sillä kupari on myrkyllinen jo pieninä pitoisuuksina.^{36,42} Tästä syystä DNA-templatoitulle CuAAC-reaktiolle on kehitetty myös metalliton vaihtoehto. SPAAC-reaktio on kuten CuAAC-reaktio, mutta tässä reaktiossa ei tarvita katalyyttinä toimivaa kuparia (Kuva 11b), minkä vuoksi se sopii CuAAC-reaktiota paremmin DNA-templatoituihin reaktioihin. SPAAC-reaktiossa reaktioon osallistuva kolmoissidos on osana 8-rengasrakennetta. Rengasjännityksen vuoksi molekyylin perustila on epävakaaampi kuin reaktion transitiotila, minkä vuoksi pienirenkaiset sykloalkyynit reagoivat nopeammin kuin sellaiset alkyynit, joissa rengasjännitystä ei ole.^{42,43}

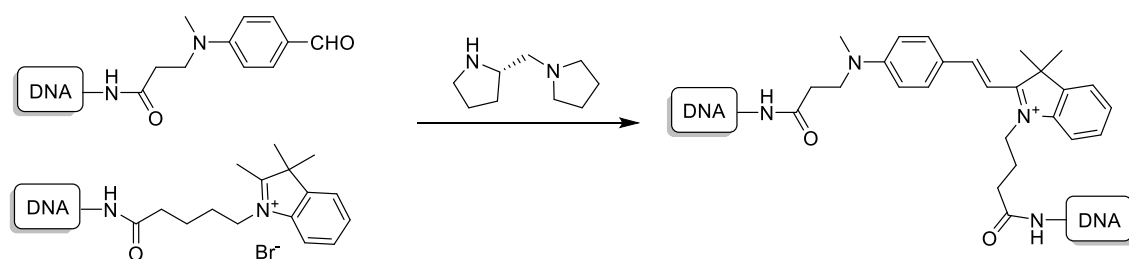


Kuva 11. (a) CuAAC-reaktio; (b) SPAAC-reaktio. Kuva mukailtu lähteestä ⁴³.

1.3.3. Aldolikondensaatio

DNA-templatoitua synteesiä on hyödynnetty myös kondensaatioreaktioissa. Huang ja Coull⁴⁴ raportoivat vuonna 2008 tavan valmistaa hemisyaniiniväriainetta kahdesta DNA-juosteesta, joista toinen oli *p*-aminobentsaldehydin ja toinen indoliniumin johdannainen (Kuva 12). Katalyyttinä reaktiossa käytettiin diamiinia.⁴⁴ Reaktiota seurattiin fluoresenssin avulla, sillä kumpikaan reaktion lähtöaineista ei ole fluoresoiva, kun taas

reaktiotuote on voimakkaasti fluoresoiva.³⁶ Hemisyaniiniväriaineen muodostumista tutkittiin kahdella erilaisella DNA-kaksoiskierteellä. Toinen näistä muodostui, kun kaksi komplementaarista DNA-juostetta, joissa toisen päässä oli *p*-aminobentsaldehydi ja toisen päässä indoliniumioni, hybridisoituivat toistensa kanssa. Tämän seurauksena kondensaatioreaktion lähtöaineet sijoittuivat molemmat DNA-kaksoiskiirteen päähän. Toinen DNA-kaksoiskierre valmistettiin niin, että *p*-aminobentsaldehydin ja indoliniumin sisältämät DNA-juosteet olivat suunniteltu komplementaariseksi DNA-templaatin kanssa. Molempien juosteiden hybridisoituessa DNA-templaattiin reaktiiviset ryhmät asettuivat DNA-kaksoiskiirteen keskelle. Molemmissa tapauksissa fluoresenssia havaittiin vain, kun juosteet olivat täysin komplementaarisia toistensa tai DNA-templaatin kanssa.⁴⁴



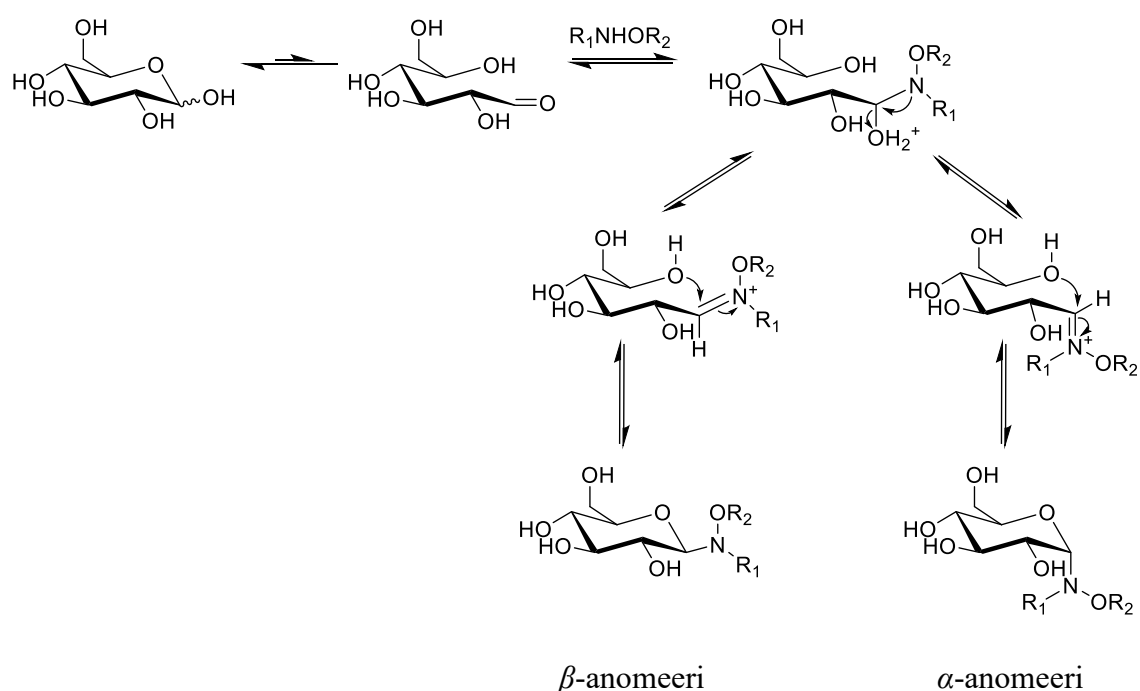
Kuva 12. Hemisyaniinin muodostuminen. Kuva mukailtu lähteestä ⁴⁴.

1.3.4. *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio

Glykosylaatioreaktioksi kutsutaan reaktiota, jossa hiilihydraatti liittyy kovalenttisesti anomeerisesta hiilestään toisen molekyylin funktionaaliseen ryhmään muodostaen glykosidisidoksen. Tämä funktionaalinen ryhmä voi olla esimerkiksi hydroksyyli-, amino- tai tioliryhmä.⁴⁵ Elektrofiilistä hiilihydraattia kutsutaan glykosyylidonoriksi ja nukleofiilisen funktionaalisen ryhmän sisältävää molekyyliä glykosyyliakseptoriksi. Glykosylaatioreaktiossa muodostuu stereogeeninen keskus, minkä vuoksi reaktiossa voi muodostua sekä α - että β -diastereomeerit. Reaktiossa sokerin anomeerisen hiilen ja siihen kiinnittyneen lähtevän ryhmän välinen sidoks katkeaa lähtevän ryhmän reagoidessa aktivaattorin kanssa. Välituotteena muodostuva karbokationi voi reagoida nukleofiilisen glykosyyliakseptorin kanssa S_N1 -mekanismilla. Nukleofiili voi hyökätä karbokationiin kahdelta eri puolelta, minkä seurauksena voi muodostua joko α - tai β -anomeeri (Kaavio 1).⁴⁶ Näistä kahdesta mahdollisesta tuotteesta α -anomeeri on pyranosideilla usein termodynaamisesti stabiilimpi, sillä renkaan happiatomin vapaa elektronipari voi delokalisoitua anomeerisen hiilen ja siihen liittyneen, aksiaalissa asemassa olevan, substituentin väliselle σ^* -orbitaalille. Tätä kutsutaan anomeeriseksi efektiksi. Toisaalta taas suuren substituentin on helpompi liittyä ekvatoriaaliseen asemaan, jolloin ei synny

epäedullisia 1,3-diakksiaalisia vuorovaikutuksia liittyvän substituentin ja muiden sokerissa olevien substituenttien välille.^{46,47}

N(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiolla tarkoitetaan reaktiota, jossa sokeri liitetään *N*(Me)-amino-oksiryhmän kautta toiseen molekyyliin. Tässä glykosylaatioreaktiossa *N*(Me)-amino-oksiryhmän tyyppi ja sokerimolekyylin anomeerinen hiili reagoivat muodostaen *N*(Me)-alkoksiamiinoglykosididisidoksen (Kaavio 1). Reaktio on kemoselektiivinen ja reaktiotuotteissa havaitaan selkeä anomeerinen selektiivisyys: β -anomeeri on vallitsevampi muoto.⁴⁸ Reaktiota on hyödynnetty muun muassa useiden erilaisten glykokonjugaattien valmistuksessa⁴⁹, detektiomenetelmissä⁵⁰ ja lääkeaineiden kohdentamisessa oikeaan paikkaan^{51,52}.



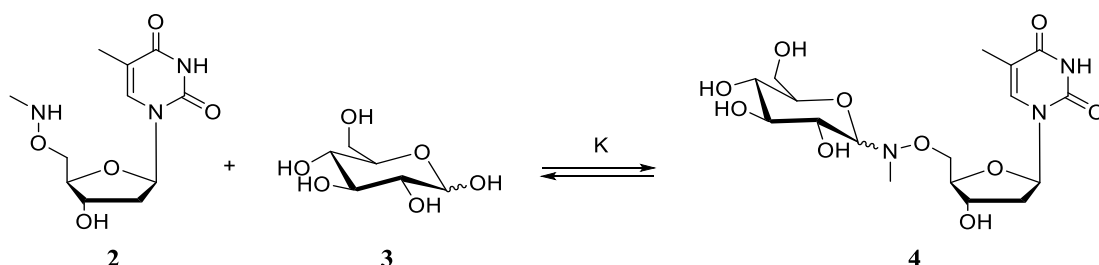
Kaavio 1. Alkoksiamiiniglykosylaatioreaktion mekanismi. Kun R_1 = metyyli, kyseessä on *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktio. Kuva mukailtu lähteestä⁴⁹.

N(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatio on nopeimmillaan lievästi happamissa olosuhteissa (pH 4–5,5). Tämä pH-alue suosii sekä alkoksiamiinin nukleoofilistä hyökkäystä että vesimolekyylin irtoamista tetraedrisestä välituotteesta.⁴⁹ Muodostuvaa *N*-glykosididisidosta voidaan kontrolloida pH:n avulla, sillä sidos on dynaaminen pH:ssa 5 ja lähes staattinen pH:n ollessa 7. Reaktiotuotteina syntyvät *N*-alkoksiamiinoglykosidit ovat vastaavasti stabiileja neutraalissa pH:ssa. Edellä mainittujen ominaisuuksiensa ansiosta *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiota voidaan hyödyntää muun muassa pH-kontrolloidussa DNA-templatoidussa ligaatioreaktiossa. Watson-Crick-emäsparit ja näin ollen DNA:n tavallisimmat sekundäärirakenteet ovat suhteellisen pysyviä vielä pH:ssa 5.

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu, että hiuspinnirakenteessa *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktion nopeus ja tasapainosaanto kasvavat huomattavasti verrattuna reaktioon, jossa DNA-templaattia ei käytetä.¹⁴

Virta tutkimusryhmineen¹⁴ raportoi ensimmäisinä DNA-templatoidusta *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktiosta. He tutkivat 5'-*O*-(metyyliamino)tymidiinin (**2**) ja D-glukoosin (**3**) välisen *N*-glykosylaatioreaktion nopeutta ja tasapainosaantoa sekä DNA-templaattilla että ilman. Ensin he tutkivat ligaatiota ilman DNA-templaattia. Yhdiste **2** (5,0 mM) liuotettiin D-glukoosin (**3**; 10 mM) kanssa natriumasetatti- tai 2-(*N*-morfolino)etaanisulfonihappopuskuriliuoksiin, joiden pH-arvot olivat 4, 5 ja 6. Näyteliuosten ionivahvuus oli säädetty natriumkloridilla 0,1-molaariseksi ja mittaukset suoritettiin 24 °C:ssa. *N*-glykosylaatioreaktion nopeus sekä tasapainovakio määritettiin jokaisessa pH:ssa RP-HPLC:n avulla. Tutkimuksessa havaittiin, että pH:ssa 4 reaktion puoliintumisaika oli yli 74-kertaa lyhyempi ja tasapainosaanto laskenut lähes 17 % verrattuna reaktioon pH:ssa 6 (Taulukko 2). Jokaisessa reaktiossa havaittiin vain β -anomeeria.¹⁴

Taulukko 2. 5'-*O*-(metyyliamino)tymidiinin (**2**) ja D-glukoosin (**3**) välisen *N*-glykosylaatioreaktion puoliintumisaika, tasapainosaanto, anomeerien suhde ja tasapainovakio eri pH-arvoissa¹⁴



pH	$t_{0,5}$	Tasapainosaanto (%)	β/α -suhde	Tasapainovakio, K (L mol ⁻¹)
4	30,8 ± 0,8 h	25,0	1:0	38,1
5	223 ± 8 h	35,1	1:0	65,6
6	95,6 ± 4,0 d	41,6	1:0	89,9

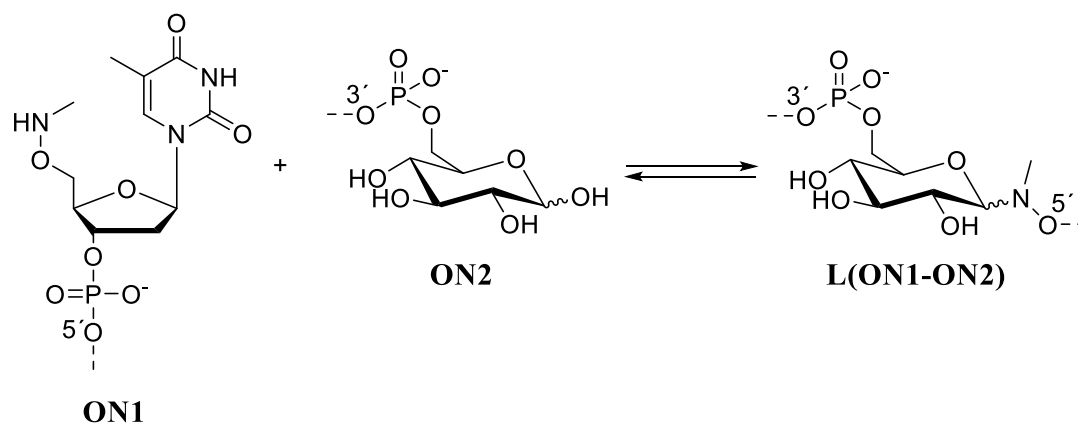
Tutkiakseen DNA-templaatin vaikutusta ligaatioon tutkimusryhmä valmisti kaksi erilaista oligonukleotidia. He syntetisoivat 5'-*O*-(metyyliamino)tymidiinistä (**2**) vastaavan fosforamidiitin (**17**, Kaavio 5), jonka he liittivät hiuspinni-oligonukleotidin 5'-

päähän (**ON1**, Taulukko 3). Toisen, lyhyemmän, oligonukleotidin 3'-päähän liitettiin D-glukoosi (**ON2**, Taulukko 3). Oligonukleotidit **ON1** (10 μM) ja **ON2** (20 μM) liuotettiin 0,1 molaariseen natriumasetaatipuskuriliuokseen (pH 5), jonka ionivahvuus oli säädetty natriumkloridilla 0,1-molaariseksi. Ligaatioreaktiota seurattiin 24 °C:ssa ioninvaihtokromatografisesti.¹⁴

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytettyjen oligonukleotidien sekvenssit¹⁴

ON1	5'- N(Me) -TCGCGATCGCGATGGTACGAATT-3'
ON2	3'- Glu -CCATGCTTAA-5'

Ioninvaihtokromatografian ja massaspektrometrian perusteella ligaatiotuotteen määrän havaittiin kasvavan ja lähtöaineiden **ON1** ja **ON2** määrän pienenevän 45 tunnin aikana. Havaitulle DNA-templatoitulle *N*-glykosylaatiolle (Kaavio 2) määritettiin puoliintumisaika, joka oli $17,7 \pm 1,4$ h sekä tasapainosaanto, joka oli noin 40 %. Mikäli oligonukleotidien välistä ligaatiota voitaisiin käsitellä bimolekulaarisena reaktiona, nämä tutkimustulokset vastaisivat 6300-kertaista nopeuden nousua ja noin 1000-kertaista tasapainosaantoa verrattuna 5'-*O*-(metyyliamino)tymidiinin (**2**) ja D-glukoosin (**3**) väliseen reaktioon. DNA-templatoitu *N*-glykosylaatio on kuitenkin lähempänä intramolekulaarista reaktiota, sillä oligonukleotidit **ON1** ja **ON2** hybridisoituvat ensin toistensa kanssa tuoden D-glukoosin anomeerisen hiilen ja *N*(Me)-amino-oksiryhmän lähelle toisiaan, jolloin ligaatioreaktio on mahdollinen. Intramolekulaarisen ligaatioreaktion nopeus sekä tasapainovakio ovat riippuvaisia konsentraation sijaan D-glukoosin ja *N*(Me)-amino-oksiryhmän läheisyydestä, minkä vuoksi reaktion tarkan nopeusvakion määrittäminen on hankalaa.¹⁴



Kaavio 2. Oligonukleotidien ligaatioreaktio.¹⁴

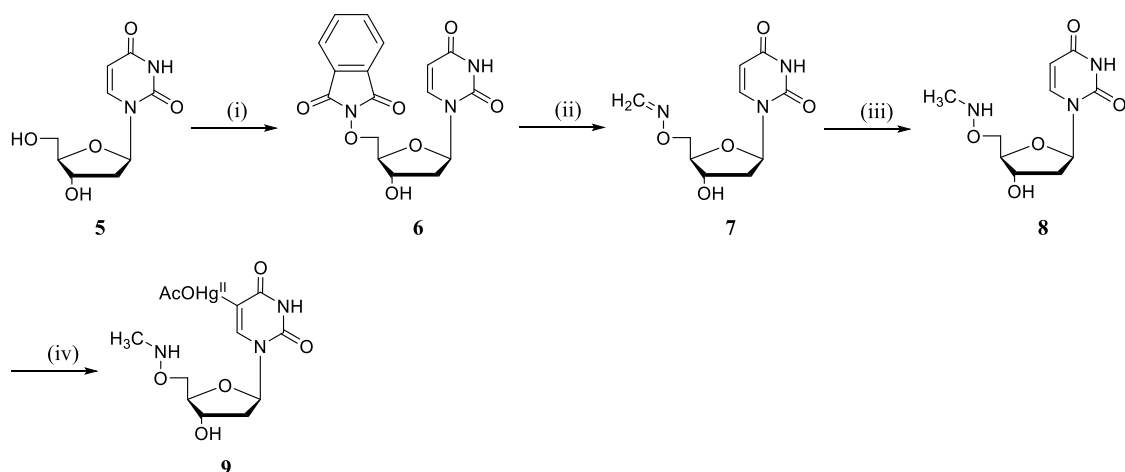
Ligaatioreaktioiden lisäksi Virta¹⁴ tutki myös ligaatiotuotteiden hajoamista. Eristetty ligaatiotuote (**L(ON1-ON2)**; 10 μ M) liuotettiin natriumasetaattipuskuriliuokseen (0,1 M, pH 5). Tutkimuksessa havaittiin ligaatiotuotteen hajoaminen takaisin lähtöaineiksi **ON1** ja **ON2** ja hajoamisreaktiolle määritettiin puoliintumisajaksi $11,8 \pm 1,0$ h.¹⁴

1.4. Metallionivälitteinen emäspariutuminen DNA-templatoitussa reaktiossa
Tässä tutkimuksessa valmistettiin 5-merkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**15**, Kaavio 4) sekä joukko *N*(Me)-alkoksiamiinioligonukleotideja. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, kuinka nopeasti 5-merkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**15**) sitoutuu oligonukleotidiin *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatiolla eri pH-alueilla ja vaikuttaako elohopeavälitteinen emäspariutuminen reaktion nopeuteen ja tasapainoon. Lisäksi tavoitteena oli tutkia merkuroidun sytidiinin affiniteettia eri vastinemäksiin.

2. Tulokset ja niiden tarkastelu

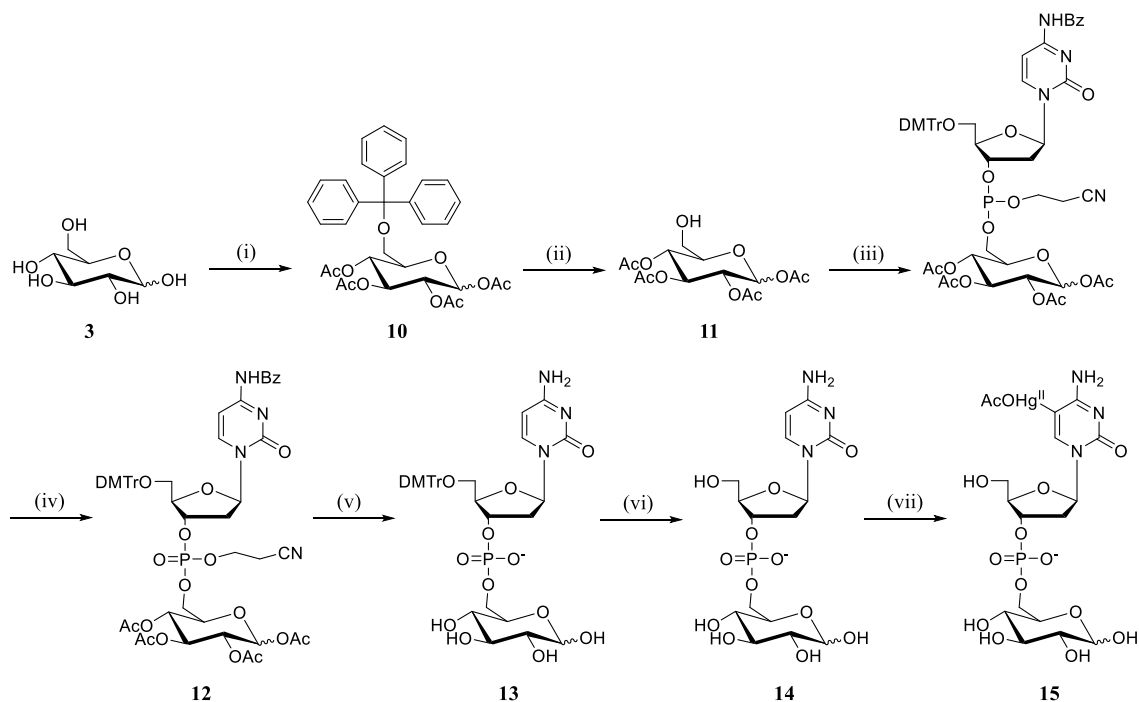
2.1. Dimeerin synteesi

Alkuperäisen suunnitelman mukaan *N*(Me)-amino-oksiryhmä olisi liitetty merkuroidun 2'-deoksiuridiinin 5'-hiileen (Kaavio 3) ja *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioon tarvittava glukoosiosa oligonukleotidin 3'-päähän. Tämä suunnitelma ei kuitenkaan toiminut, sillä merkuroitaessa 5'-*O*-(metyyliamino)uridiinia (**8**) ei havaittu lainkaan haluttua tuotetta **9**, vaan reaktion lähtöainetta **8** (m/z 258, $[M+H]^+$) sekä reaktiossa muodostunutta sivutuotetta, joka ei sisältänyt lainkaan metyyliryhmää (m/z 244, $[M-Me]^+$). Lisäksi reaktioastian pohjalle oli muodostunut metallista elohopeaa. Metyyliryhmän irtoaminen selittyy *N*(Me)-amino-oksiryhmän hapettumisella takaisin oksiidiksi, joka on myöhemmin hydrolysoitunut. Pääteltiin, että *N*(Me)-amino-oksiryhmä on hapettuessaan pelkistänyt elohopeaionit. Tämän seurauksena merkurointi epäonnistui ja reaktioliuos hävitettiin.



Kaavio 3. Alkuperäinen synteesisuunnitelma. (i) NONPhth, Ph_3P , DEAD, DMF; (ii) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$, CH_2O , DMF; (iii) NaCNBH_3 , EtOH; (iv) $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, H_2O .

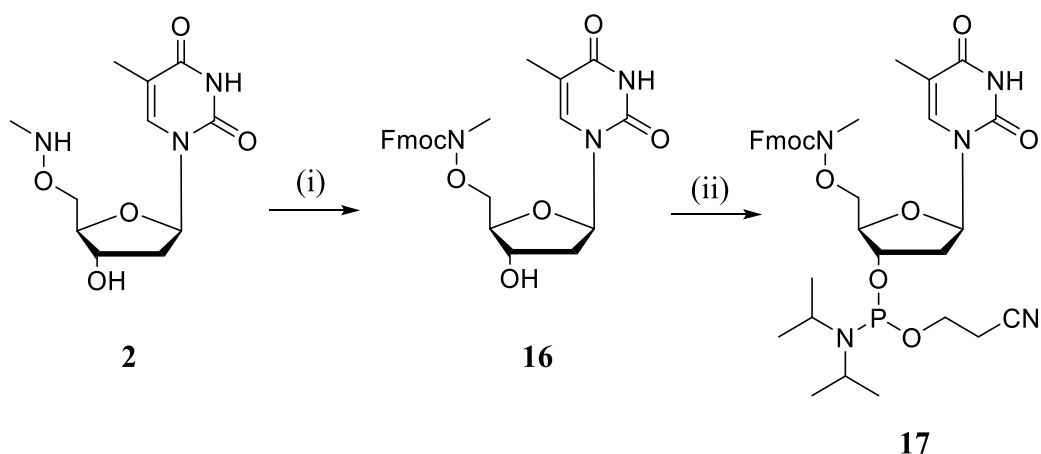
Uudessa suunnitelmassa glukoosiosa liitettiin merkuroituun sytidiiniin fosfodiesterisidoksella (Kaavio 4) ja *N*(Me)-alkoksiamiini puolestaan oligonukleotidin 5'-päähen. Suunnitelman muuttuessa myös nukleosidin emäs vaihdettiin urasiilista sytosiiniin.



Kaavio 4. 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosin (**15**) synteesi. (i) TrCl , $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, Pyridiini; (ii) TFA, H_2O , DCM; (iii) dC-CE-fosforamidiitti, 5-(bentsyylitio)-1*H*-tetratsoli, ACN; (iv) THF/ H_2O /Pyridiini/ I_2 , 90,54:9,05:0,41:0,43 (v/v/w); (v) NH_4OH ; (vi) CH_3COOH , H_2O ; (vii) $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, AcONa, D_2O .

Lähtöaineen, D-(+)-glukoosin (**3**), hydroksyyli ryhmät suojattiin käsittelemällä se ensin trityylikloridilla ja sitten etikkahappoanhydridillä kuivassa pyridiinissä. Glukoosin primäärinen 6-OH suojattiin trityyli ryhmällä ja loput hydroksyyli ryhmät asetyyli ryhmällä. Muodostuneesta 6-trityyli-D-glukoosi-1,2,3,4-tetra-asetaatista (**10**) poistettiin trityylisuojaus trifluoroetikkahapolla vesi/dikloorimetaaniliuoksessa (1:20, v/v). Reaktiotuotteena syntynyt D-glukoosi-1,2,3,4-tetra-asetatti (**11**) reagoi typpi-atmosfäärissä dC-CE-fosforamidiitin kanssa 5-(bentsyyli)-1*H*-tetratsolin toimiessa reaktion aktivaattorina. Väli tuotteena saatu fosfiittriesteri hapetettiin THF/H₂O/pyridiini/I₂-seoksella (90,54:9,05:0,41:0,43 (v/v/v/w)). Synteesin seuraavassa vaiheessa (1,2,3,4-Tetra-*O*-asetyyli glukos-6-yyli)-(2-syanoetyyli)-[*N*⁶-bentsyyli-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityli)-2'-deoksisytidin-3'-yyli]fosfaatista (**12**) poistettiin emäslabiilit suojaryhmät ammoniakkin 25 %:lla vesiliuoksella. Reaktioliuokseen lisättiin 10 ml metanolia yhdisteen liukenemisen edistämiseksi. Lopuksi myös 4,4'-dimetoksitriityli ryhmä poistettiin 5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityli)-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosista (**13**) etikkahapolla. Synteesin viimeisessä vaiheessa 2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**14**) merkuroitiin. Yhdiste **14** liuotettiin D₂O:hon natriumasetatin ja elohopea-asetatin kanssa 50 °C:ssa. Reaktiota seurattiin ¹H-NMR:llä. Kun reaktion oli todettu menneen loppuun, ylimääräinen elohopea saostettiin reaktioliuoksesta natriumkloridilla. ¹H-, ¹³C- ja ³¹P-NMR-spektrien sekä massaspektrin perusteella reaktiossa havaittiin muodostuneen oikeaa yhdistettä **15**. Synteesin tarkempi kuvaus on esitetty tutkielman osiossa 4.

2.2. 5'-*O*-(Metyyliamino)tymidiinin fosforamidiittirakennuspalikan synteesi



Kaavio 5. 5'-*O*-(Metyyliamino)tymidiinin fosforamidiittirakennuspalikan (**17**) synteesi.
 (i) FmocCl, K₂CO₃, H₂O, dioksaani; (ii) 2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyylifosforamidokloridiitti, Et₃N, DCM.

N(Me)-amino-oksiryhmän sisältävä tymidiini ja vastaava fosforamidiittirakennuspalikka (**17**) syntetisoitiin aiemmin julkaistun proseduurin mukaan (Kaavio 5).¹⁴ Synteesi aloitettiin aiemmin valmistetun 5'-*O*-(metyyliamino)tymidiinin (**2**) puhdistamisella. Synteesin seuraavassa vaiheessa *N*(Me)-amino-oksiryhmä suojattiin Fmoc-suojaryhmällä. Yhdiste **2** liuotettiin kaliumkarbonaatin ja FmocCl:n kanssa vesi/dioksaani-liuokseen (1:1, v/v). Reaktiossa muodostuneen 5'-*O*-[*N*-(9-fluorenyylimetoksikarbonyyli)metyyliamino]tymidiinin (**16**) 3'-OH-ryhmä fosfityloitiin synteesin viimeisessä vaiheessa. Tolueenista haihduttamalla kuivattu **16** liuotettiin argon-ilmakehässä kuivaan dikloorimetaaniin. Liuos tehtiin emäksiseksi kalsiumhydridillä kuivatulla trietyyliamiinilla, minkä jälkeen reaktioluokseen lisättiin 2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyylifosforamidokloridiitti. Synteesin lopputuotteen **17** todettiin ¹H-NMR:n perusteella olevan tarpeeksi puhdasta oligonukleotidien synteesiin.

2.3. Oligonukleotidien synteesi

Oligonukleotidit **ON1-ON4** (Taulukko 4) syntetisoitiin 1 μmol skaalassa kaupallisista DNA-fosforamidiittirakenneyksiköistä, syntetisoidusta fosforamidiittirakenneyksiköstä (**17**) sekä adeniinikantajasta.

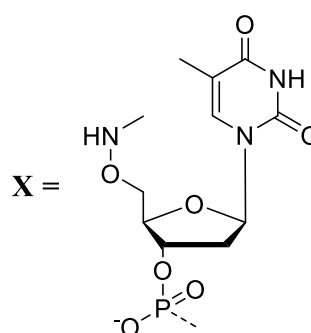
Oligonukleotidit **ON1-ON4** syntetisoitiin kaiken kaikkiaan kahteen kertaan. Ensimmäisellä kerralla **ON1-ON4** syntetisoitiin kokonaan valmiiksi fosforamidiitin (**17**) kanssa, mutta ammonolyysin jälkeen massaspektreissä näkyi oikeiden oligonukleotidien lisäksi myös tuntemattomia, odotettua raskaampia, massoja. Epäiltiin, että kaikki oligonukleotideissa kiinni olleet suojaryhmät eivät olisi irronneet ammonolyysin aikana, joten **ON1-ON4** laitettiin ammonolyysiin uudelleen. Toisen ammonolyysin jälkeen massaspektreissä näkyi samoja massoja kuin edelliselläkin kerralla, mutta näiden lisäksi jokaisessa oligonukleotidissa havaittiin [M-3H]³⁻ -ionissa *m/z*-arvon lasku -9, eli oligonukleotideista oli lohjennut -27. Epäiltiin, että yhdiste **17** olisi hajonnut toisen ammonolyysin aikana.

Toisella kerralla oligonukleotidit **ON1-ON4** syntetisoitiin ensin ilman 5'-pään muokattua fosforamidiittirakenneyksikköä (**17**), jonka jälkeen pieni näyte kutakin irrotettiin kantajasta ammoniakkin 25 %:lla vesiliuoksella 55 °C:ssa ja analysoitiin massaspektrometrisesti synteesin onnistumisen varmistamiseksi. Kun **ON1-ON4** synteesi ilman fosforamidiittia **17** oli todettu massaspektrien perusteella onnistuneeksi, **17** liitettiin oligonukleotideihin DNA/RNA-syntetisaattorilla, **ON1-ON4** irrotettiin kantajista ammonolyysillä ja puhdistettiin RP-HPLC:lla. Oligonukleotidien **ON1-ON4** puhdistaminen oli vaikeaa, sillä raakatuotteissa oli mukana myös sellaisia

oligonukleotideja, joissa fosforamidiittirakenneyksikköä **17** ei ollut kiinni lainkaan. Koska tällaiset oligonukleotidit olivat vain yhden monomeerin verran lyhyempiä kuin halutut oligonukleotidit, niiden erottelu toisistaan oli RP-HPLC:lla hankalaa. Lyhyempää oligonukleotidia oli kuitenkin selkeästi vähemmän näytteissä, jotka olivat puhdistettu RP-HPLC:lla useampaan kertaan. Koska oligonukleotidien puhdistaminen vaati useamman puhdistuskerran, niiden saannot jäivät alhaisiksi. Oligonukleotidia **ON3** ei saatu tarpeeksi puhtaaksi ligaatiotutkimuksia varten työhön varatun ajan puitteissa.

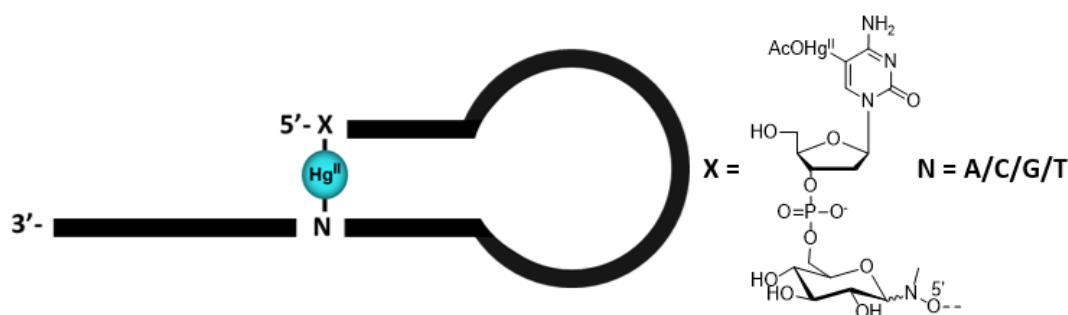
Taulukko 4. Syntetisoitujen oligonukleotidien sekvenssit

ON1	5'-XCGCGATCGCGAT A GTA-3'
ON2	5'-XCGCGATCGCGAT G GTA-3'
ON3	5'-XCGCGATCGCGAT C GTA-3'
ON4	5'-XCGCGATCGCGAT T GTA-3'



2.4. Ligaatiotutkimukset

Oligonukleotidin **ON2** sekä 5-merkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosin (**15**) välistä ligaatioreaktiota (Kuva 13) tutkittiin anioninvaihtokromatografialla pH:ssa 5,5 ja 6,0 huoneenlämpötilassa.



Kuva 13. Valmistettujen hiuspinnien oletettu rakenne ligaation tapahduttua.

5-Merkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**15**; 10 μ M) ja **ON2** (10 μ M) liuotettiin 20 mM kakodylaattipuskuriliuokseen (pH 6 ja 5,5), joiden ionivahvuus oli 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella). Reaktioliuokset suojattiin valolta. Jotta voitiin tutkia elohopean vaikutusta oligonukleotidin ja merkuroidun sytydiinin väliseen ligaatioreaktioon, vastaavat reaktioliuokset valmistettiin myös merkuroimattomasta sytydiini-

glukoosidimeeristä (**14**) ja oligonukleotidista **ON2**. Näiden lisäksi ioninvaihto-HPLC:lla analysoitiin vastaavat näytteet myös pelkästä oligonukleotidista **ON2** (2 µM) ja yhdisteestä **15** (2 µM) 4 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 6,0), jonka ionivahvuus oli 0,02 M (1 M NaClO₄-liuoksella säädetty).

Ioninvaihto-HPLC-kromatogrammeissa lähtöaineen **ON2** piikki eluoitui noin 8 min kohdalla (Kuva 14). Ligaatiotuote eluoitui olkapäänä tämän piikin jälkeen. Kromatogrammeista integroitiin **ON2**- sekä ligaatiotuotepiikki ja näiden avulla laskettiin **ON2**:n ja ligaatiotuotteen konsentraatiot eri ajan hetkillä.

Alla on esitetty yhtälö (1), jolla on tehty **ON2**-konsentraation vähenemistä kuvaavien käyrien sovitukset mittapisteisiin. Sovitetusta käyrästä on saatu **ON2** tasapainokonsentraatio, nopeusvakio ja puoliintumisaika **ON2** vähenemiselle sekä pH:ssa 6 että pH:ssa 5,5. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

$$y = Ae^{-\frac{x}{t}} + y_0 \quad (1)$$

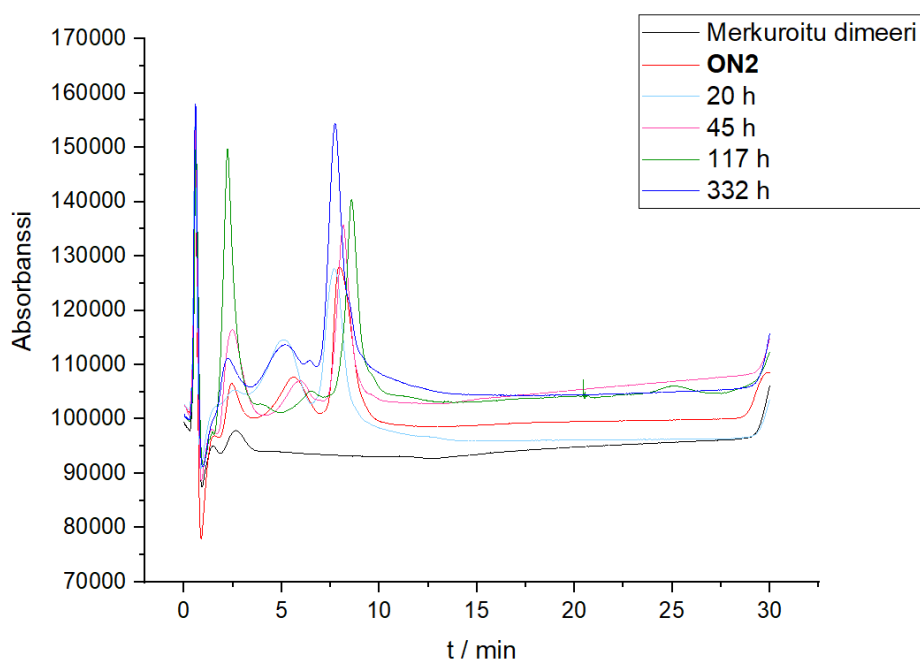
Yhtälössä 1 y on **ON2**:n konsentraatio (mol l⁻¹), A on **ON2**:n konsentraation muutos tasapainossa, x on aika sekunteina, t on nopeusvakion käänteisluku ja y₀ on **ON2**:n tasapainokonsentraatio.

Taulukko 5. Ligaatioreaktioiden tulokset. Reaktio-olosuhteet: 5-merkuri-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosi (**15**, 10 µM) tai 2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosi (**14**, 10 µM) ja **ON2** (2 µM) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 6 tai 5,5), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C.

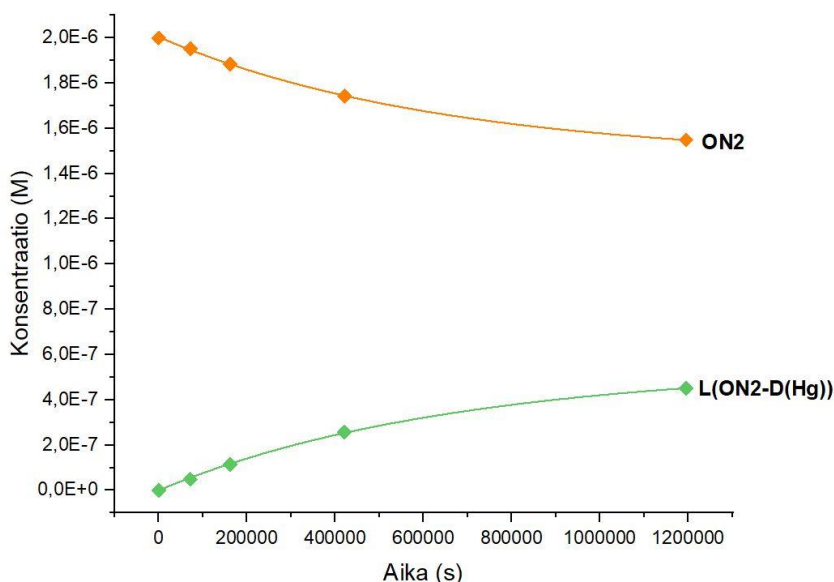
Ligaatioreaktio	pH	[ON2] _{eq} (10 ⁻⁶ M)	Nopeusvakio, k (s ⁻¹)	t _{0,5}
Merkuroitu	6,0	1,46	1,56 · 10 ⁻⁶	124,8 h
Merkuroimaton	6,0	1,80	9,54 · 10 ⁻⁶	20,1 h
Merkuroitu	5,5	1,73	9,97 · 10 ⁻⁶	18,2 h
Merkuroimaton	5,5	1,80	9,80 · 10 ⁻⁶	19,4 h

Kun verrataan merkuroidun ja merkuroimattoman dimeerin ligaatioreaktioita pH:ssa 6,0 sekä pH:ssa 5,5 huomataan, että merkuroidun dimeerin ligaatioreaktioissa lähtöaineen **ON2** tasapainokonsentraatio on alhaisempi kuin merkuroimattoman dimeerin reaktioissa. Tämä tarkoittaa sitä, että merkuroidun dimeerin kanssa reaktio on edennyt pidemmälle. Lisäksi huomataan, että pH:ssa 6,0 merkuroidun dimeerin reaktiossa **ON2**:n

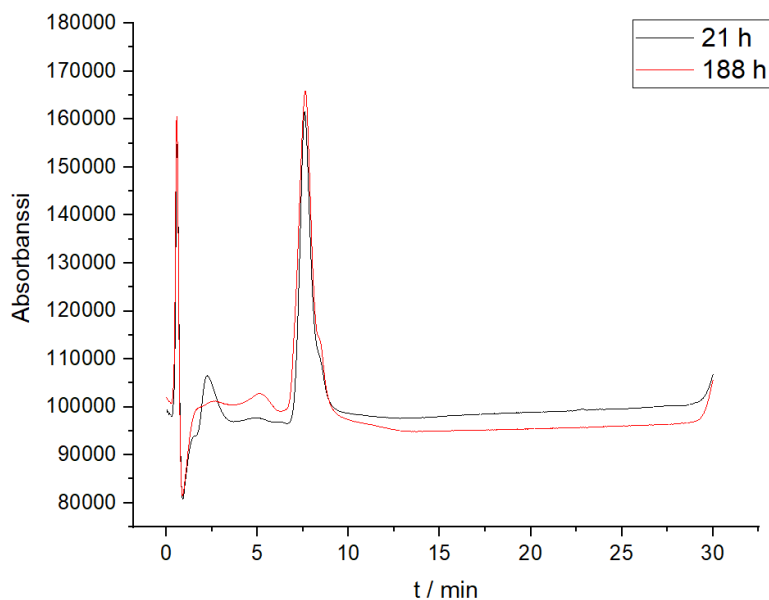
tasapainokonsentraatio on alhaisempi kuin pH:ssa 5,5. Tämä johtuu siitä, että alhaisemmassa pH:ssa liuoksessa on enemmän protoneja, minkä seurauksena elohopean koordinaatio vastinemäksen typpi-atomiin kilpailee protonaation kanssa. Tuloksista havaitaan myös, että *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktio on nopeampi pH:ssa 5,5 kuin pH:ssa 6,0, mikä on sopusoinnussa aiempien tutkimustulosten¹⁴ kanssa.



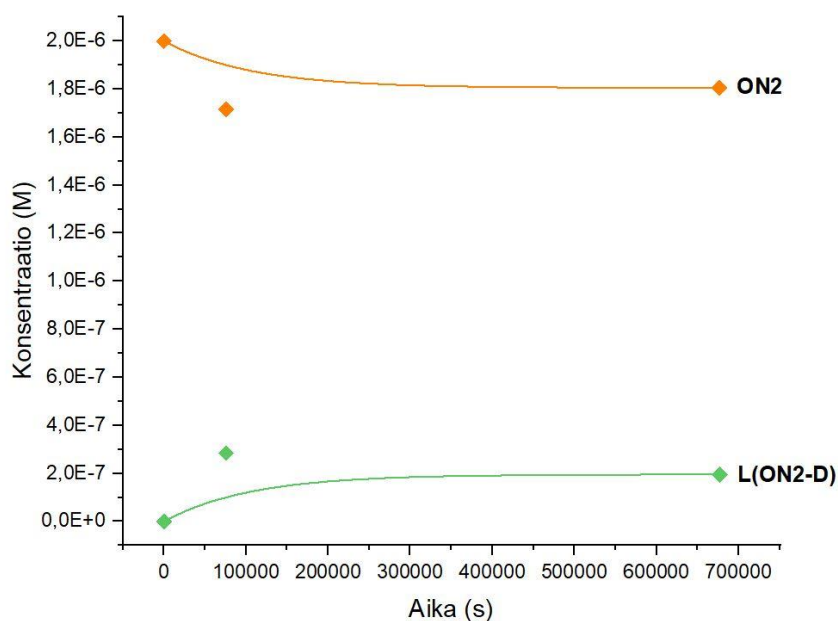
Kuva 14. Ligaatioreaktion (pH 6,0) HPLC-kromatogrammit ajanhetkillä 20 h, 45 h, 117 h ja 332 h. Reaktio-olosuhteet: 5-merkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**15**; 10 μ M) ja **ON2** (2 μ M) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 6), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C. Lisäksi kuvaajassa on yhdisteen **15** ja oligonukleotidin **ON2** HPLC-kromatogrammit.



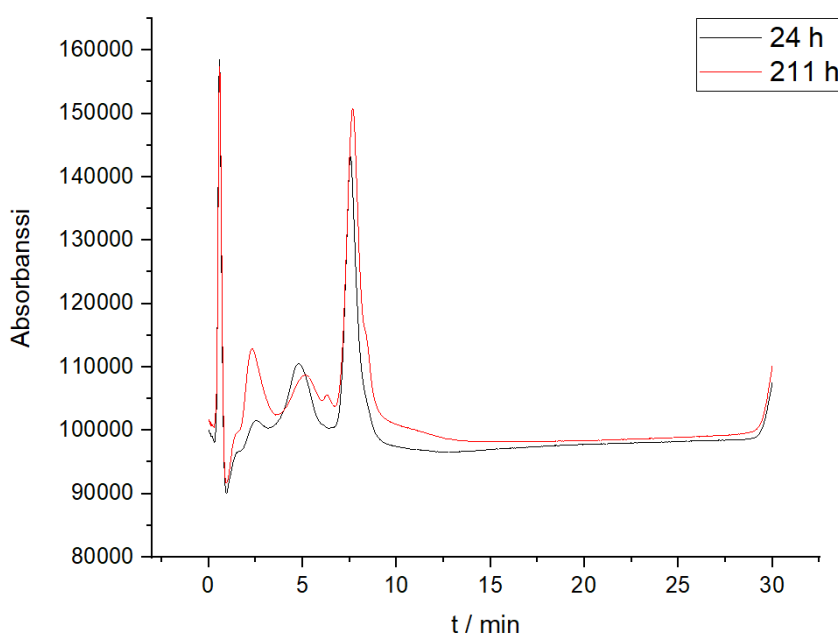
Kuva 15. ON2:n ja ligaatiotuotteen konsentraatiot ajan funktiona pH:ssa 6,0. Reaktioolosuhteet: 5-merkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**15**; 10 μ M) ja ON2 (2 μ M) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 6,0), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C. **D(Hg)** viittaa yhdisteeseen **15** ja **L(ON2-D(Hg))** ligaatiotuotteeseen.



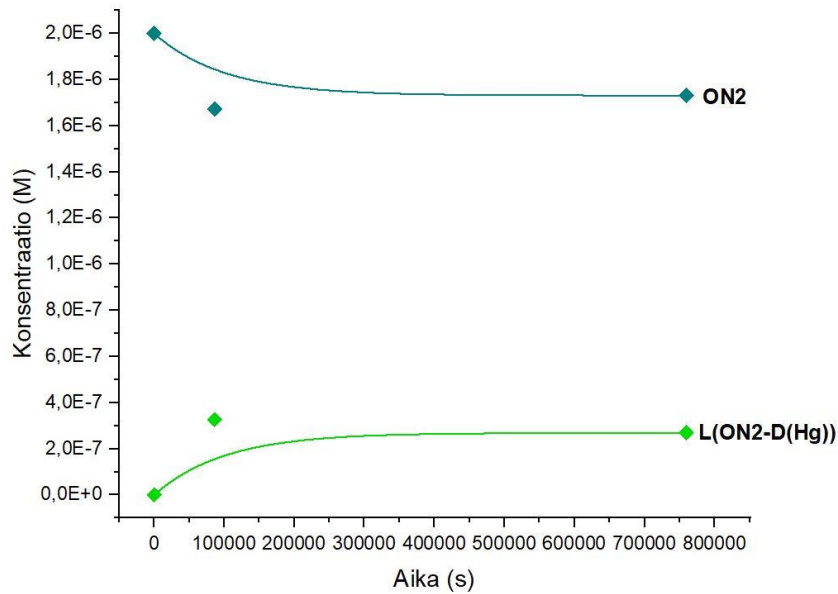
Kuva 16. Vertailuligaatioreaktion (pH 6,0) HPLC-kromatogrammit ajanhetkillä 21 h ja 188 h. Reaktio-olosuhteet: 2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**14**; 10 μ M) ja ON2 (2 μ M) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 6,0), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C.



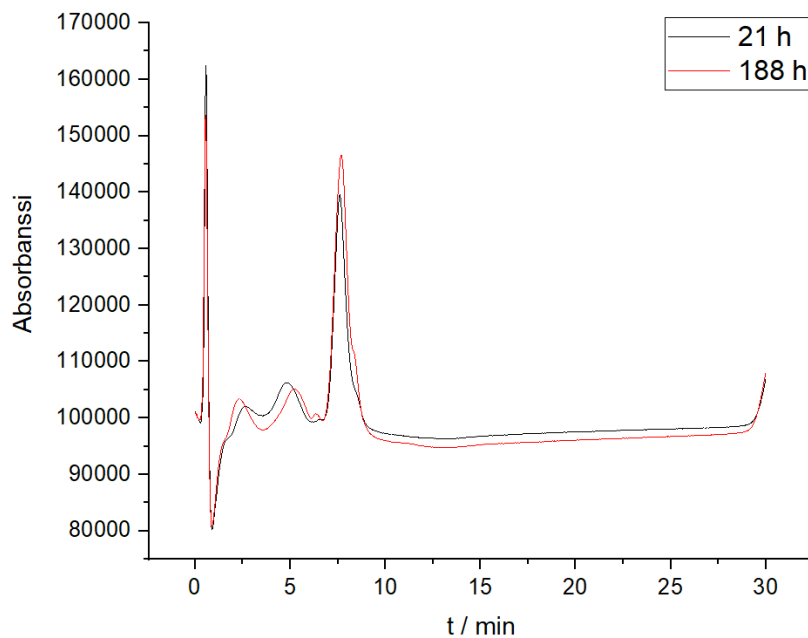
Kuva 17. ON2:n ja ligoitotuotteen konsentraatiot ajan funktiona vertailuligaatioreaktiossa pH:ssa 6,0. Reaktio-olosuhteet: 2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**14**; 10 μ M) ja ON2 (2 μ M) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 6), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C. **D** viittaa yhdisteeseen **14** ja L(ON2-D) ligoitotuotteeseen.



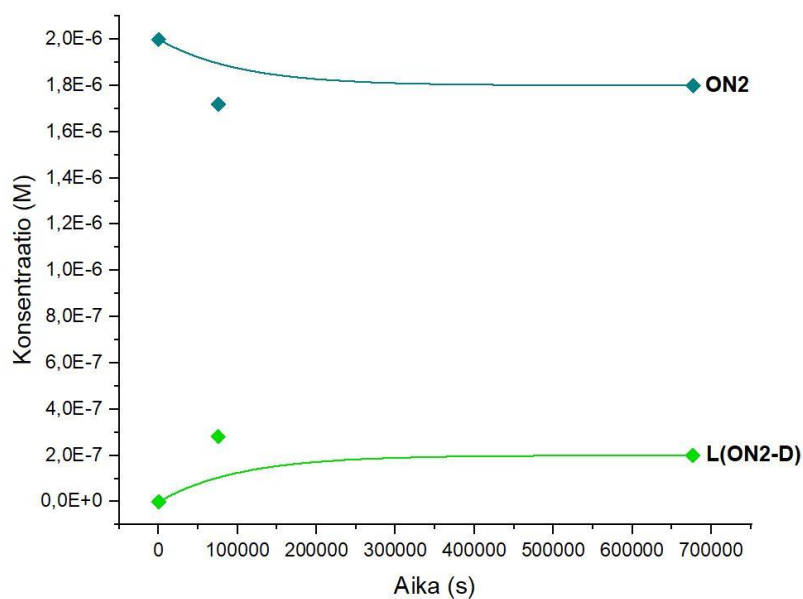
Kuva 18. Ligoitoreaktion (pH 5,5) HPLC-kromatogrammit ajanhetkillä 24 h ja 211 h. Reaktio-olosuhteet: 5-merkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**15**; 10 μ M) ja ON2 (2 μ M) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 5,5), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C.



Kuva 19. ON2:n ja ligaatiotuotteen konsentraatiot ajan funktiona pH:ssa 5,5. Reaktioolosuhteet: 5-merkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**15**; 10 μM) ja ON2 (2 μM) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 5,5), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C. **D(Hg)** viittaa yhdisteeseen **15** ja **L(ON2-D(Hg))** ligaatiotuotteeseen.



Kuva 20. Vertailuligaatioreaktion (pH 5,5) HPLC-kromatogrammit ajanhetkillä 21 h ja 188 h. Reaktio-olosuhteet: 2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosi (**14**; 10 μM) ja ON2 (2 μM) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 5,5), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C.



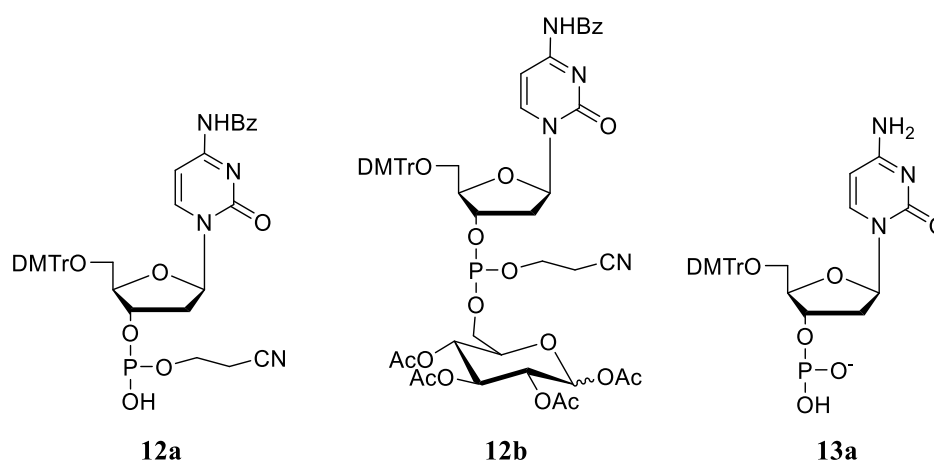
Kuva 21. ON2:n ja ligaatiotuotteen konsentraatiot ajan funktiona vertailuligaatioreaktiossa pH:ssa 5,5. Reaktio-olosuhteet: 2'-deoksisytydilyyli-3',6-glukoosi (**14**; 10 μ M) ja ON2 (2 μ M) 20 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 5,5), reaktioliuoksen ionivahvuus 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), 25 °C. **D** viittaa yhdisteeseen **14** ja L(ON2-D) ligaatiotuotteeseen.

3. Johtopäätökset ja yhteenveto

Yhdiste **15** syntetisoitiin onnistuneesti, mutta kokonaissaanto jäi alhaiseksi. Alhaiseen saantoon vaikutti etenkin yhdisteen **11** vajaa reagointi dC-CE-fosforamidiitin kanssa sekä yhdisteen **12** vajaa hapettuminen. Yhdisteen **12** havaittiin ³¹P-NMR-spektrin perusteella olevan epäpuhdasta, sillä siinä näkyi useita ylimääräisiä piikkejä. Suurimpana ylimääräisenä piikkinä ³¹P-NMR-spektrissä havaittiin siirtymällä 10,49 ppm oleva singletti, joka viittaa rakenteeseen, jossa ei ole anomeriaa eikä diastereomeriaa fosforin suhteen. Toisin sanoen tästä rakenteesta puuttui glukoosi. Siirtymän ja stereoisomerian puuttumisen perusteella kyseinen epäpuhtaus voisi olla hapettumaton tuote, jossa glukoosin tilalla on hydroksyyli-ryhmä (**12a**, Kuva 22). Massaspektrissä puolestaan näkyi *m/z* 1081,3865, mikä puolestaan viittaa fosfiittitriesteriväli-ituotteeseen, jossa olisi glukoosi kiinni (**12b**). Yhdisteen **12** vajaa hapettuminen selittyy sillä, että synteesissä hapetinta lisättiin vain 0,8 ekvivalenttia yhdisteeseen **11** verrattuna.

Myös yhdiste **13** oli ³¹P-NMR:n perusteella epäpuhdasta. ³¹P-NMR-spektrissä oli siirtymällä 6,19 ppm ylimääräinen singletti, joka viittaa jälleen rakenteeseen, jossa ei ole anomeriaa eikä näin ollen glukoosia. Massaspektri tukee tätä, sillä massaspektrissä näkyi *m/z* 592,2351, joka viittaa hapettumattomaan hydrolyysituotteeseen, josta ovat irronneet

muut suojaryhmät paitsi 4,4'-dimetoksitriityyli (**13a**). Laskettu massa tälle yhdisteelle on 592,18543. Lisäksi ^{31}P -NMR-spektrin tuotepiikki oli jakautunut kolmeksi piikiksi. Kahtia jakautunut piikki kertoo anomeriasta, mutta kolmannelle piikille ei löydy selitystä. Myös ^1H - ja ^{13}C -NMR-spektreissä näkyy tuntemattomia piikkejä, kuten myös massaspektrissä, jossa on tuotepiikkiäkin suurempana m/z 812,3416. Yhdiste **14** oli ^1H -, ^{13}C - ja ^{31}P -NMR-spektriensä perusteella melko puhdasta, kun taas yhdiste **15** oli ^{31}P -NMR-spektriensä perusteella hieman epäpuhdasta. Yhdisteessä **15** havaittiin sekä α - että β -anomeerit.



Kuva 22. Todennäköisten sivutuotteiden rakennekaavat.

Yhdiste **17** syntetisoitiin myös onnistuneesti ja sen todettiin ^1H -NMR:n perusteella olevan tarpeeksi puhdasta oligonukleotidien synteisiin sellaisenaan. Synteesin kokonaissaanto oli 48 %.

Myös oligonukleotidien **ON1-ON4** syntetisointi onnistui lopulta. Synteesien saantoa olisi voinut saada paremmaksi käyttämällä yhdistettä **17** vielä enemmän verrattuna oligonukleotideihin. Lisäksi osa ongelmista johtui varmasti myös oligonukleotidien syntetisoinnissa käytetystä vanhasta syntetisaattorista, joka on myöhemmin korvattu uudella. Myös RP-HPLC-olosuhteita olisi voinut optimoida enemmän, jotta oligonukleotidien **ON1-ON4** puhdistamiseen ei olisi tarvittu niin monta puhdistuskertaa ja näin ollen tuotetta olisi säästynyt enemmän. **ON3**:a ei saatu tarpeeksi puhtaaksi ligoitotutkimuksia varten työhön varatun ajan puitteissa.

Ligoitotutkimuksissa ioninvaihto-HPLC:n olosuhteita voisi optimoida vielä enemmän, jotta tuotepiikki saataisiin erottumaan paremmin lähtöainepiikistä. Ligoitotutkimusten perusteella merkuraatio dimeerissä saa DNA-templatoituneen $N(\text{Me})$ -alkoksiamiiniglykosylaatioreaktion tasapainon siirtymään enemmän tuotteiden puolelle

kuin sellaisessa DNA-templatoidussa *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktiossa, jossa dimeeriä ei ole merkuroitu. Lisäksi elohopea koordinoituu lujemmin pH:ssa 6,0 kuin pH:ssa 5,5. DNA-templatoidun *N*(Me)-alkoksiamiiniglykosylaatioreaktion nopeus puolestaan hidastuu pH:n kasvaessa, mikä on sopusoinnussa aiempien tutkimustulosten¹⁴ kanssa.

4. Kokeelliset menetelmät

4.1 Yleiset menetelmät

Reaktioissa käytetyt liuottimet kuivattiin molekyyliseuloilla. Reagenssit kuivattiin eksikkaattorissa fosforipentoksidilla. NMR-spektrit mitattiin Bruker 500 MHz Avance-III - ja Bruker 600 MHz Avance-III -NMR-spektrometreillä. Massaspektrit mitattiin Bruker ESI-microTOF-Q-massaspektrometrillä. Reaktioiden etenemistä seurattiin ohutlevykromatografialla (TLC) sekä HPLC-MS:llä (Agilent 6120).

4.2 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosin (**15**) synteesi

4.2.1 6-Trityyli-d-glukoosi-1,2,3,4-tetra-asetatti (TGTA, **10**)

Kuiva D-(+)-glukoosi (**3**; 6,0320 g, 33,481 mmol) ja trityylikloridi (10,0285 g, 35,973 mmol) punnittiin liekitettyyn keittopulloon. Keittopulloon lisättiin kuivattu pyridiini (25 ml) ja reaktioliuosta sekoitettiin 90 °C:ssa öljyhauteessa, kunnes lähtöaineet olivat lienneet kokonaan. Reaktioliuokseen lisättiin etikkahappoanhydridi (18 ml, 190,4 mmol), jonka jälkeen liuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 16 h. Tämän jälkeen reaktioliuos kaadettiin hitaasti jääveden (800 ml) ja etikkahapon (50 ml) seokseen ja sitä sekoitettiin 4 h. Muodostunut valkoinen sakka imusuodatettiin ja pestiin kylmällä vedellä. Sakka jätettiin yön yli kuivumaan vetokaappiin. Kuivunut sakka suspentoitiin dietyylieetteriin (20 ml) ja suspensiota sekoitettiin 10 min, jonka jälkeen sakka imusuodatettiin ja kuivattiin vakuumieksikaattorissa. TGTA:n valmistuksesta jatkettiin suoraan GTA:n valmistukseen. Saanto 10,14 g (51 %).

4.2.2 D-glukoosi-1,2,3,4-tetra-asetatti (GTA, **11**)

TGTA (**10**; 10,1384 g, 17,1654 mmol), vesi (0,8 ml) ja dikloorimetaani (16 ml) sekoitettiin keskenään keittopullossa. Liuokseen lisättiin hitaasti trifluoroetikkahappo (5,1 ml, 67 mmol), jonka jälkeen reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 10 min. Reaktioliuokseen lisättiin vettä (40 ml) ja dikloorimetaania (40 ml), jonka jälkeen muodostuneet faasit erotettiin toisistaan erotussuppilolla. Vesifaasia uutettiin uudelleen dikloorimetaanilla (81 ml), jonka jälkeen orgaaniset faasit yhdistettiin ja niitä pestiin kylläisellä NaHCO₃-liuksella (101 ml) sekä vedellä (2 x 100 ml). Orgaaninen faasi

kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja liuos konsentroidtiin pyöröhaihduttajalla. Muodostunut valkoinen vaahto liuotettiin mahdollisimman pieneen määrään kuivattua dietyylieetteriä. Liuotusta tehostettiin lämmittämällä reaktioliuosta vesihautessa, jonka jälkeen liuos jätettiin yön yli kiteytymään jääkaappiin. Muodostuneet kiteet puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (heksaani/etyyliasetatti, 35:65, v/v). Saanto 0,83 g (14 %).

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 7,29 (CDCl_3), 5,75 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz, H1), 5,33 (t, 1H, $J = 8,2$ Hz, H4), 5,15-5,11 (m, 2H, H2 ja H3), 3,79 (d, 1H, $J = 10,6$ Hz, H6'), 3,67 (m, 1H, H6''), 3,60 (m, 1H, H5), 2,16 (m, 1H, OH), 2,09 (s, 3H, O-Ac), 2,06 (s, 3H, O-Ac), 2,06 (s, 3H, O-Ac), 2,05 (s, 3H, O-Ac).

4.2.3 (1,2,3,4-Tetra-*O*-asetyyliglukos-6-yyli)-(2-syanoetyyli)-[N^6 -bentsoyyli-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityli)-2'-deoksisytidin-3'-yyli]fosfaatti (**12**)

D-glukoosi-1,2,3,4-tetra-asetatti (**11**; 0,2746 g, 0,7884 mmol) liuotettiin typpi-atmosfäärissä kuivaan asetonitriiliin (6,3 ml). Liuokseen lisättiin dC-CE-fosforiamidiitti (0,6791 g, 0,8143 mmol) sekä 5-(bentsyyli-tio)-1*H*-tetratsolin asetonitriililiuos (6,3 ml, 1,6 mmol), jonka jälkeen liuosta sekoitettiin 30 min. Reaktioliuokseen lisättiin hapetinta (THF/ H_2O /pyridiini/ I_2 , 90,54:9,05:0,41:0,43 (v/v/v/w)) (32 ml, 0,64 mmol), minkä seurauksena liuos muuttui kellertävän väriseksi. Reaktioliuosta konsentroidtiin pyöröhaihduttajalla, jonka jälkeen se pestiin 5 %:lla natriumbisulfiitin vesiliuoksella (100 ml) ja kuivattiin natriumsulfaatilla. Liuos haihdutettiin kuiviin ja puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (TEA/MeOH/ CH_2Cl_2 , 1:10:89, v/v). Saanto 0,56 g (80 %).

ESI⁺-MS: m/z 1097,3859 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 1119,3610 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 1135,3408 [$\text{M}+\text{K}$]⁺ (havaittu). m/z 1097,3427 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (laskettu).

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 7,91 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, Bz), 7,63 (m, 1H, Bz), 7,53 (m, 2H, Bz), 7,47-7,12 (m, 12H, CDCl_3 , DMTr, H6), 6,87 (m, 4H, DMTr), 6,31 (m, 1H, H1'), 5,72 (m, 1H, Glu-H1), 5,28 (m, 1H, H5), 5,12 (m, 2H, Glu-H4, H3'), 4,53 (m, 1H, Glu-H2), 4,44-4,06 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CN}$, H4', Glu-H3), 3,82 (m, 7H, O-Me), 3,77 (m, 2H, Glu-H6), 3,70-3,61 (m, 1H, Glu-H5), 3,57-3,43 (m, 2H, H5', H5''), 2,96 (m, 1H, H2'), 2,77 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CN}$), 2,72 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CN}$), 2,39 (m, 1H, H2''), 2,21-1,97 (m, 11H, O-Ac), 1,87 (m, 1H, O-Ac).

$^{31}\text{P-NMR}$ δ_{P} (200 MHz, CDCl_3): -2,87 (O=P(OR)₃).

4.2.4 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosi (**13**)

Yhdiste **12** (0,5291 g, 0,4823 mmol) liuotettiin 25 %:een ammoniakkin vesiliuokseen (10 ml). Reaktioliuokseen lisättiin 10 ml metanolia lähtöaineen liukenemisen edistämiseksi. Liuos lämmitettiin öljyhauteella noin 50 °C:een, jonka jälkeen se jätettiin sekoittumaan yön yli. Tämän jälkeen reaktioliuos haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (TEA/MeOH/etyyliasettaatti, 1:3:96 → 1:20:79, v/v). Fraktioiden puhtaus tarkistettiin NMR- ja massaspektrometrisesti. Epäpuhtaat tuotefraktiot yhdistettiin, haihdutettiin kuiviin ja puhdistettiin uudelleen silikageelipylväskromatografisesti (TEA/MeOH/etyyliasettaatti, 1:2:97 → 1:40:59, v/v). Etyyliasettaattijäämien poistamiseksi tuote liuotettiin metanoliin ja saatu liuos haihdutettiin kuiviin. Saanto 0,11 g (31 %).

ESI⁻-MS: m/z 770,3085 [M-H]⁻ (havaittu). m/z 770,23316 [M-H]⁻ (laskettu).

¹H-NMR δ_H (500 MHz, MeOD): 7,85 (m, 1H, H₆), 7,43 (m, 2H, DMTr), 7,31 (m, 6H, DMTr), 7,24 (m, 1H, DMTr), 6,90 (m, 4H, DMTr), 6,33 (br, 1H, H1'), 5,84 (m, 1H, Glu-H1), 5,62 (m, 1H, H₅), 5,02 (MeOH), 4,30 (m, 1H, H4'), 4,14-3,85 (m, 4H, Glu-H4, Glu-H5, Glu-H6), 3,80 (s, 6H, O-Me), 3,49 (m, 1H, H5'), 3,46-3,30 (m, 4H, Glu-H2, Glu-H3, H3', H5'), 2,74 (m, 1H, H2'), 2,36 (m, 1H, H2'').

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, MeOD): 166,1 (C₄), 158,9 (DMTr), 156,8 (C₂), 141,1 (C₆), 130,1 (DMTr), 128,1 (DMTr), 127,6 (DMTr), 126,7 (DMTr), 112,9 (DMTr), 94,7 (C₅), 86,2 (C1'), 85,4 (C4'), 81,0 (Glu-C1), 78,9 (Glu-C5), 76,2 (Glu-C3), 75,7 (C3'), 75,5 (Glu-C2), 68,7 (Glu-C4), 67,9 (C5'), 63,4 (Glu-C6), 58,5 (O-Me), 47,7 (MeOH), 33,9 (C2').

³¹P-NMR δ_P (200 MHz, MeOD): -0,22 (O=P(OR)₂OH).

4.2.5 2'-Deoksisytydylyyli-3',6-glukoosi (**14**)

Yhdiste **13** (0,1127 g, 0,1462 mmol) liuotettiin Milli-Q-veteen (10 ml). Reaktioliuokseen lisättiin 1 M etikkahappoa, kunnes liuoksen pH oli noin 3-4 (2 ml, 2,0 mmol). Reaktiota seurattiin LC-MS:llä niin, että reaktio pysäytettiin lisäämällä liuoksesta otettuun 1 μ l näytteeseen 1 ml trietyyliammoniumasettaattipuskuria, jonka pH oli 7. 1 h sekoituksen jälkeen reaktio oli edennyt hieman, mutta lähtöainetta oli edelleen jäljellä. Reaktioliuos jätettiin sekoittumaan yön yli huoneenlämpöön. Aamulla reaktion todettiin LC-MS:llä menneen loppuun ja kellertäväksi muuttunut reaktioliuos neutraloitiin lisäämällä siihen trietyyliamiinia (200 μ l, 1,435 mmol). Saatu tuote puhdistettiin HPLC-laitteella isokraattisella systeemillä: ajoliuoksena ACN/50 mM trietyyliammoniumasettaattipuskuri

pH 7 (4:96, v/v), virtausnopeus 2,5 ml min⁻¹, Thermo scientific ODS HYPERSIL -kolonni (250 x 10 mm, 5 µm), detektointi UV-detektorilla 260 nm aallonpituudella. Tuotepiikki eluoitui n. 8 min kohdalla (suurempi piikki). Kerätyt fraktiot haihdutettiin kuiviin kylmäkuivurissa, jonka jälkeen haihdutusjäännökset haihdutettiin uudelleen D₂O:sta ajoliuosjäämien poistamiseksi. Saanto 6 mg (9 %).

ESI⁺ -MS: *m/z* 492,0974 [M+Na]⁺ (havaittu). *m/z* 492,09953 (laskettu).

¹H-NMR δ_H (500 MHz, D₂O): 7,82 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, H6), 6,23 (m, 1H, H1'), 6,02 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz, H5), 5,14 (d, 1H, *J* = 4,4 Hz, Glu-H1), 4,71 (s, H₂O, H3'), 4,58 (m, 1H, Glu-H1), 4,19 (m, 1H, H4'), 4,13-3,95 (m, 2H, Glu-H6), 3,88 (m, 1H, Glu-H5), 3,80 (dd, 1H, *J* = 3,5 Hz ja 12,65 Hz, H5'), 3,73 (dd, 2H, *J* = 4,8 Hz ja 12,5 Hz, H5''), 3,67 (m, 1H, Glu-H2), 3,54-3,46 (m, 2H, Glu-H3, Glu-H5), 3,41 (m, 2H, Glu-H4, Glu-H2), 3,20 (m, 1H, Glu-H3), 2,56 (m, 1H, H2'), 2,30 (m, 1H, H2'').

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, D₂O): 165,0 (C4), 156,0 (C2), 142,2 (C6), 96,1 (C5), 96,0 (Glu-C1), 92,1 (Glu-C1), 86,2 (C1'), 85,9 (C4'), 75,6 (Glu-C2), 75,0 (C3'), 74,6 (Glu-C5), 74,1 (Glu-C3), 72,6 (Glu-C2), 71,5 (Glu-C3), 70,4 (Glu-C5), 69,3 (Glu-C4), 64,5 (Glu-C6), 61,2 (C5'), 38,3 (C2').

³¹P-NMR δ_P (200 MHz, D₂O): -0,27 (O=P(OR)₂OH).

4.2.6 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosi (15)

Yhdiste **14** liuotettiin D₂O:hon (0,5 ml), jonka jälkeen liuoksen konsentraatio määritettiin UV-spektrofotometrisesti. Liuoksesta tehtiin 10-kertainen laimennos, jonka absorbanssiksi aallonpituudella 274 nm mitattiin 0,657, kun optisen tien pituus oli 0,5 mm. Deoksisytydiinille etsittiin taulukoitu molaarinen absorptiokerroin, joka on aallonpituudella 271 nm 8860 M⁻¹cm⁻¹. Yhtälöstä (2) ratkaistiin laimennoksen konsentraatio:

$$c = \frac{A}{\epsilon l} = \frac{20 \times 0,657}{8860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 0,00148307 \text{ M.} \quad (2)$$

Reaktioliuoksen konsentraatio oli 10-kertainen laimennoksen konsentraatioon nähden eli 0,0148307 M. Tästä saatiin ratkaistua lähtöaineen **14** ainemäärä yhtälöllä (3):

$$n = Vc = 0,5 \text{ ml} \times 14,8307 \text{ mM} = 7,41535 \text{ µmol.} \quad (3)$$

Reaktio suoritettiin NMR-putkessa ja sitä seurattiin ¹H NMR-spektrometrisesti. NMR-laitteen mittapää asetettiin 50 °C:een reaktiota varten. Reaktioliuokseen lisättiin natriumasetaatti (1,2 mg, 15 µmol), jonka jälkeen ajettiin ensimmäinen ¹H-NMR -spektri.

Tämän jälkeen liuokseen lisättiin elohopea-asetatti (2,4 mg, 7,5 μmol). Noin tunnin kuluttua elohopea-asetatin lisäämisestä reaktio ei ollut edennyt juuri lainkaan $^1\text{H-NMR}$ -spektrien perusteella. Reaktioliuokseen lisättiin toinen ekvivalentti elohopea-asetattia (2,4 mg, 7,5 μmol). Kahden tunnin kuluttua reaktion aloittamisesta reaktio oli edennyt noin 10 %. Reaktioliuos jätettiin NMR-putkessa 50 °C:een öljyhauteeseen viikonlopun yli. NMR-putki suojattiin valolta alumiinifoliolla.

Viikonlopun aikana reaktioliuokseen oli muodostunut valkoista sakkaa. Sakka ja liuos erotettiin toisistaan sentrifugoimalla. Sakka analysoitiin $^1\text{H-NMR}$:llä liuottimena DMSO- d_6 . Spektrin perusteella sakka ei sisältänyt haluttua tuotetta.

Sakasta erotettu liuos analysoitiin LC-MS:llä käyttäen apuna elohopeaan lujasti koordinoituvaa 2-merkaptetaanolia (ME). Massanäyte valmistettiin lisäämällä 2 μl reaktioliuosta 1 ml:aan vettä, jonka jälkeen tähän liuokseen lisättiin 1 μl 2-merkaptetaanolia. LC-MS:llä saatiin näkyviin sekä haluttu tuoteioni 746 ($[\text{M}+\text{ME}]^-$), että lähtöaineioni 468 ($[\text{M}]^-$). Ionien suhde oli noin 1:1, joten reaktiota päätettiin vielä jatkaa. Reaktioliuokseen lisättiin vielä kaksi ekvivalenttia elohopea-asetattia (4,8 mg, 15 μmol) sekä neljä ekvivalenttia natriumasetattia (2,4 mg, 29 μmol). Liuos jätettiin reagoimaan yön yli 50 °C:een öljyhauteeseen. Liuoksesta ajettiin $^1\text{H-NMR}$, jonka perusteella reaktion päätettiin menneen lähes loppuun. Ylimääräinen elohopea saostettiin reaktioliuoksesta pois lisäämällä natriumkloridia (65,2 mg, 1,12 mmol).

Yhdisteen **15** ainemäärä määritettiin $^1\text{H-NMR}$ -spektrometrisesti (600 MHz, D_2O) lisäämällä reaktioliuokseen, jonka tilavuus oli 860 μl , 0,9 mg (12,3 μmol) *N,N*-dimetyyliformamidia. $^1\text{H-NMR}$ -spektrissä oli *N,N*-dimetyyliformamidista tuleva piikki 2,88 ppm kohdalla (33H, CH_3), jota verrattiin yhdisteestä **15** tulevaan piikkiin 2,64 ppm (1H, H2'). Toisin sanoen yhdisteen **15** ainemäärä oli $\frac{1}{11} \times 12,3 \mu\text{mol} = 1,119 \dots \mu\text{mol} \approx 1,12 \mu\text{mol}$ ja kokonaismassaksi saatiin 0,814 mg. Näin ollen yhdisteen **15** saantoprosentti oli 15 %.

ESI⁻-MS: m/z 704,0318 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (havaittu). m/z 704,03414 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (laskettu).

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, D_2O): 7,91 (m, 1H, H6), 6,34 (m, 1H, H1'), 5,26 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, Glu-H1), 4,70 (m, 2H, H_2O , H3'), Glu-H1), 4,20 (m, 1H, H4'), 4,15-4,02 (m, 2H, Glu-H6), 3,99-3,95 (m, 1H, Glu-H5), 3,90 (dd, 1H, $J = 4,25$ Hz ja 12,7 Hz, H5'), 3,83 (dd, 1H, $J = 5,3$ Hz ja 12,55 Hz, H5''), 3,67 (m, 1H, Glu-H2), 3,61-3,57 (m, 1H, Glu-H5),

3,56-3,52 (m, 1H, Glu-H3), 3,49 (m, 2H, Glu-H4, Glu-H2) 3,25 (m, 1H, Glu-H3), 2,65 (m, 1H, H2'), 2,41 (m, 1H, H2'').

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, D₂O): 167,8 (C4), 155,9 (C2), 147,8 (C6), 96,5 (C5), 96,0 (Glu-C1), 92,2 (Glu-C1), 86,5 (C1'), 86,1 (C4'), 75,6 (Glu-C2), 75,5 (C3'), 74,7 (Glu-C5), 74,2 (Glu-C3), 72,7 (Glu-C2), 71,8 (Glu-C3), 71,5 (Glu-C5), 69,3 (Glu-C4), 64,6 (Glu-C6), 61,5 (C5'), 38,4 (C2').

³¹P-NMR δ_P (200 MHz, D₂O): -0,17 (O=P(OR)₂OH).

4.3 3'-O-[(2-Syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyyliamino)fosfinyyli]-5'-O-[N-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)metyyliamino]tymidiinin (**17**) synteesi

4.3.1 5'-O-(Metyyliamino)tymidiini (**2**)

Aiemmin valmistettu 5'-O-(metyyliamino)tymidiini (**2**) puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (MeOH/CH₂Cl₂, 1:9, v/v). Saanto 74 mg.

¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆): 11,29 (s, 1H, NH-Tymiini), 7,54 (d, 1H, *J* = 1,14 Hz, H6), 6,68 (q, 1H, *J* = 6,8 Hz, HNO), 6,16 (t, 1H, *J* = 6,3 Hz, H1'), 5,29 (d, 1H, *J* = 4,35 Hz, OH), 4,20 (m, 1H, H3'), 3,90 (m, 1H, H4'), 3,76 (dd, 1H, *J* = 4,1 Hz ja 11,3 Hz, H5'), 3,68 (dd, 1H, *J* = 5,35 Hz ja 11,15 Hz, H5''), 3,32 (H₂O), 2,51 (m, 3H, DMSO, Me-NO), 2,14-2,08 (m, 1H, H2'), 2,08-2,03 (m, 1H, H2''), 1,79 (d, 3H, *J* = 1,1 Hz, Me-Tymiini).

4.3.2 5'-O-[N-(9-Fluorenyylimetoksykarbonyyli)metyyliamino]tymidiini (**16**)

Yhdiste **2** (74 mg, 0,27 mmol) liuotettiin kaliumkarbonaatin (49 mg, 0,35 mmol) kanssa 4 ml:aan vesi/dioksaani -liuosta (1:1, v/v), minkä jälkeen liuokseen lisättiin FmocCl (89 mg, 0,35 mmol). Liuosta sekoitettiin 3 h huoneenlämmössä, minkä jälkeen reaktioliuokseen lisättiin 8 ml kylläistä NaHCO₃-liuosta. Reaktioliuosta pestiin dikloorimetaanilla (4 x 8 ml), minkä jälkeen orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (MeOH/CH₂Cl₂, 1:9, v/v). Saanto 90 mg (67 %).

¹H-NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 9,15 (s, 1H, NH), 7,79 (d, 2H, *J* = 7,7 Hz, Fmoc), 7,59 (d, 2H, *J* = 7,47 Hz, Fmoc), 7,42 (t, 2H, *J* = 7,55 Hz, Fmoc), 7,38-7,31 (m, 3H, Fmoc, H6), 6,31 (t, 1H, *J* = 6,7 Hz, H1'), 4,68-4,59 (ddd, 2H, *J* = 6,15 Hz, 10,78 Hz ja 16,85 Hz, Fmoc), 4,36 (b, 1H, H4'), 4,25 (t, 1H, *J* = 5,79 Hz, Fmoc), 4,03-3,93 (m, 2H, H5', H5''), 3,86 (b, 1H, H3'), 3,15 (s, 3H, MeNO), 2,31 (ddd, 1H, *J* = 3,45 Hz, 6,05 Hz ja 13,75 Hz, H2'), 2,04 (m, 1H, H2''), 1,88 (s, 3H, Me-Tymiini).

^{13}C -NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3): 163,84 (C4), 157,28 (Fmoc), 150,42 (C2), 143,48 (Fmoc), 141,42 (Fmoc), 135,58 (C6), 127,86 (Fmoc), 127,20 (Fmoc), 124,72 (Fmoc), 120,09 (Fmoc), 111,04 (C5), 85,03 (C4'), 84,20 (C1'), 73,54 (C5'), 71,75 (C3'), 67,55 (Fmoc), 47,22 (Fmoc), 40,29 (C2'), 36,52 (MeNO), 12,52 (Me-Tymiini).

4.3.3 3'-O-[(2-Syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyyliamino)fosfinyyli]-5'-O-[N-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)metyyliamino]tymidiini (**17**)

Yhdiste **16** (90 mg, 0,18 mmol) haihdutettiin kolme kertaa kuivasta tolueenista, minkä jälkeen se liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (3 ml) ja kalsiumhydridillä kuivattuun trietyyliamiiniin (76 μl , 0,55 mmol) argon-ilmakehässä. Reaktioliuokseen lisättiin 2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyylifosforamidokloridiitti (53 μl , 0,24 mmol), minkä jälkeen reaktioliuosta sekoitettiin 1 h huoneenlämmössä. Reaktioliuokseen lisättiin kuivaa dikloorimetaania (25 ml) ja liuosta pestiin kylläisellä NaHCO_3 -liuoksella (3 x 20 ml). Dikloorimetaanifraktiot yhdistettiin, kuivattiin natriumsulfaattilla ja haihdutettiin kuiviin. Yhdisteen **17** todettiin ^1H -NMR:n perusteella olevan tarpeeksi puhdasta oligonukleotidien synteesiin. Saanto 91 mg (72 %).

^1H -NMR δ_{H} (500 MHz, $\text{MeCN-}d_6$): 7,86-7,81 (m, 2H, Fmoc), 7,69-7,64 (m, 2H, Fmoc), 7,46-7,39 (m, 3H, Fmoc, H6), 7,37-7,31 (m, 2H, Fmoc), 6,27-6,22 (m, 1H, H1'), 4,61-4,52 (m, 2H, Fmoc), 4,51-4,46 (m, 1H, Fmoc), 4,33-4,28 (m, 1H, H4'), 4,20 (m, 1H, H3'), 4,12 (m, 1H, H3'), 4,02-3,88 (m, 2H, H5', H5''), 3,85-3,71 (m, 2H, POCH_2), 3,67-3,59 (m, 2H, $\text{N}(\text{CH}(\text{Me})_2)_2$), 3,10 (m, 3H, $\text{N}(\text{Me})\text{O}$), 2,65 (q, 2H, $J = 6,18$ Hz, CH_2CN), 2,37 (ddd, 0,5H, $J = 3$ Hz, 6,05 Hz ja 13,8 Hz, H2'), 2,31 (ddd, 0,5H, $J = 2,65$ Hz, 5,75 Hz ja 13,8 Hz, H2'), 2,21-2,12 (m, 1H, H2''), 1,80 (m, 3H, Me-Tymiini), 1,36-1,08 (t, 12H, iPr).

^{13}C -NMR δ_{C} (125 MHz, $\text{MeCN-}d_6$): 163,85 (C4), 157,09 (Fmoc), 150,55 (C2), 143,97 (Fmoc), 141,31 (Fmoc), 135,91 (C6), 127,79 (Fmoc), 127,52 (Fmoc), 127,19 (Fmoc), 125,00 (Fmoc), 120,06 (Fmoc), 119,87 (Fmoc), 118,55 (CN), 117,31 (MeCN), 110,37 (C5), 84,85 (C1'), 83,48 (C4'), 73,97 (C5'), 73,71 (C3'), 67,35 (Fmoc), 58,34 (POCH_2), 47,08 (Fmoc), 43,13 (iPr), 38,68 (C2'), 36,14 (MeNO), 23,92 (iPr), 20,03 (CH_2CN), 11,61 (Me-Tymiini).

^{31}P -NMR δ_{P} (200 MHz, $\text{MeCN-}d_6$): 148,32 ($\text{P}(\text{OR})_3$).

4.4 Oligonukleotidien synteesi

Oligonukleotidit **ON1-ON4** (Taulukko 4) syntetisoitiin automatisoidulla DNA/RNA-syntetisaattorilla 1,0 μmol skaalalla käyttäen kaupallisia DNA-

fosforamidiittirakenneyksiköitä, syntetisoitua fosforamidiittirakenneyksikköä (**17**) sekä adeniinikantajaa. Aktivaattorina käytettiin bentsyylitiotetratsolia.

Synteesin jälkeen oligonukleotidit **ON1-ON4** irrotettiin kantajistaan liuottamalla jokainen erikseen ammoniakkin 25 %:een vesiliuokseen ja inkuboimalla liuoksia 55 °C:ssa yön yli. Inkuboinnin jälkeen liuokset haihdutettiin kuiviin ja **ON1-ON4** liuotettiin jokainen erikseen 1 ml:aan Milli-Q-vettä. Oligonukleotidiraakatuotteet analysoitiin massaspektrometrilla synteesien onnistumisen varmistamiseksi. Massaspektrinäytteet valmistettiin laimentamalla oligonukleotidien vesiliuoksista 1/200-laimennokset 50 mM TEAA, 35 % H₂O/65 % ACN -liuokseen. Raakatuotteista mitattujen massaspektrien perusteella oligonukleotidisynteesien todettiin onnistuneen.

Oligonukleotidit **ON1-ON3** puhdistettiin RP-HPLC:lla gradientteliuoinnilla 20–50 % ACN 25 min, ajoliuoksina 50 mM HAA-puskuri pH 7 ja 50 mM HAA-puskuri (H₂O/ACN, 1:1, v/v) pH 7, virtausnopeus 3 ml min⁻¹, Clarity Oligo-RP -kolonni (250 x 10 mm, 5 μm), detektointi UV-detektorilla 260 nm aallonpituudella. **ON4** puhdistettiin muuten samalla systeemillä, mutta ACN-pitoisuus muuttui 25–50 % 25 minuutissa. **ON1** ja **ON2** eluoutuivat noin 23 minuutin kohdalla, kun taas **ON4** eluotui noin 21 minuutin kohdalla. Puhdistettujen oligonukleotidien **ON1**, **ON2** ja **ON4** saannot määritettiin UV-Vis-spektrofotometrilla: **ON1** 5,5 nmol, **ON2** 4,9 nmol, **ON4** 5,0 nmol. **ON3** ei saatu puhdistettua tarpeeksi puhtaaksi aikataulun puitteissa.

ESI⁻-MS: **ON1**: m/z 1744,9476 [M-3H]³⁻ (havaittu). m/z 1744,64448 [M-3H]³⁻ (laskettu). **ON2**: m/z 1749,2657 [M-3H]³⁻ (havaittu). m/z 1749,97612 [M-3H]³⁻ (laskettu). **ON4**: m/z 1741,6276 [M-3H]³⁻ (havaittu). m/z 1741,64062 [M-3H]³⁻ (laskettu).

4.5 Ligaatiotutkimukset

Oligonukleotidin **ON2** sekä 5-merkuri-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosin (**15**) välistä ligaatioreaktiota tutkittiin anioninvaihtokromatografialla pH:ssa 5,5 ja 6,0 huoneenlämpötilassa.

Ligaatioreaktiota varten 5-merkuri-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosi (**15**; 10 μM) ja **ON2** (10 μM) liuotettiin 20 mM kakodylaattipuskuriliuoksiin (pH 6 ja 5,5), joiden ionivahvuus oli 0,1 M (säädetty 1 M NaClO₄-liuoksella), huoneenlämmössä. Reaktioliuokset suojattiin valolta. Vastaavat reaktioliuokset valmistettiin myös merkuroimattomasta sytidiini-glukoosidimeeristä (**14**) ja oligonukleotidista **ON2**. Ioninvaihto-HPLC:tä varten reaktioliuokset laimennettiin viidenteen osaan. Näiden lisäksi ioninvaihto-HPLC:lla analysoitiin vastaavat näytteet myös pelkästä

oligonukleotidista **ON2** (2 μM) ja yhdisteestä **15** (2 μM) 4 mM:ssa kakodylaattipuskuriliuoksessa (pH 6), jonka ionivahvuus oli 0,02 M (1 M NaClO_4 -liuoksella säädetty).

Ajoliuoksina ioninvaihto-HPLC:ssä käytettiin 0,01 M Tris · HCl (pH 7,6) ja 1 M NaCl, 0,01 M Tris · HCl (pH 7,6) -liuoksia ja gradientti muuttui 40–100 % NaCl 10,5 min. Kolonnina käytettiin Thermo Scientific ProSwift, SAX-1S, analytical (1 x 50 mm) -kolonnia, virtausnopeutena oli 0,2 ml min^{-1} , injektointilavuutena 50 μl ja detektointi tapahtui UV-detektorilla aallonpituudella 260 nm.

Viitteet

1. Takezawa, Y. & Shionoya, M. Metal-Mediated DNA Base Pairing: Alternatives to Hydrogen-Bonded Watson–Crick Base Pairs. *Acc. Chem. Res.* **45**, 2066–2076 (2012).
2. Devine, K. G. & Jheeta, S. De Novo Nucleic Acids: A Review of Synthetic Alternatives to DNA and RNA That Could Act as Bio-Information Storage Molecules. *Life (Basel, Switzerland)* **10**, 1–21 (2020).
3. Hirao, I., Kimoto, M. & Yamashige, R. Natural versus Artificial Creation of Base Pairs in DNA: Origin of Nucleobases from the Perspectives of Unnatural Base Pair Studies. *Acc. Chem. Res.* **45**, 2055–2065 (2012).
4. Takezawa, Y., Müller, J. & Shionoya, M. Highlight Review Artificial DNA Base Pairing Mediated by Diverse Metal Ions. *Chem. Lett* **46**, 622–633 (2017).
5. Scharf, P. & Müller, J. Nucleic acids with metal-mediated base pairs and their applications. *Chempluschem* **78**, 20–34 (2013).
6. Jash, B. & Müller, J. Metal-Mediated Base Pairs: From Characterization to Application. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 17166–17178 (2017).
7. Aro-Heinilä, A., Lönnberg, T. & Virta, P. Covalently Mercurated Molecular Beacon for Discriminating the Canonical Nucleobases. *ChemBioChem* **21**, 1–6 (2020).
8. Hande, M. *et al.* Oligonucleotide–palladacycle conjugates as splice-correcting agents. *Molecules* **24**, 1180 (2019).
9. Katz, S. The reversible reaction of Hg (II) and double-stranded polynucleotides a

- step-function theory and its significance. *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 240–253 (1963).
10. O'Reilly, R. K., Turberfield, A. J. & Wilks, T. R. The Evolution of DNA-Templated Synthesis as a Tool for Materials Discovery. *Acc. Chem. Res.* **50**, 2496–2509 (2017).
 11. Li, X. & Liu, D. R. DNA-Templated Organic Synthesis: Nature's Strategy for Controlling Chemical Reactivity Applied to Synthetic Molecules. *Angew. Chemie Int. Ed.* **43**, 4848–4870 (2004).
 12. Hesser, A. R., Brandsen, B. M., Walsh, S. M., Wang, P. & Silverman, S. K. DNA-catalyzed glycosylation using aryl glycoside donors. *Chem. Commun.* **52**, 9259–9262 (2016).
 13. Gimenez Molina, A., Barvik, I., Müller, S., Vasseur, J. J. & Smietana, M. RNA-based boronate internucleosidic linkages: An entry into reversible templated ligation and loop formation. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 8824–8830 (2018).
 14. Österlund, T., Korhonen, H. & Virta, P. DNA-Templated N(Me)-Alkoxyamine Glycosylation. *Org. Lett.* **20**, 1496–1499 (2018).
 15. Müller, J. Metal-mediated base pairs in parallel-stranded DNA. *Beilstein J. Org. Chem.* **13**, 2671–2681 (2017).
 16. Marino, T., Russo, N., Toscano, M. & Pavelka, M. Theoretical investigation on DNA/RNA base pairs mediated by copper, silver, and gold cations. *Dalt. Trans.* **41**, 1816–1823 (2012).
 17. Eichhorn, G. L. Conformational change induced by metal ions through coordination. *Coord. Chem. Rev.* **128**, 167–173 (1993).
 18. Müller, J. Nucleic acid duplexes with metal-mediated base pairs and their structures. *Coord. Chem. Rev.* **393**, 37–47 (2019).
 19. J, K. *et al.* A metallo-DNA nanowire with uninterrupted one-dimensional silver array. *Nat. Chem.* **9**, 956–960 (2017).
 20. Kosturko, L. D., Folzer, C. & Stewart, R. F. The Crystal and molecular structure of a 2:1 complex of 1-methylthymine-mercury(II). *Biochemistry* **13**, 3949–3952 (1974).

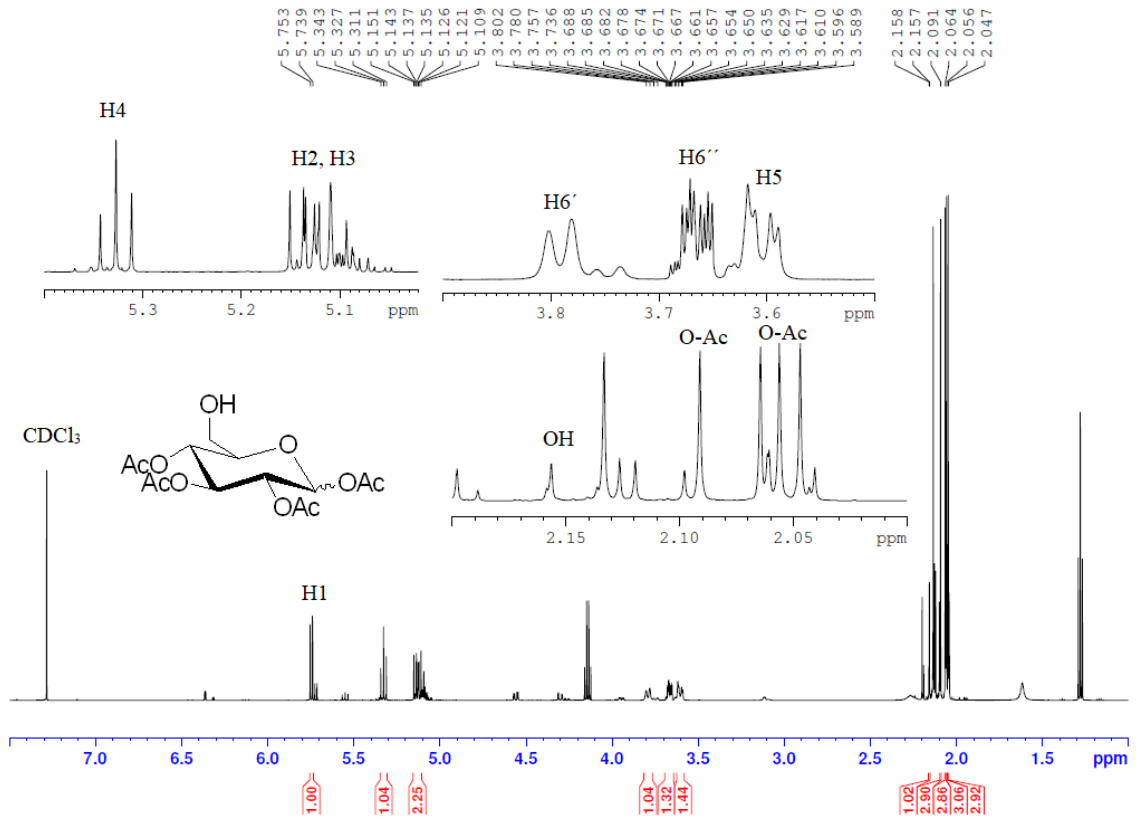
21. H, Y. *et al.* The structure of metallo-DNA with consecutive thymine-HgII-thymine base pairs explains positive entropy for the metallo base pair formation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4094–4099 (2014).
22. J, K. *et al.* Crystal structure of metallo DNA duplex containing consecutive Watson-Crick-like T-Hg(II)-T base pairs. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 2385–2388 (2014).
23. Dairaku, T. *et al.* Structure Determination of an AgI-Mediated Cytosine–Cytosine Base Pair within DNA Duplex in Solution with ¹H/¹⁵N/¹⁰⁹Ag NMR Spectroscopy. *Chem. – A Eur. J.* **22**, 13028–13031 (2016).
24. Menzer, S., Sabat, M. & Lippert, B. Ag(I) Modified Base Pairs Involving Complementary (G, C) and Noncomplementary (A, C) Nucleobases. On the Possible Structural Role of Aqua Ligands in Metal-Modified Nucleobase Pairs. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4644–4649 (1992).
25. Atwell, S., Meggers, E., Spraggon, G. & Schultz, P. G. Structure of a Copper-Mediated Base Pair in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12364–12367 (2001).
26. Johannsen, S., Megger, N., Böhme, D., Sigel, R. K. O. & Müller, J. Solution structure of a DNA double helix with consecutive metal-mediated base pairs. *Nat. Chem.* **2**, 229–234 (2010).
27. Hensel, S., Megger, N., Schweizer, K. & Müller, J. Second generation silver(I)-mediated imidazole base pairs. *Beilstein J. Org. Chem.* **10**, 2139–2144 (2014).
28. Schweizer, K., Kösters, J. & Müller, J. 4-(2'-Pyridyl)imidazole as an artificial nucleobase in highly stabilizing Ag(I)-mediated base pairs. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**, 895–903 (2015).
29. Sandmann, N., Defayay, D., Hepp, A. & Müller, J. Metal-mediated base pairing in DNA involving the artificial nucleobase imidazole-4-carboxylate. *J. Inorg. Biochem.* **191**, 85–93 (2019).
30. Kondo, J., Sugawara, T., Saneyoshi, H. & Ono, A. Crystal structure of a DNA duplex containing four Ag(I) ions in consecutive dinuclear Ag(I)-mediated base pairs: 4-thiothymine–2Ag(I)–4-thiothymine. *Chem. Commun.* **53**, 11747–11750 (2017).
31. Fujii, A. *et al.* 1,3,9-Triaza-2-oxophenoxazine: An Artificial Nucleobase Forms

- Highly Stable Self-Base Pairs with Three Ag(I) Ions in a Duplex. *Chem. – A Eur. J.* **25**, 7443–7448 (2019).
32. Bebout, D. C. Mercury: Inorganic & Coordination Chemistry. *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.* (2011). doi:10.1002/9781119951438.eibc0124
33. Wang, X., Andrews, L., Riedel, S. & Kaupp, M. Mercury Is a Transition Metal: The First Experimental Evidence for HgF₄. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 8371–8375 (2007).
34. Ukale, D., Shinde, V. S. & Lönnberg, T. 5-Mercuricytosine: An Organometallic Janus Nucleobase. *Chem. - A Eur. J.* **22**, 7917–7923 (2016).
35. Takezawa, Y., Nishiyama, K., Mashima, T., Katahira, M. & Shionoya, M. Bifacial Base-Pairing Behaviors of 5-Hydroxyuracil DNA Bases through Hydrogen Bonding and Metal Coordination. *Chem. – A Eur. J.* **21**, 14713–14716 (2015).
36. Gorska, K. & Winssinger, N. Reactions Templated by Nucleic Acids: More Ways to Translate Oligonucleotide-Based Instructions into Emerging Function. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 6820–6843 (2013).
37. Madsen, M. & Gothelf, K. V. Chemistries for DNA Nanotechnology. *Chem. Rev.* **119**, 6384–6458 (2019).
38. Rossetti, M., Bertucci, A., Patiño, T., Baranda, L. & Porchetta, A. Programming DNA-Based Systems through Effective Molarity Enforced by Biomolecular Confinement. *Chem. – A Eur. J.* **26**, 9826–9834 (2020).
39. Gartner, Z. J. & Liu, D. R. The generality of DNA-templated synthesis as a basis for evolving non-natural small molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6961–6963 (2001).
40. Castro, V., Rodríguez, H. & Albericio, F. CuAAC: An Efficient Click Chemistry Reaction on Solid Phase. *ACS Comb. Sci.* **18**, 1–14 (2016).
41. Chouikhi, D., Barluenga, S. & Winssinger, N. Clickable peptide nucleic acids (cPNA) with tunable affinity. *Chem. Commun.* **46**, 5476–5478 (2010).
42. Shelbourne, M., Chen, X., Brown, T. & El-Sagheer, A. H. Fast copper-free click DNA ligation by the ring-strain promoted alkyne-azide cycloaddition reaction. *Chem. Commun.* **47**, 6257–6259 (2011).

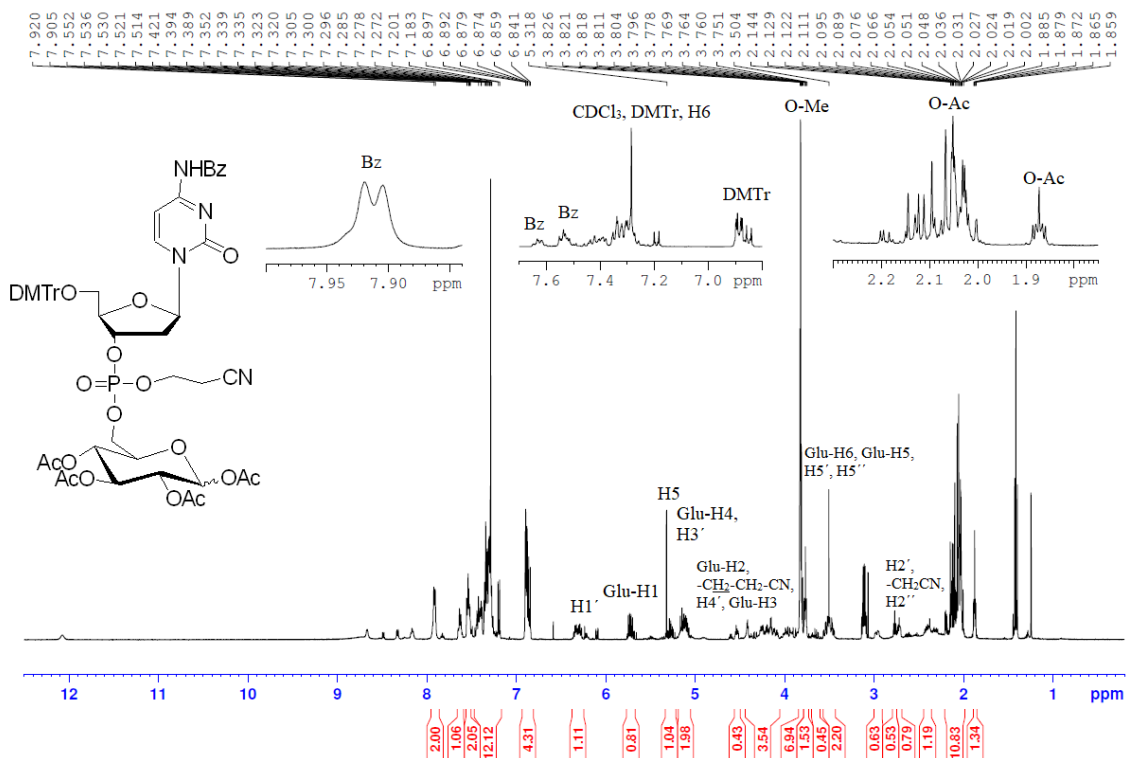
43. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004).
44. Huang, Y. & Coull, J. M. Diamine catalyzed hemicyanine dye formation from nonfluorescent precursors through DNA programmed chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3238–3239 (2008).
45. Bartnik, M. & Facey, P. C. *Glycosides. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies* (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00008-1
46. Chatterjee, S., Moon, S., Hentschel, F., Gilmore, K. & Seeberger, P. H. An Empirical Understanding of the Glycosylation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 11942–11953 (2018).
47. Demchenko, A. V. *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*. (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008). doi:10.1002/9783527621644
48. Peri, F., Dumy, P. & Mutter, M. Chemo- and stereoselective glycosylation of hydroxylamino derivatives: A versatile approach to glycoconjugates. *Tetrahedron* **54**, 12269–12278 (1998).
49. Goff, R. D. & Thorson, J. S. Neoglycosylation and neoglycorandomization: Enabling tools for the discovery of novel glycosylated bioactive probes and early stage leads. *Medchemcomm* **5**, 1036–1047 (2014).
50. Lee, M. R. & Shin, I. Facile preparation of carbohydrate microarrays by site-specific, covalent immobilization of unmodified carbohydrates on hydrazide-coated glass slides. *Org. Lett.* **7**, 4269–4272 (2005).
51. Langenhan, J. M. *et al.* Modifying the glycosidic linkage in digitoxin analogs provides selective cytotoxins. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 670–673 (2008).
52. Langenhan, J. M., Peters, N. R., Guzei, I. A., Hoffmann, F. M. & Thorson, J. S. Enhancing the anticancer properties of cardiac glycosides by neoglycorandomization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12305–12310 (2005).

Liitteet

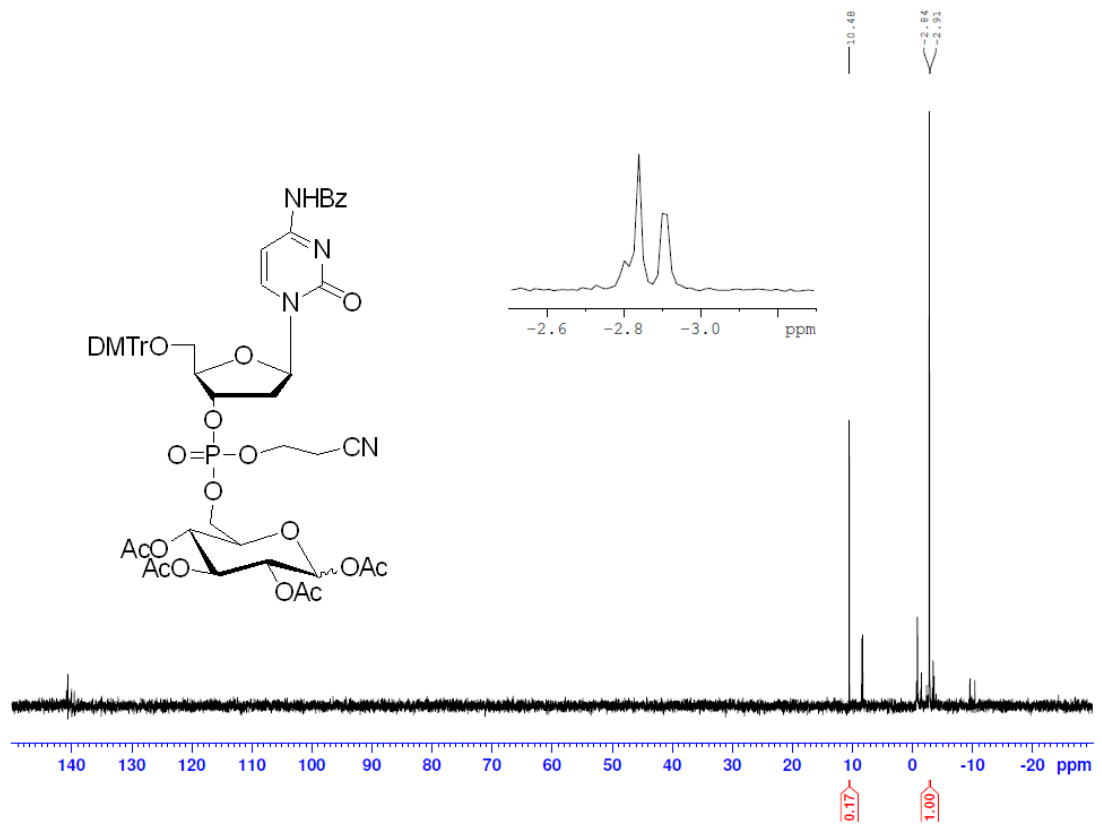
Liite 1. D-glukoosi-1,2,3,4-tetra-asetaatin (**11**) $^1\text{H-NMR}$ -spektri.



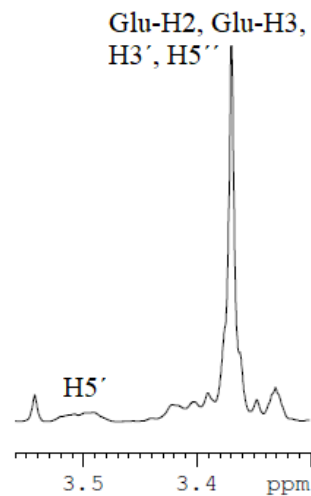
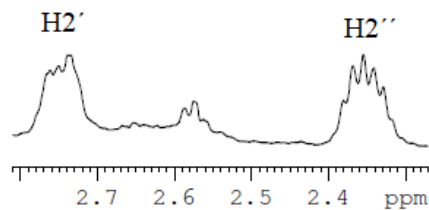
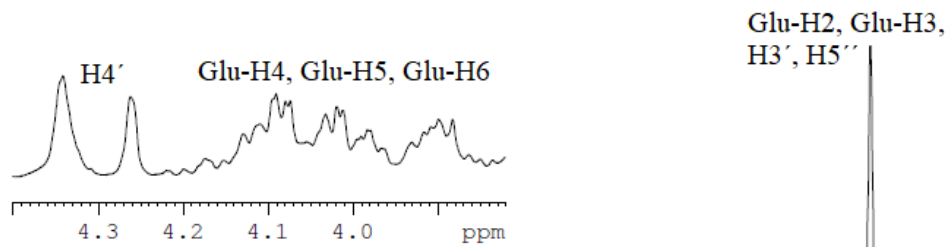
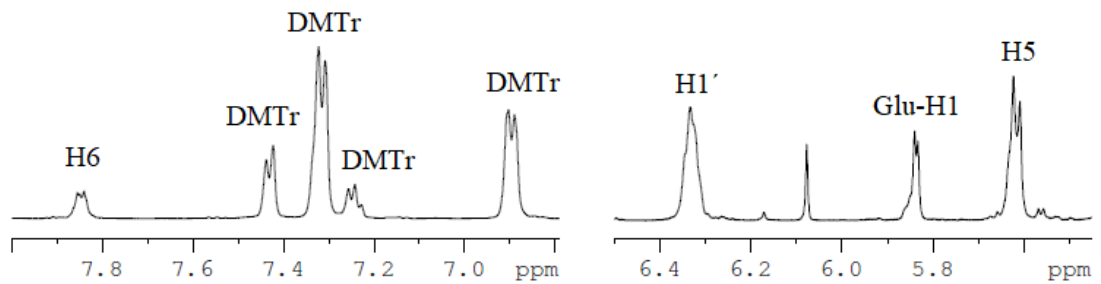
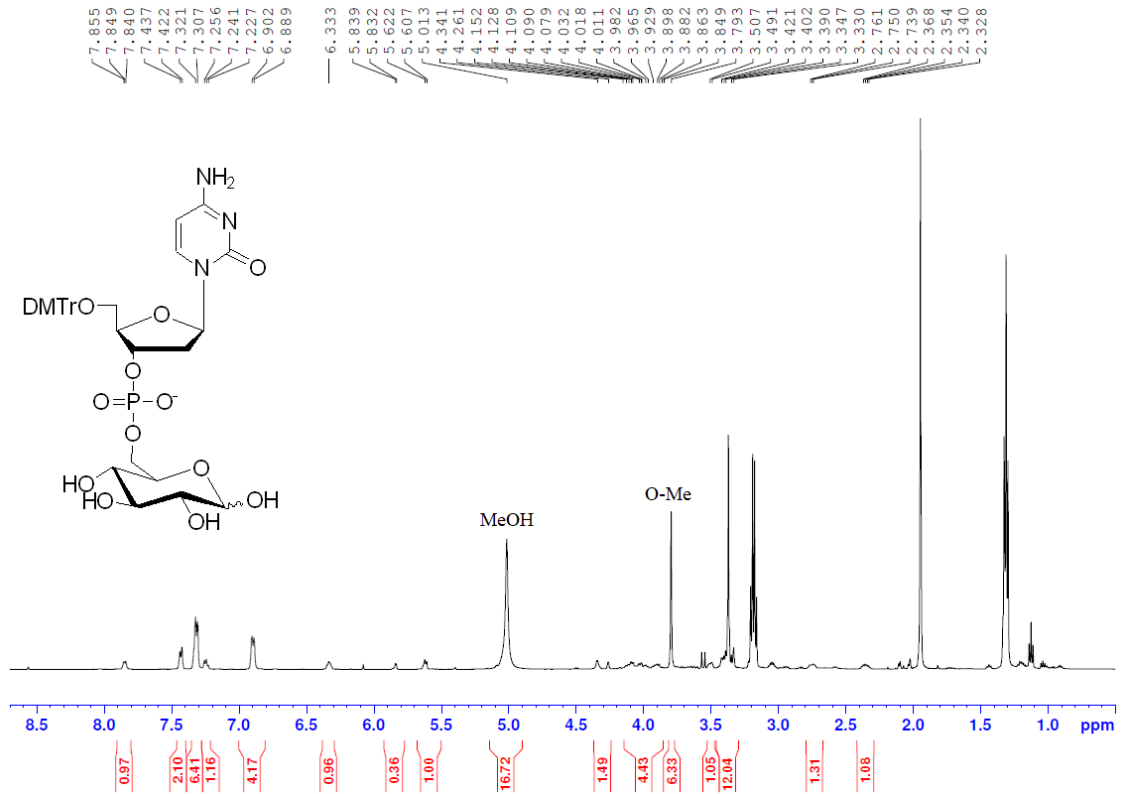
Liite 2. (1,2,3,4-Tetra-*O*-asetyylglukos-6-yyli)-(2-syanoetyyli)-[N^6 -bentsoyyli-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityli)-2'-deoksisytidin-3'-yyli]fosfaatin (**12**) $^1\text{H-NMR}$ -spektri.



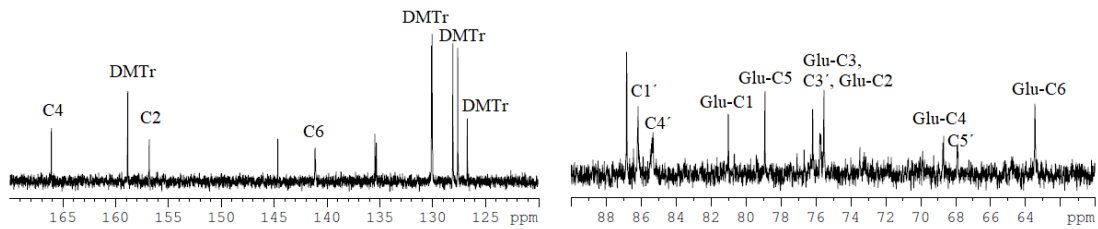
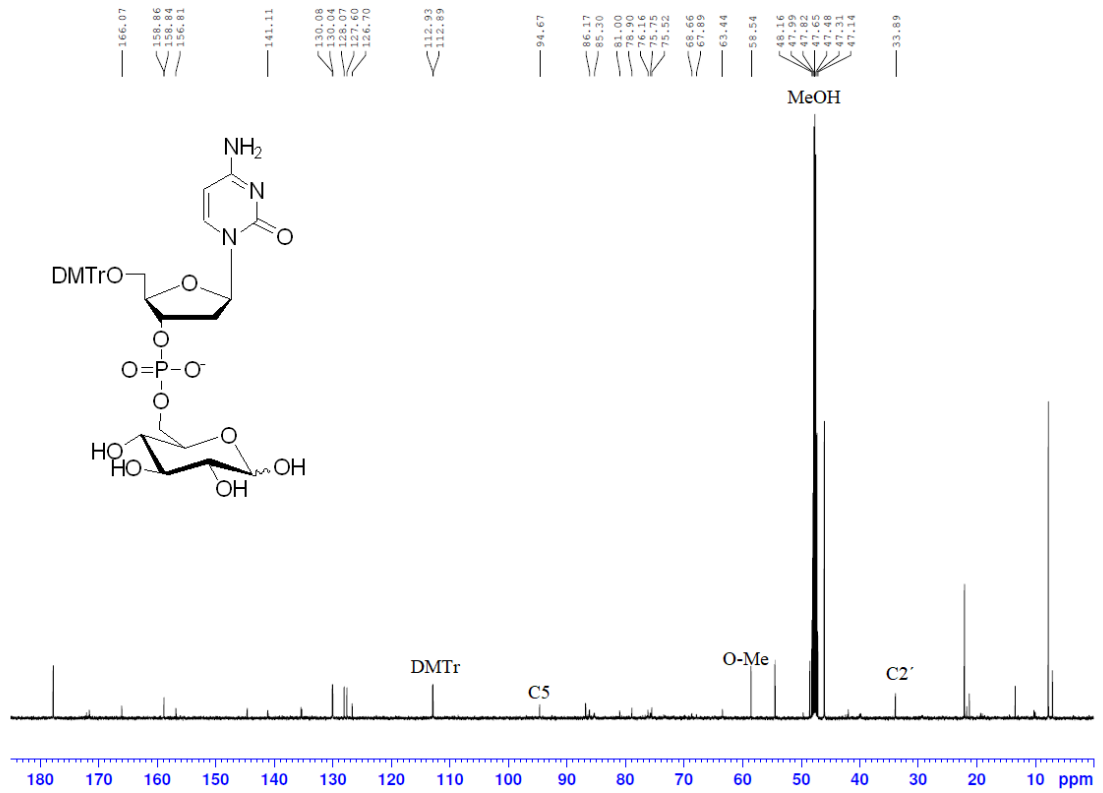
Liite 3. (1,2,3,4-Tetra-*O*-asetyyli-glukos-6-yyli)-(2-syanoetyyli)-[*N*⁶-bentsoyyli-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityli)-2'-deoksisytidin-3'-yyli]fosfaatin (**12**) ³¹P-NMR-spektri.



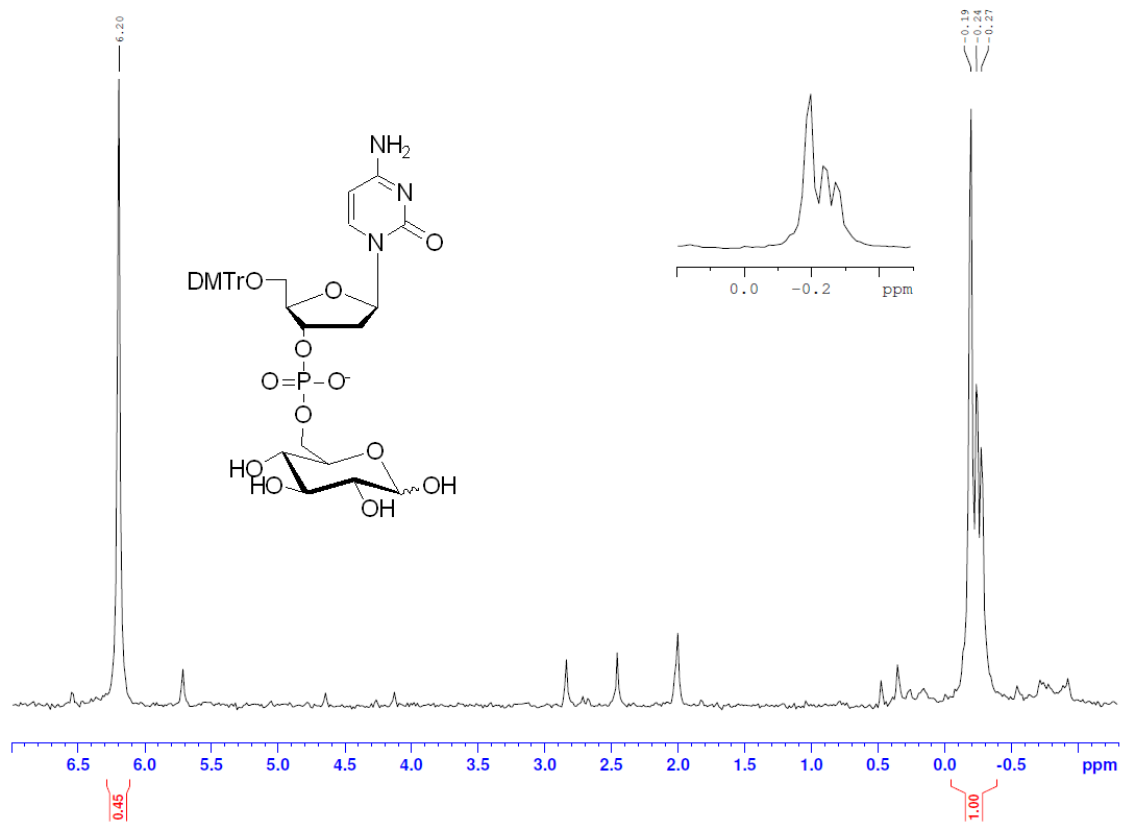
Liite 4. 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosin (**13**) ¹H-NMR-spektri.



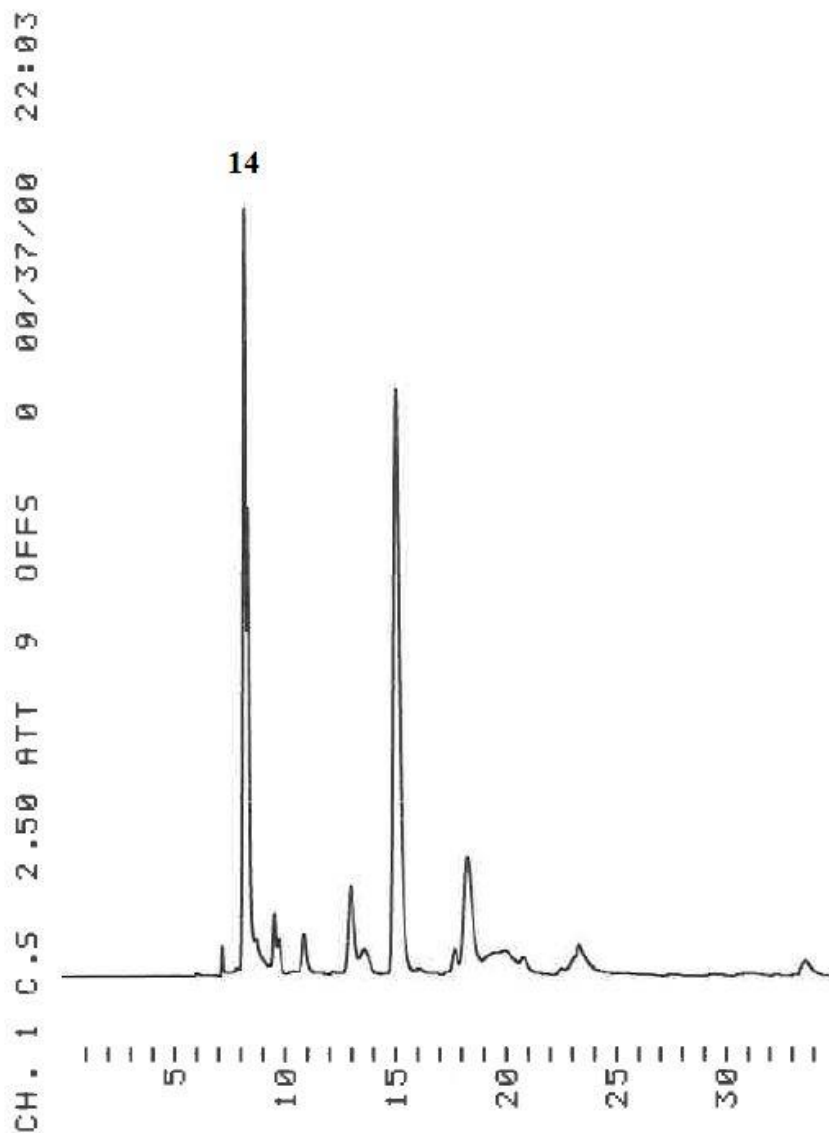
Liite 5. 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosin (**13**) ^{13}C -NMR-spektri.



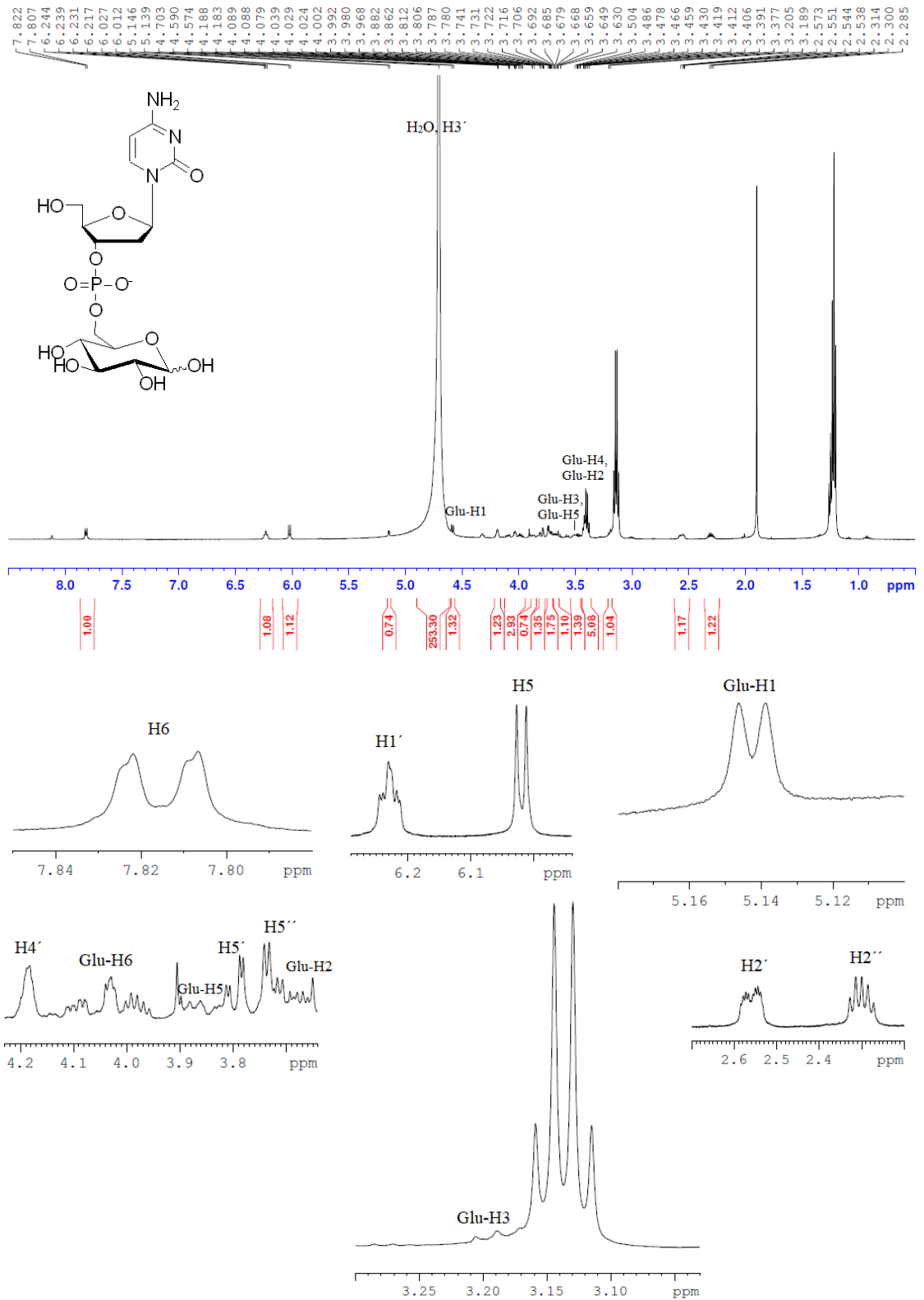
Liite 6. 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosin (**13**) ^{31}P -NMR-spektri.



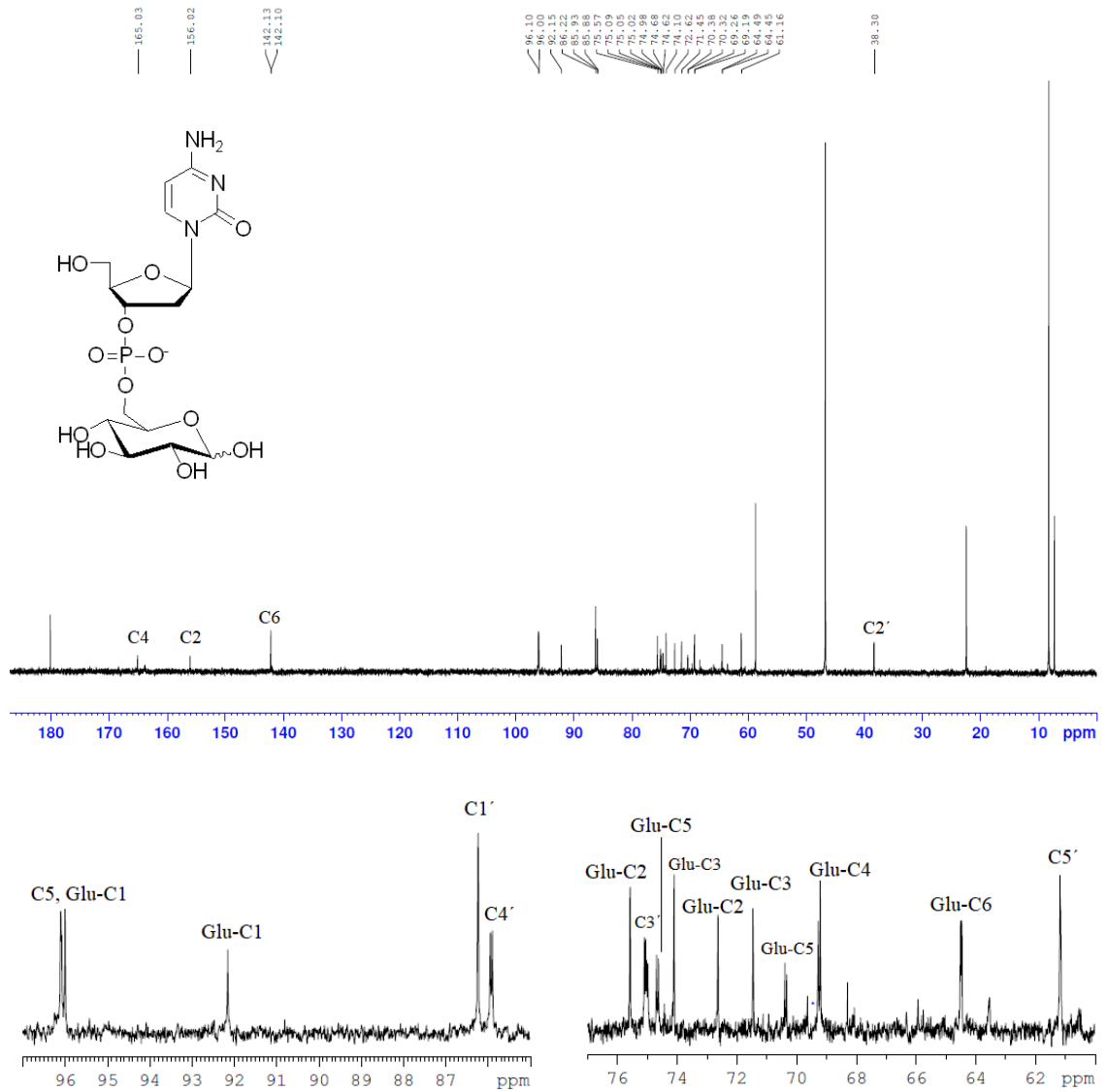
Liite 7. 2'-Deoksisytydilyyli-3',6'-glukoosin (**14**) puhdistuksen HPLC-kromatogrammi. Thermo scientific ODS HYPERSIL -kolonni (250 x 10 mm, 5 µm), isokraattinen eluointi: ACN/50 mM trietyyliammoniumasetaattipuskuri pH 7 (4:96, v/v), virtausnopeus 2,5 ml min⁻¹, detektointi UV-detektorilla 260 nm aallonpituudella.



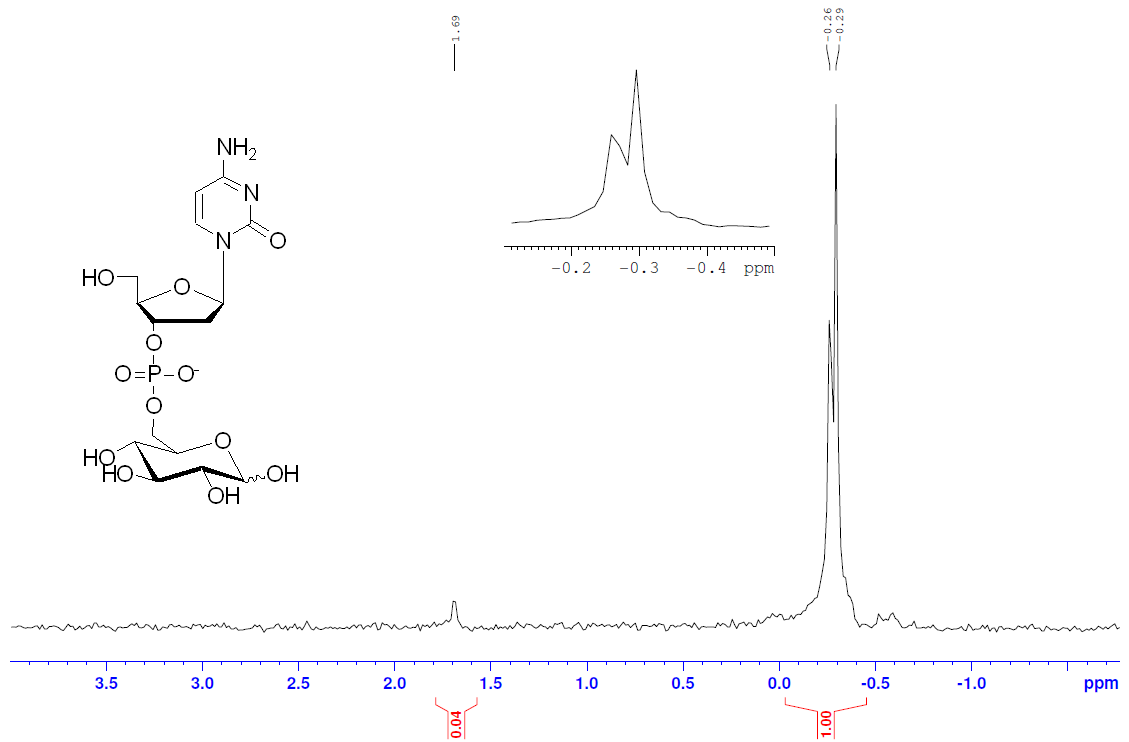
Liite 8. 2'-Deoksisytydylyyli-3',6-glukoosin (14) ¹H-NMR-spektri.



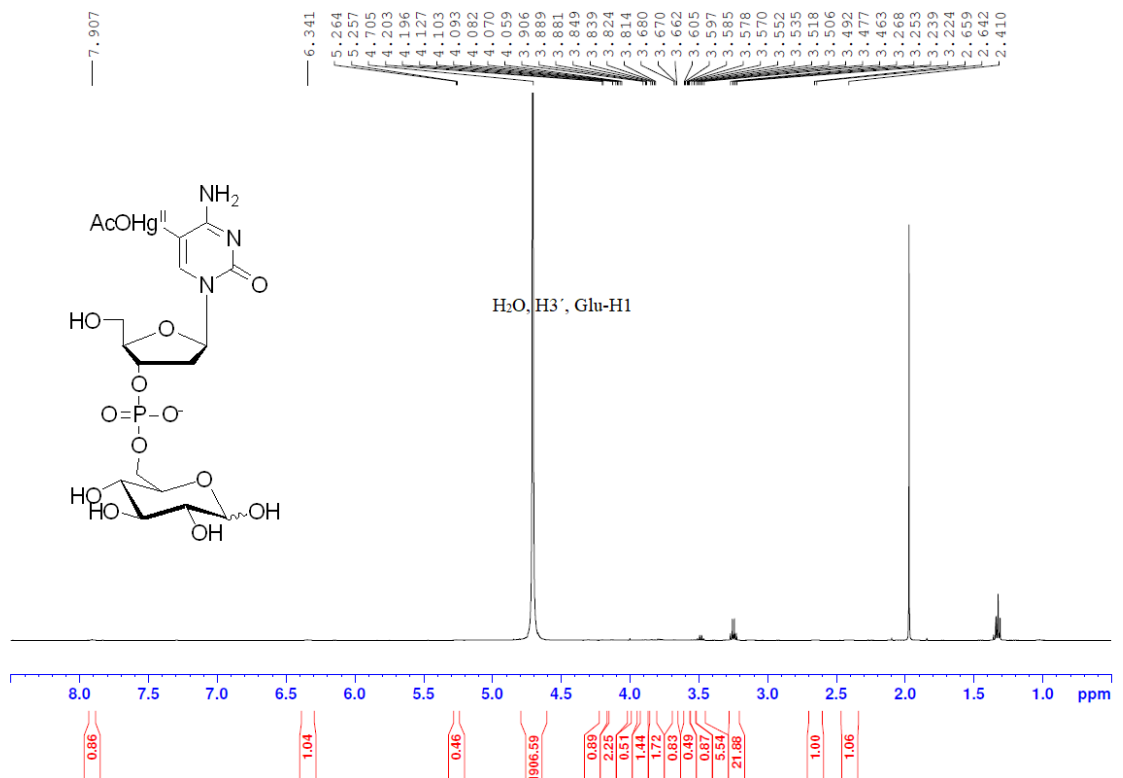
Liite 9. 2'-Deoksisytydylyyli-3',6-glukoosin (**14**) ^{13}C -NMR-spektri.

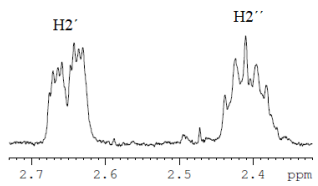
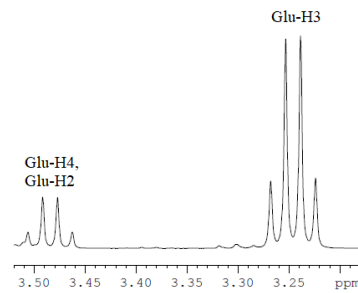
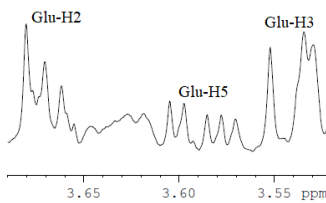
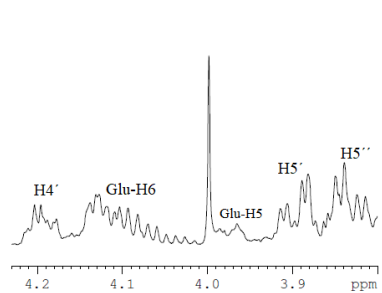
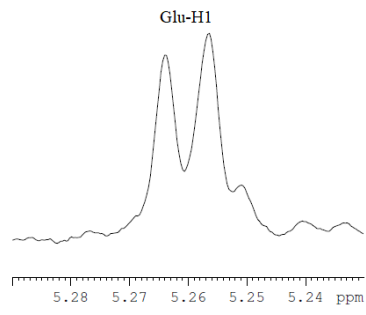
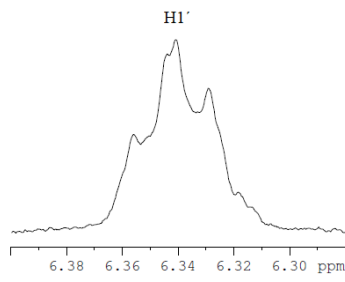
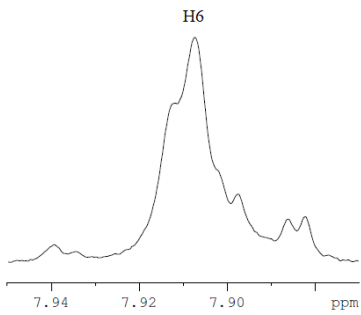


Liite 10. 2'-Deoksisytydylyyli-3',6-glukoosin (14) ^{31}P -NMR-spektri.

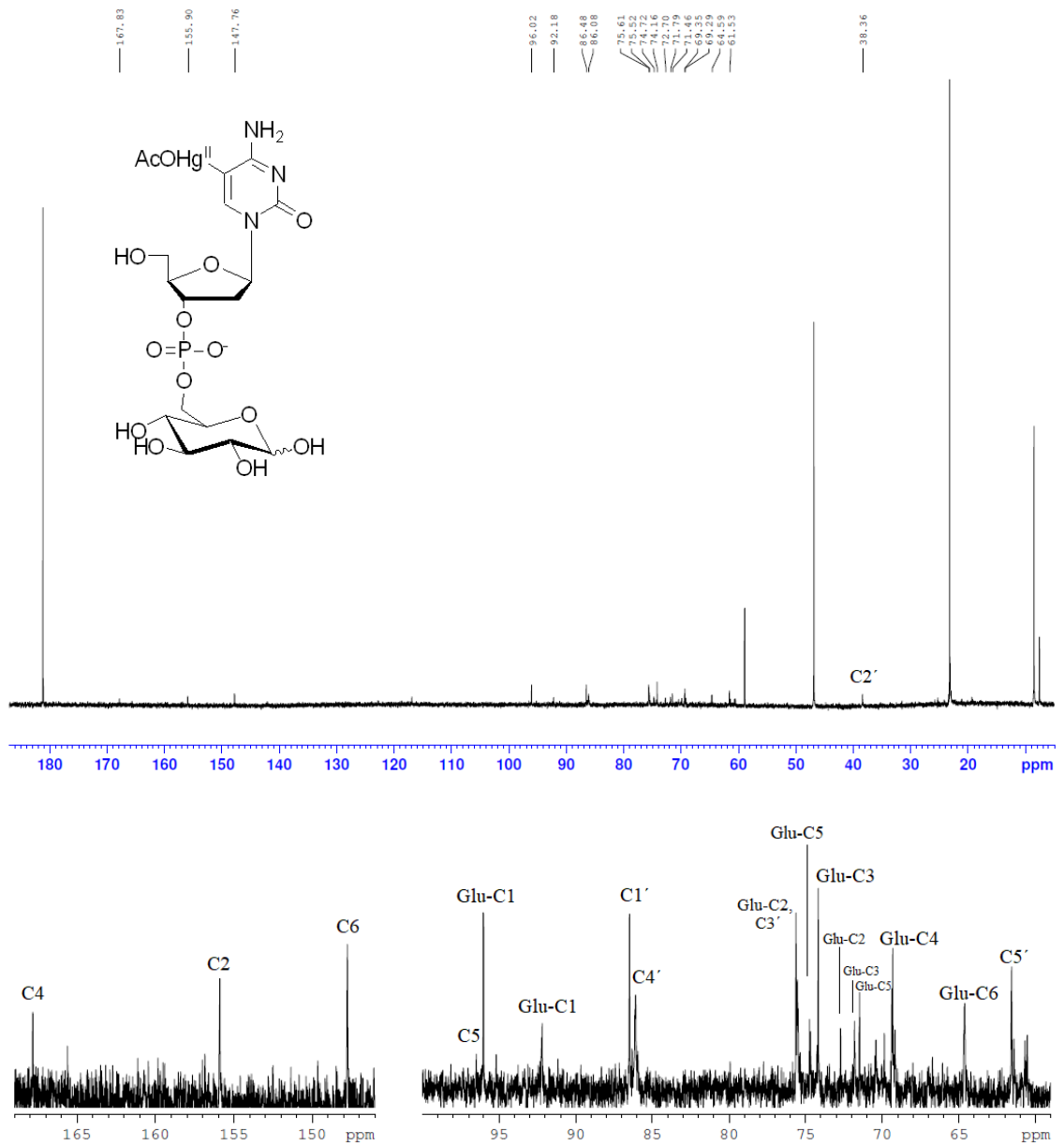


Liite 11. 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytydylyyli-3',6-glukoosin (15) ^1H -NMR-spektri.

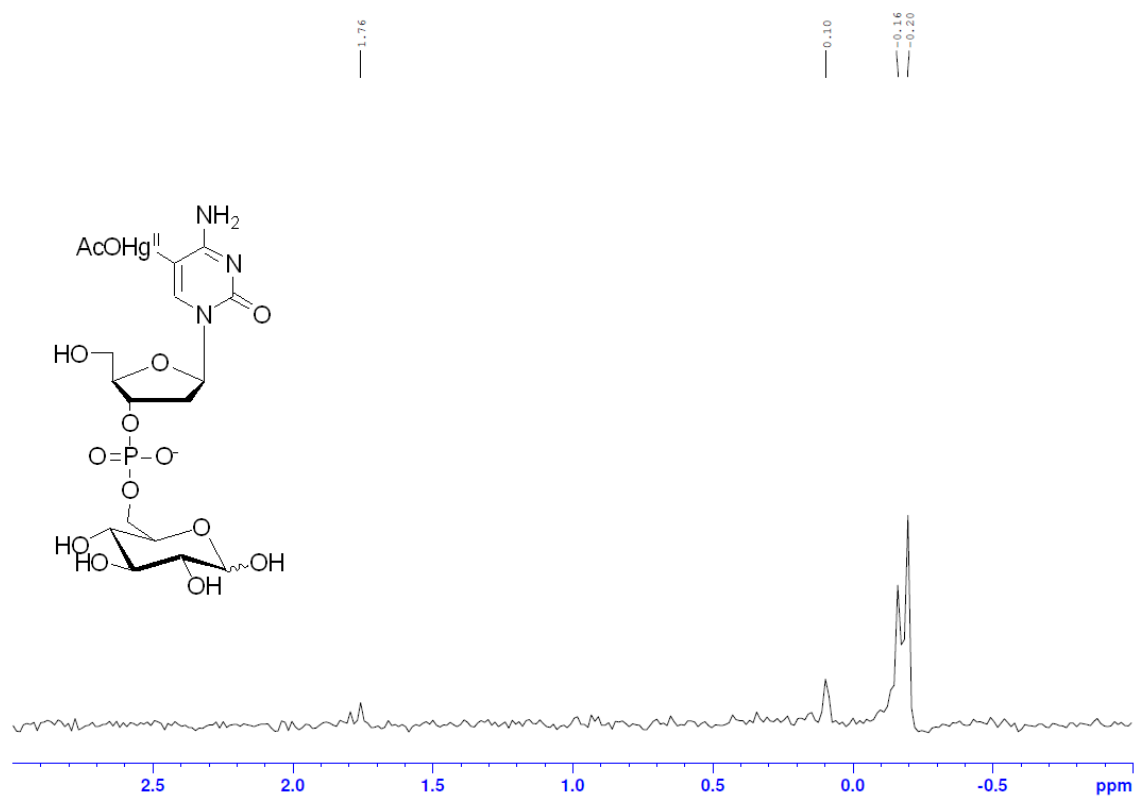




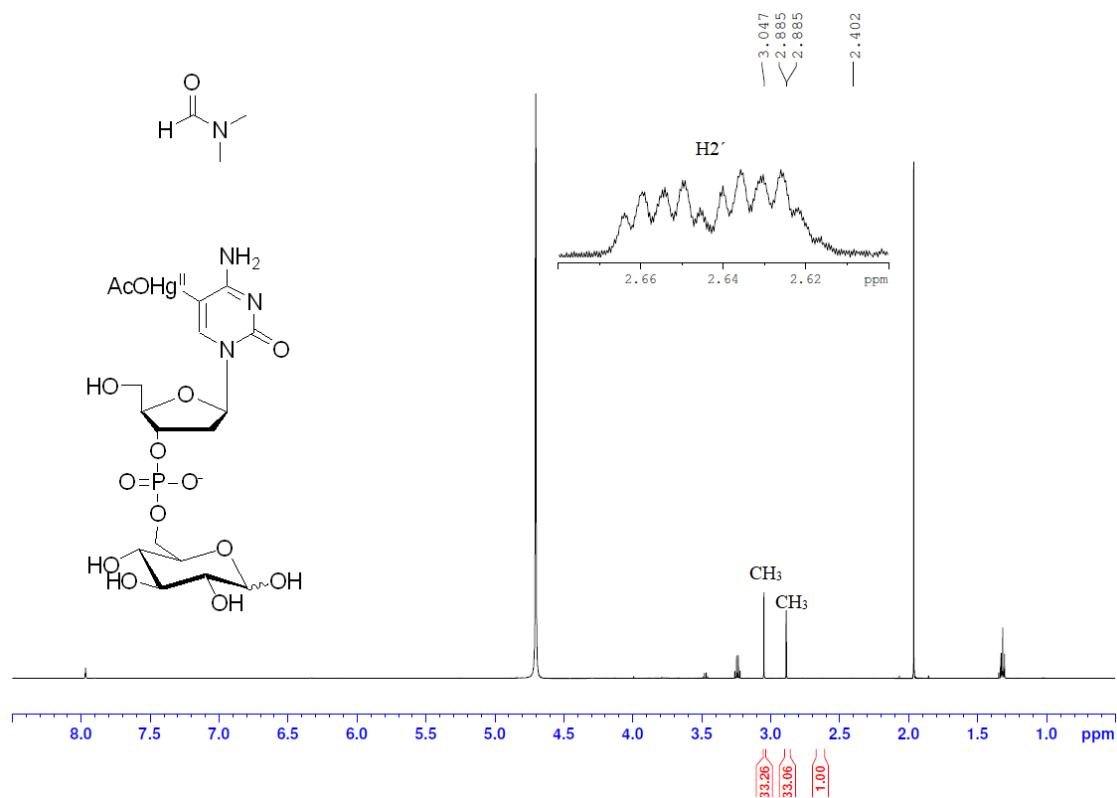
Liite 12. 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytydilyyli-3',6-glukoosin (**15**) ^{13}C -NMR-spektri.



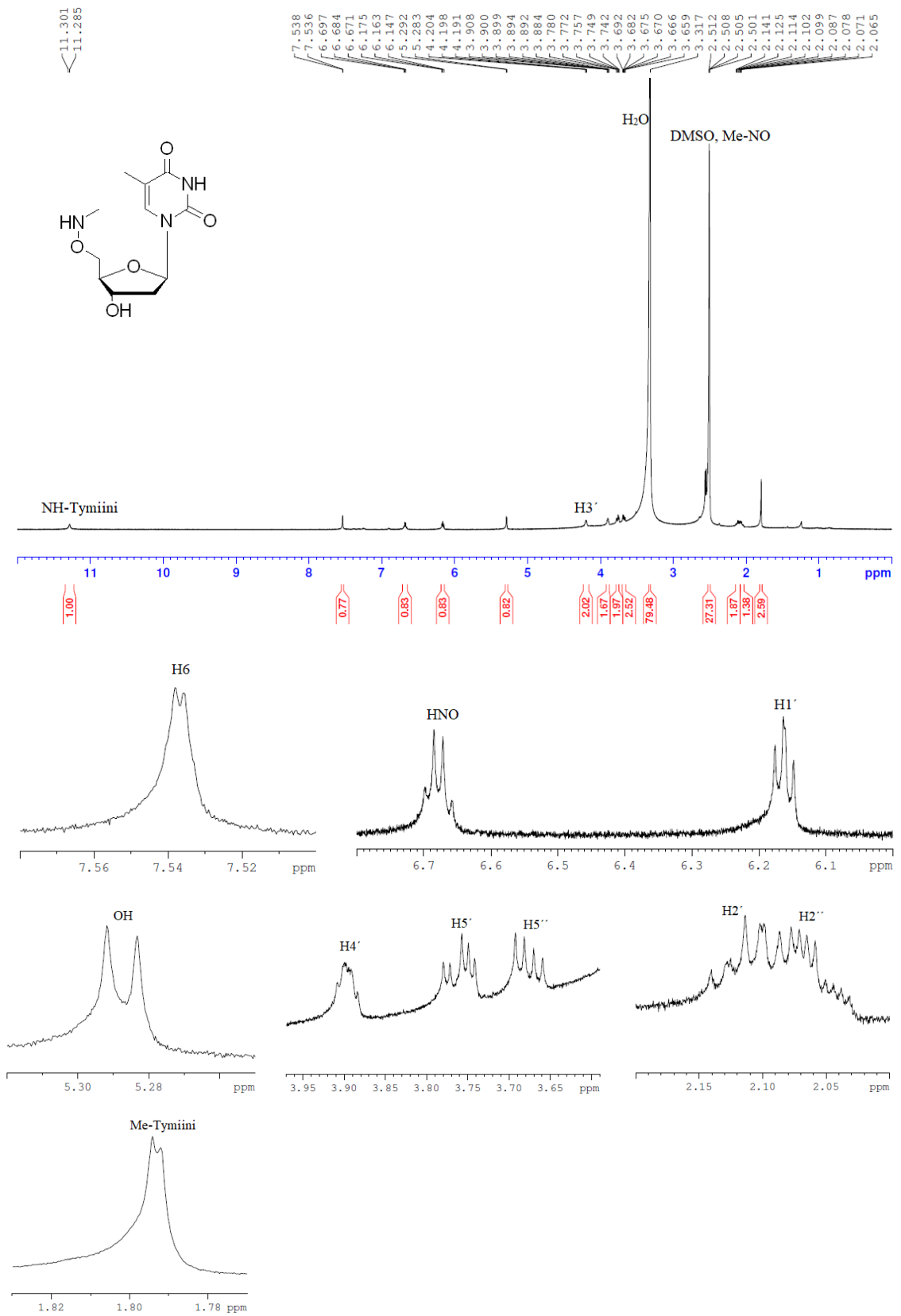
Liite 13. 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosin (**15**) ^{31}P -NMR-spektri.



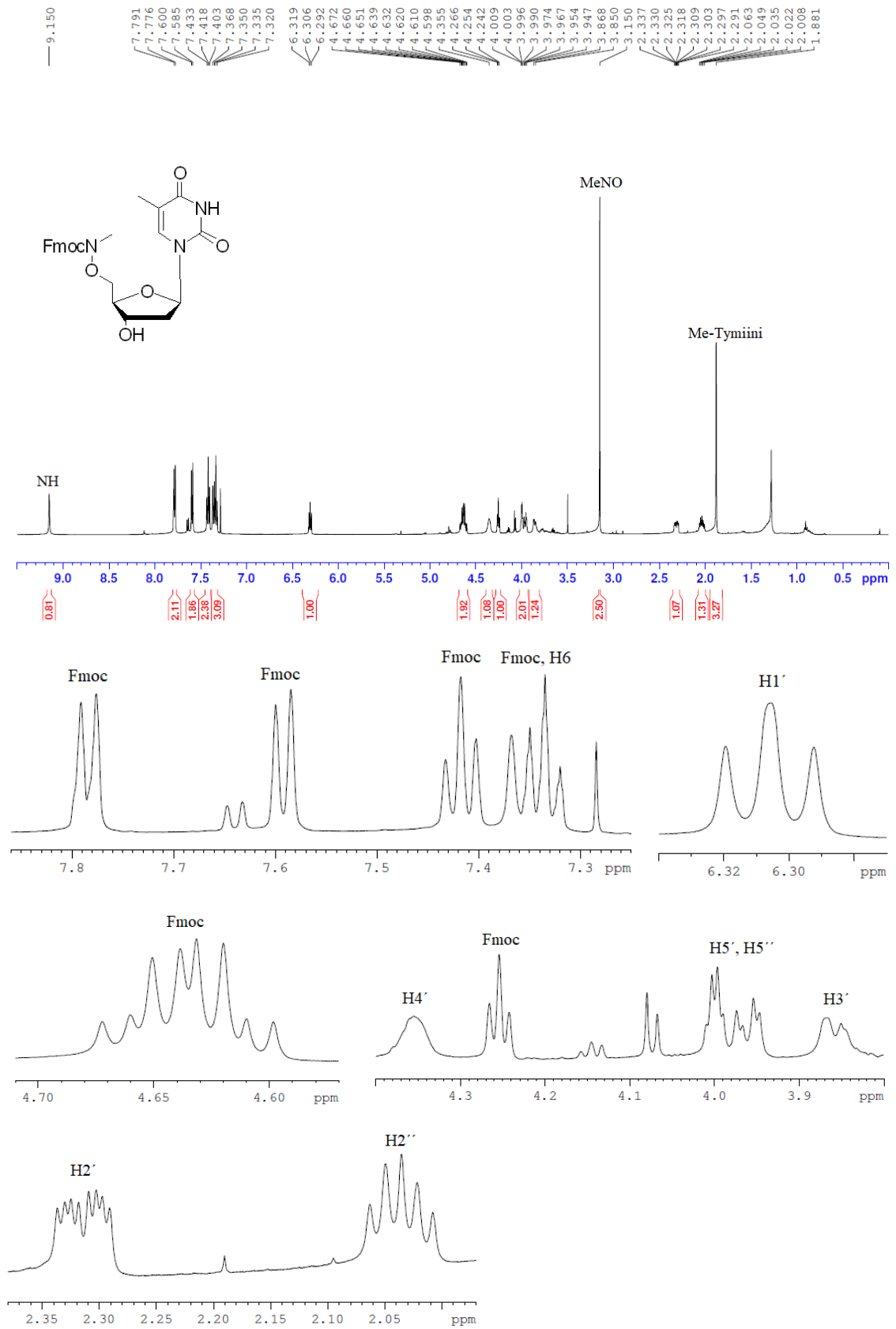
Liite 14. 5-Asetoksimerkuri-2'-deoksisytidylyyli-3',6-glukoosin (**15**) ainemäärän selvitys.



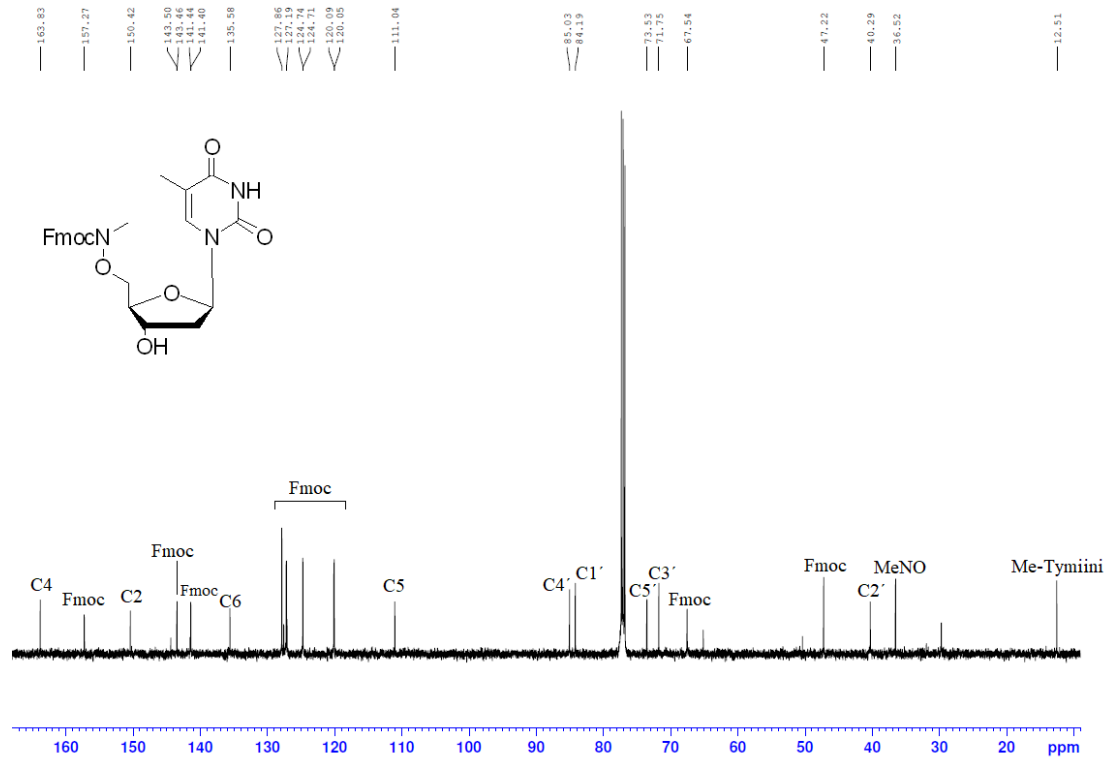
Liite 15. 5'-O-(Metyyliamino)tymidiinin (2) ¹H-NMR-spektri.



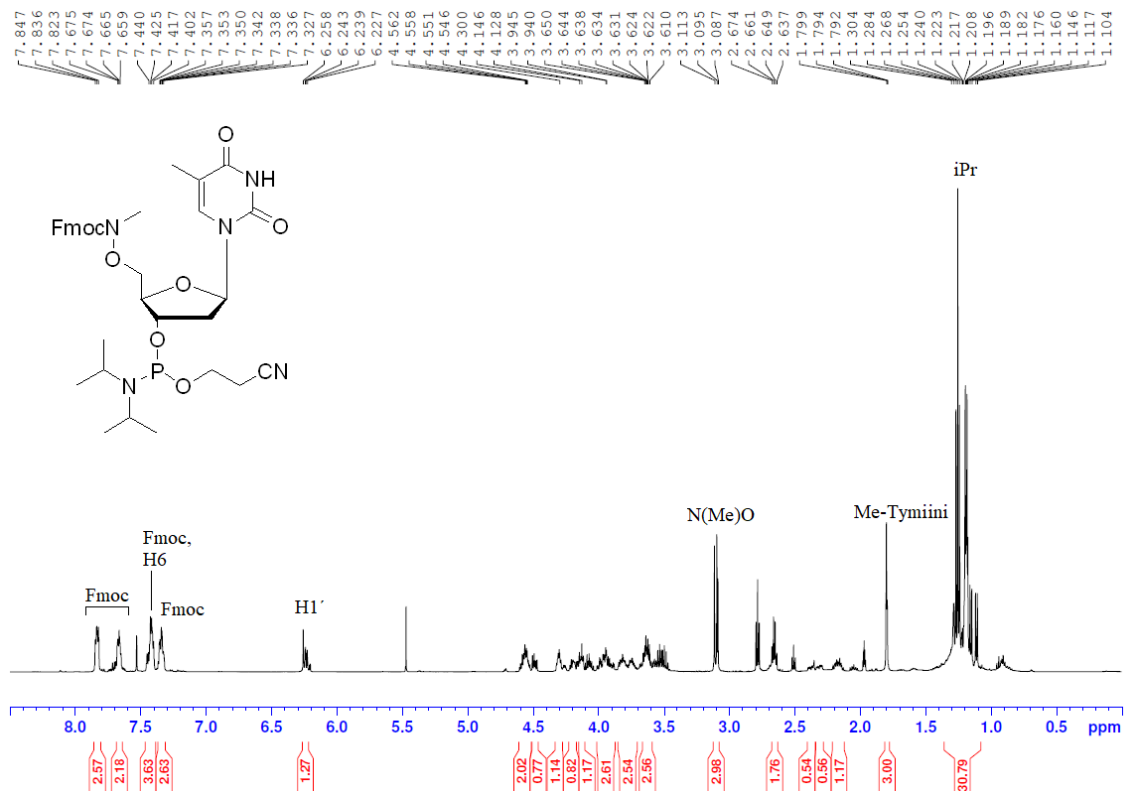
Liite 16. 5'-O-[N-(9-Fluorenyylimetoksykarbonyyli)metyyliamino]tymidiinin (16) ¹H-NMR-spektri.

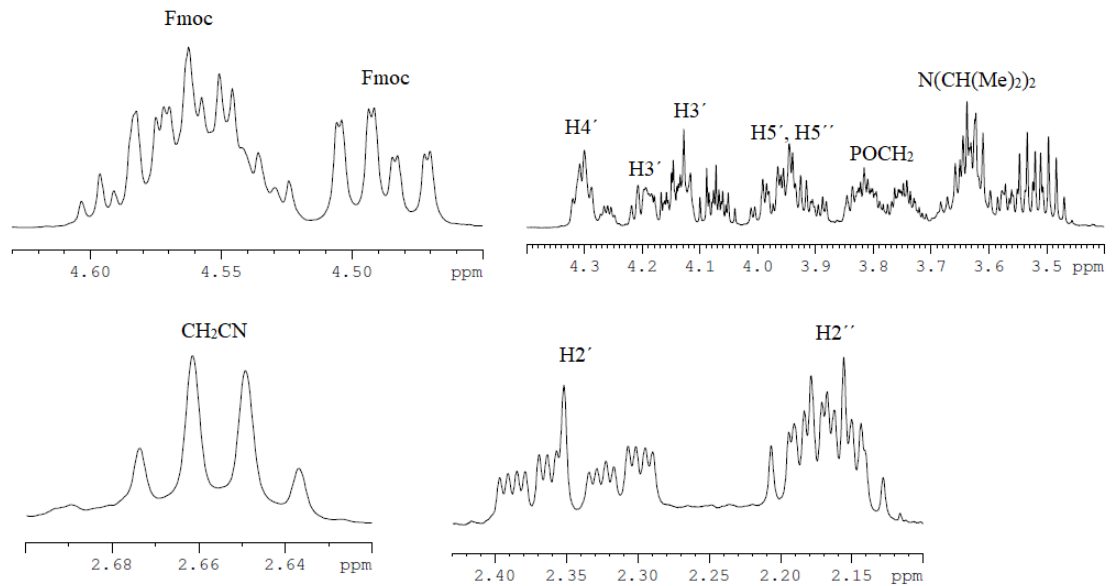


Liite 17. 5'-O-[N-(9-Fluorenyylimetoksykarbonyyli)metyyliamino]tymidiinin (**16**) ^{13}C -NMR-spektri.

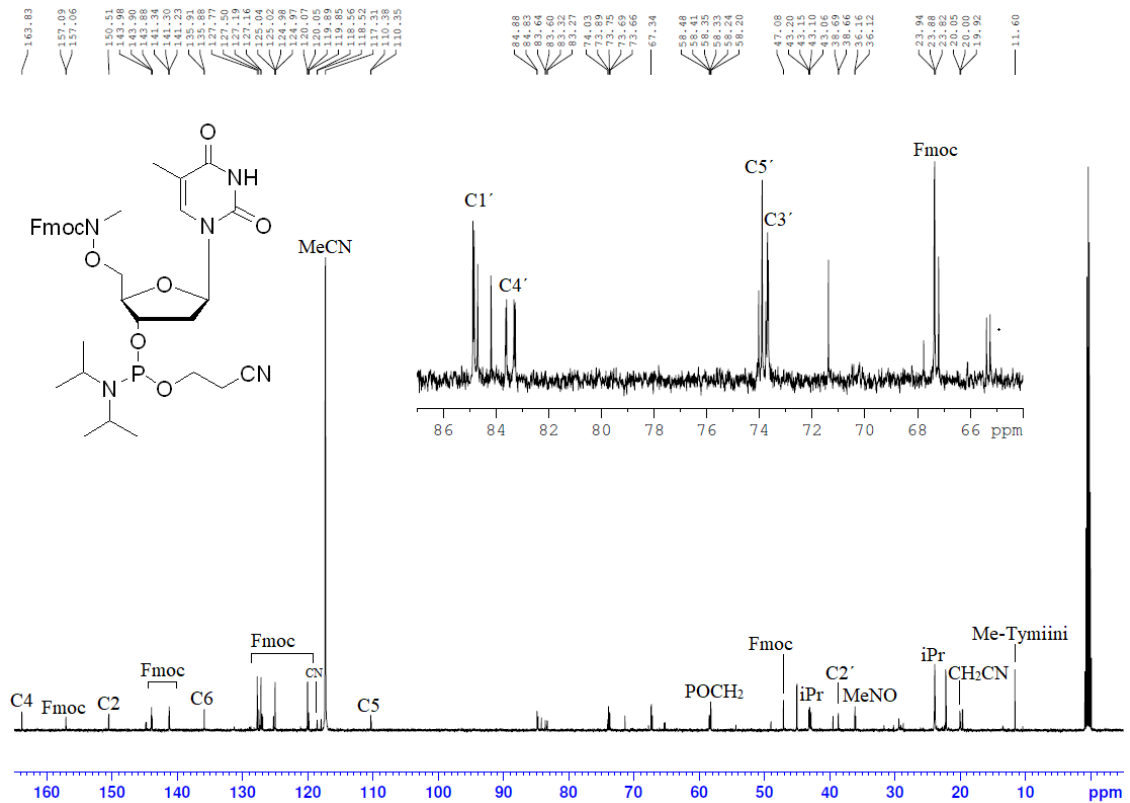


Liite 18. 3'-O-[(2-Syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyliamino)fosfinyyli]-5'-O-[N-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)metyyliamino]tymidiinin (**17**) ^1H -NMR-spektri.

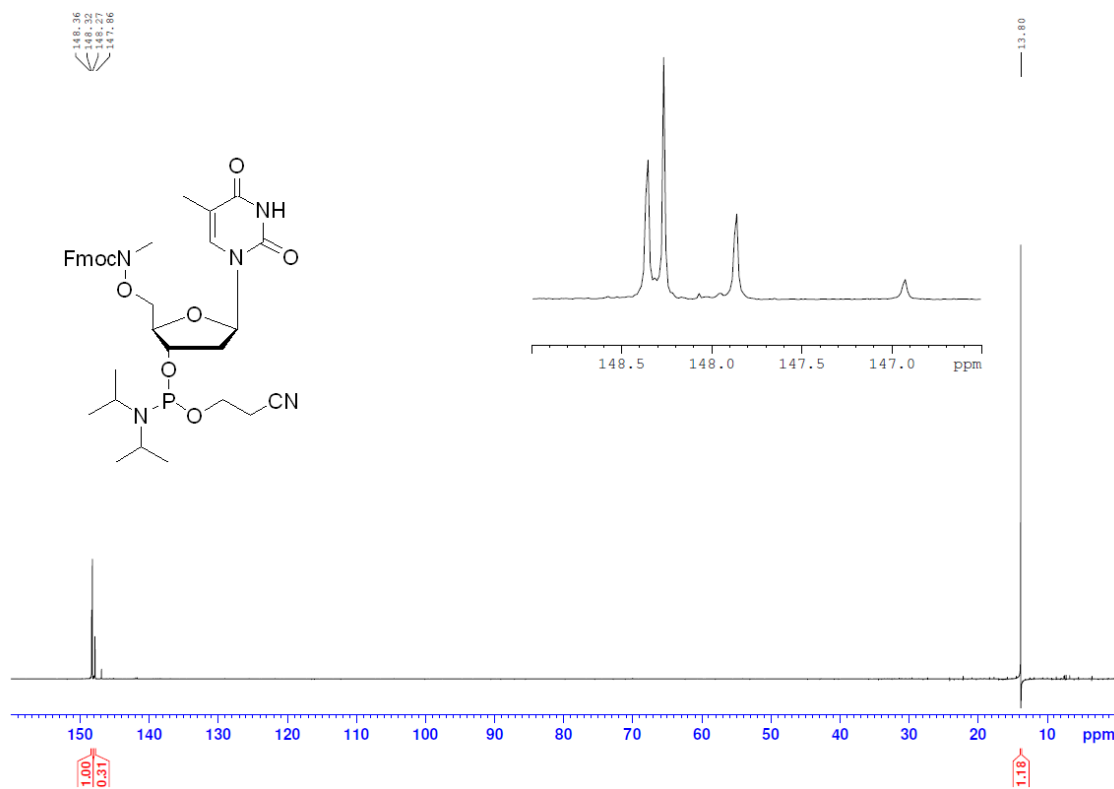




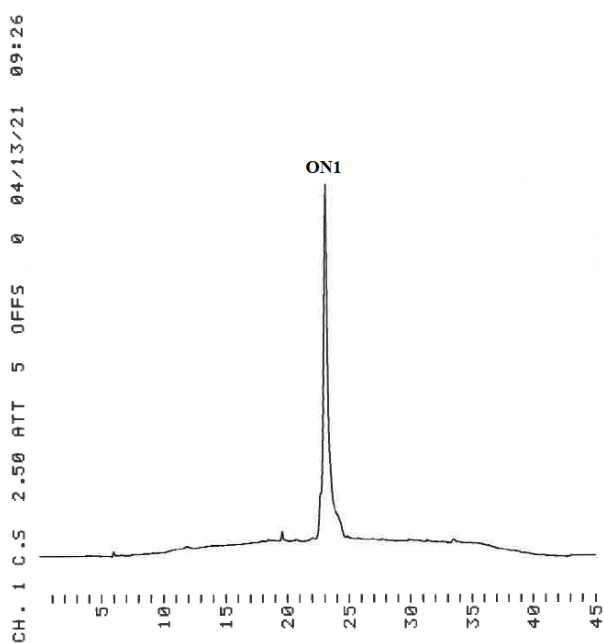
Liite 19. 3'-O-[(2-Syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyylimino)fosfinyyli]-5'-O-[N-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)metyylimino]tymidiinin (**17**) ^{13}C -NMR-spektri.



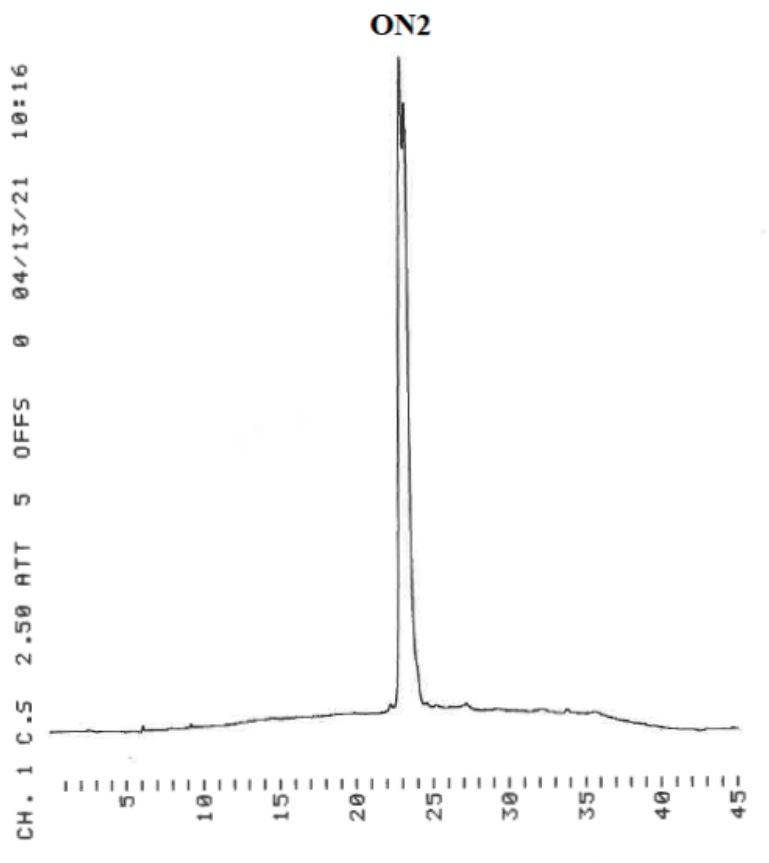
Liite 20. 3'-O-[(2-Syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyylamino)fosfinyyli]-5'-O-[N-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)metyyliamino]tymidiinin (**17**) ^{31}P -NMR-spektri.



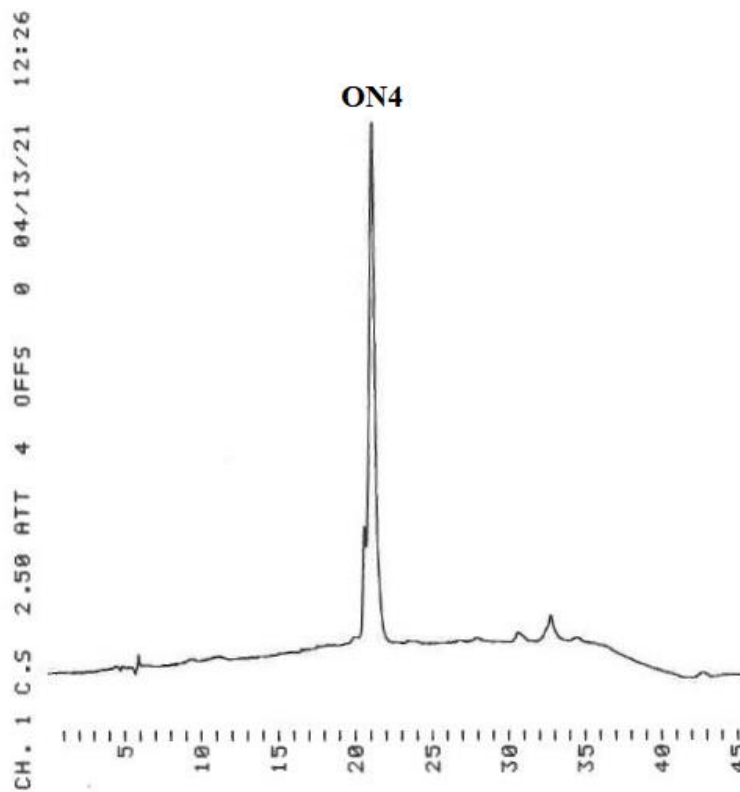
Liite 21. Puhdistetun **ON1** RP-HPLC-kromatogrammi. Clarity Oligo-RP -kolonni (250 x 10 mm, 5 μm), gradienttueluointi 20–50 % ACN 25 min, ajoliuksina 50 mM HAA-puskuri pH 7 ja 50 mM HAA-puskuri ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, 1:1, v/v) pH 7, virtausnopeus 3 ml min $^{-1}$, detektointi UV-detektorilla 260 nm aallonpituudella.



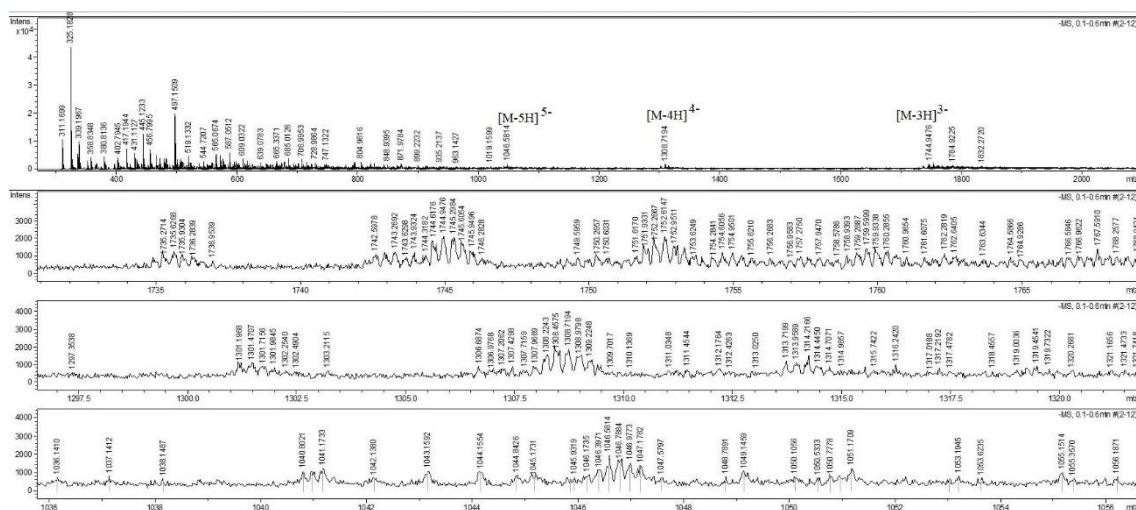
Liite 22. Puhdistetun ON2 RP-HPLC-kromatogrammi. Clarity Oligo-RP -kolonni (250 x 10 mm, 5 μ m), gradienttieuointi 20–50 % ACN 25 min, ajoliuoksina 50 mM HAA-puskuri pH 7 ja 50 mM HAA-puskuri (H₂O/ACN, 1:1, v/v) pH 7, virtausnopeus 3 ml min⁻¹, detektointi UV-detektorilla 260 nm aallonpituudella.



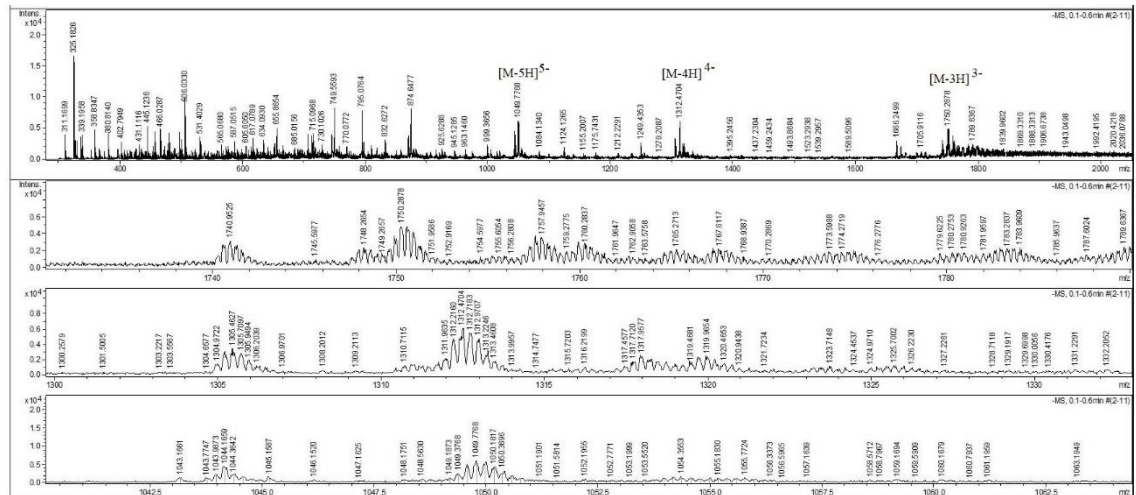
Liite 23. Puhdistetun ON4 RP-HPLC-kromatogrammi. Clarity Oligo-RP -kolonni (250 x 10 mm, 5 µm), gradientteliuointi 25–50 % ACN 25 min, ajoliuksina 50 mM HAA-puskuri pH 7 ja 50 mM HAA-puskuri (H₂O/ACN, 1:1, v/v) pH 7, virtausnopeus 3 ml min⁻¹, detektointi UV-detektorilla 260 nm aallonpituudella.



Liite 24. Oligonukleotidin ON1 massaspektri.



Liite 25. Oligonukleotidin ON2 massaspektri.



Liite 26. Oligonukleotidin ON4 massaspektri.

