

Kuparibipyridiinin ja -terpyridiinin katalysoima fosfodiesterisidoksen pilkkoutuminen: Nukleofiilin vaikutus reaktionopeuteen

Kemian laitos / Bio-organisen kemian tutkimusryhmä

Pro gradu -tutkielma

Laatija:

Anne Tulisalo

2.7.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Kemia

Tekijä: Anne Tulisalo

Otsikko: Kuparibipyridiinin ja -terpyridiinin katalysoima fosfodiesterisidoksen pilkkoutuminen: Nukleofiilin vaikutus reaktionopeuteen

Ohjaaja: Dosentti Satu Mikkola

Sivumäärä: 29 sivua

Päivämäärä: 2.7.2025

Tässä tutkielmassa käsitellään RNA:n ja DNA:n fosfoesterisidosten metallikatalyyttistä pilkkoutumista ja keinotekoisia nukleaaseja. RNA- ja DNA-malliyhdisteiden katalysoimattomia ja metallikatalyyttisiä reaktioita tutkittiin neutraaleissa olosuhteissa.

Fosfodiesterien hajoaminen eli transesterifikaatio voi nopeutua emäs- ja happokatalyyttisesti. Metallikatalyytit voivat lisäksi koordinoitua fosfaatin *non-bridging* happeen ja tehostaa siten fosfaatin elektrofiilisyyttä tai 2'-hydroksidiryhmään tehostaen sen nukleofiilisyyttä. Intermolekulaarisessa katalyysireaktiossa kompleksin metalli koordinoituu fosfaattiin, metallin hydroksiligandi toimii yleisenä emäskatalyyttinä tai nukleofiilinä ja vesiligandi puolestaan yleisenä happokatalyyttinä, joka protonoi lähtevän ryhmän.

Keinotekoisia nukleaaseja on kehitetty metalloentymien katalyysimenetelmien tutkimista varten sekä lääkkeiksi patogeenejä ja syöpää vastaan. On tutkittu monenlaisia metallikomplekseja, kuten makrosyklisiä sinkkiatsakruunuja, lantanidikomplekseja sekä bifunktionaalisia metallikomplekseja. Kuparibipyridiini (CuBiPy) ja -terpyridiini (CuTerPy) ovat suosittuja komplekseja fosfodiesterien transesterifikaation tutkimuksessa.

Tämän tutkimuksen aiheena oli nukleofiilin vaikutus fosfodiesterien metalli-ionikatalyyttisen hajoamisen nopeuteen. Tutkimukseen valittiin substraateiksi 2-hydroksipropyli-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti (HPNP), uridiini 3'-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti (UPNP) ja bis-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti (BPNP), joilla on reaktiivinen lähtevä ryhmä. Katalyyteiksi valittiin CuBiPy ja CuTerPy. Tutkimuksen tulosten perusteella katalyyttien paremmuus toisiinsa nähden sekä katalyyttiset mekanismit riippuvat substraatin ominaisuuksista ja olosuhteista. CuBiPy on parempi katalyytti, kun reaktioon osallistuva nukleofiili on intermolekulaarinen tai ei-nukleosidinen, kuten HPNP:n 2-OH. Katalyytit ovat yhtä tehokkaita, kun nukleofiili on parempi, kuten UPNP:n 2'-OH. Tulokset viittaavat myös siihen, että CuBiPy:n tehokkuutta heikentää sen dimeroituminen. Lisäksi liuoksen [OH⁻] vaikuttaa HPNP:n ja erityisesti BPNP:n reaktioon merkittävästi.

Avainsanat: RNA-malliyhdisteet, mekanismit, katalyysi, kuparikompleksit

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO	1
1.1	Keinotekoiset nukleasit	1
1.2	Katalysoimattomat fosfodiesterisidosten pilkkoutumisreaktiot	2
1.3	Olosuhteiden ja liuoksen vaikutus	5
1.4	Metalli-ionien ja -kompleksien katalysoimat reaktiot	7
1.4.1	Monofunktionaaliset metallikompleksit	9
1.4.2	Bifunktionaaliset metallikompleksit	11
1.4.3	Lantanidikompleksit	13
1.4.4	Lähtevän ryhmän ja metallikompleksin rakenteen vaikutus metallikatalyysiin	15
1.5	Kuparibipyridiini ja kupariterpyridiini fosfodiesterien pilkkoutumisen katalyytteinä	15
1.6	Työn tarkoitus	17
2	KOKEELLISET MENETELMÄT	17
2.1	Uridiini 3'-(<i>p</i> -nitrofenyyli)fosfaatin synteesi	17
2.1.1	Fosforylointi	18
2.1.2	Suojaryhmien poisto ja pH:n säätö	19
2.2	Kineettiset mittaukset	19
2.2.1	Reaktioliuosten valmistus	20
2.2.2	HPLC-mittaukset	20
2.2.3	Nopeusvakioiden laskeminen	21
3	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	21
3.1	2-hydroksipropyli-(<i>p</i> -nitrofenyyli)fosfaatin reaktion tulokset	21
3.2	Uridiini 3'-(<i>p</i> -nitrofenyyli)fosfaatin reaktion tulokset	24
3.3	Reaktioiden kertaluvut ja β_{LG} -arvot	26

3.4	Nukleofiilin vaikutus <i>p</i>-nitrofenyylifosfodiesterien katalyyttisiin reaktioihin	28
4	YHTEENVETO	29
	LÄHTEET	30
	LIITTEET	36
	Liite 1. Tuotteen 26 ESI-M	36
	Liite 2. Tuotteen 26 ¹H-NMR	36
	Liite 3. UPNP:n ESI-MS	37
	Liite 4. UPNP:n ³¹P-NMR	37
	Liite 5. Taulukot A1 ja A2, puskuriliuosten konsentraatiot	38
	Liite 6. Taulukot B1–B3, reaktioliuosten valmistus	39
	Liite 7. Reaktioiden log (k) vs. log (c) -kuvaajat	41

Lyhenneluettelo

ApA = adenyli-3'5'-adenosiinimonofosfaatti

BPNP = bis-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti

BDNPP = bis-2,4-dinitrofenyylifosfaatti

CuBiPy = kuparibipyridiini

CuTerPy = kupariterpyridiini

DMSO = dimetyylisulfoksidi

DNA = deoksiribonukleiinihappo

ESI-MS = sähkösumutus ionisaatio -massaspektrometri

HPLC = korkean erotuskyvyn nestekromatografia

HPNP = 2-hydroksipropyli-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti

MOBS = 4-morfoliinobutaani sulfonihappo

MALDI-TOF-MS = matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaika -massaspektrometri

MOPSO = 2-hydoksi-3-morfoliinopropaani sulfonihappo

NMR = ydinmagneettinen resonanssi

Poly U = polyuridylyylihappo

RNA = ribonukleiinihappo

UpEtCl₃ = uridiini (2,2,2-trikloroetyyli)fosfaatti

UpiPr = uridiini isopropylifosfaatti

UPNP = uridiini (*p*-nitrofenyyli)fosfaatti

UpU = uridylyyli-3',5'-uriidinimonofosfaatti

GpG = guanylyyli-3',5'-guaniinimonofosfaatti

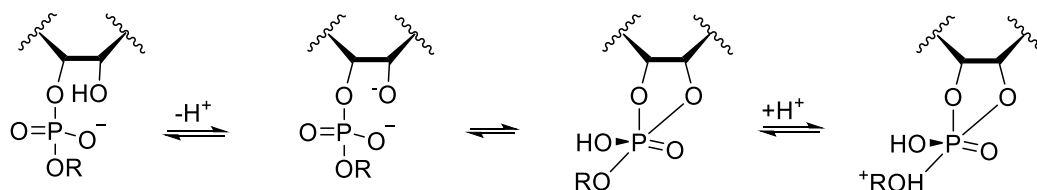
1 Johdanto

1.1 Keinotekoiset nukleasit

Taudinaiheuttajien eli patogeenien DNA- tai RNA-rakenteiden tuhoaminen sekä geeniterapia lääkehoitona ovat saaneet merkittävää huomiota jo pitkään.¹⁻⁴ Ensimmäisinä vuosina on tutkittu proteiinkatalyyttejä, myöhemmin ribotsyymikatalyyttejä ja viimeaikoina pääasiassa keinotekoisien nukleasien kehittämistä.¹ Keinotekoiset proteiin nukleasit ovat epäspesifisiä ja niillä on huono liukoisuus ja soluläpäiseväisyys, ja siksi proteiinien sijaan on pyritty kehittämään pienikokoisia metallikomplekseja oligonukleotidien pilkkoutumisen katalysoimiseen. Metallikompleksien tutkiminen keinotekoisina nukleaseina on ollut suosittua siitä lähtien, kun kupari-1,10-fenantroliiniin todettiin estävän bakteerien DNA-polymeraasien toiminnan.^{2,3}

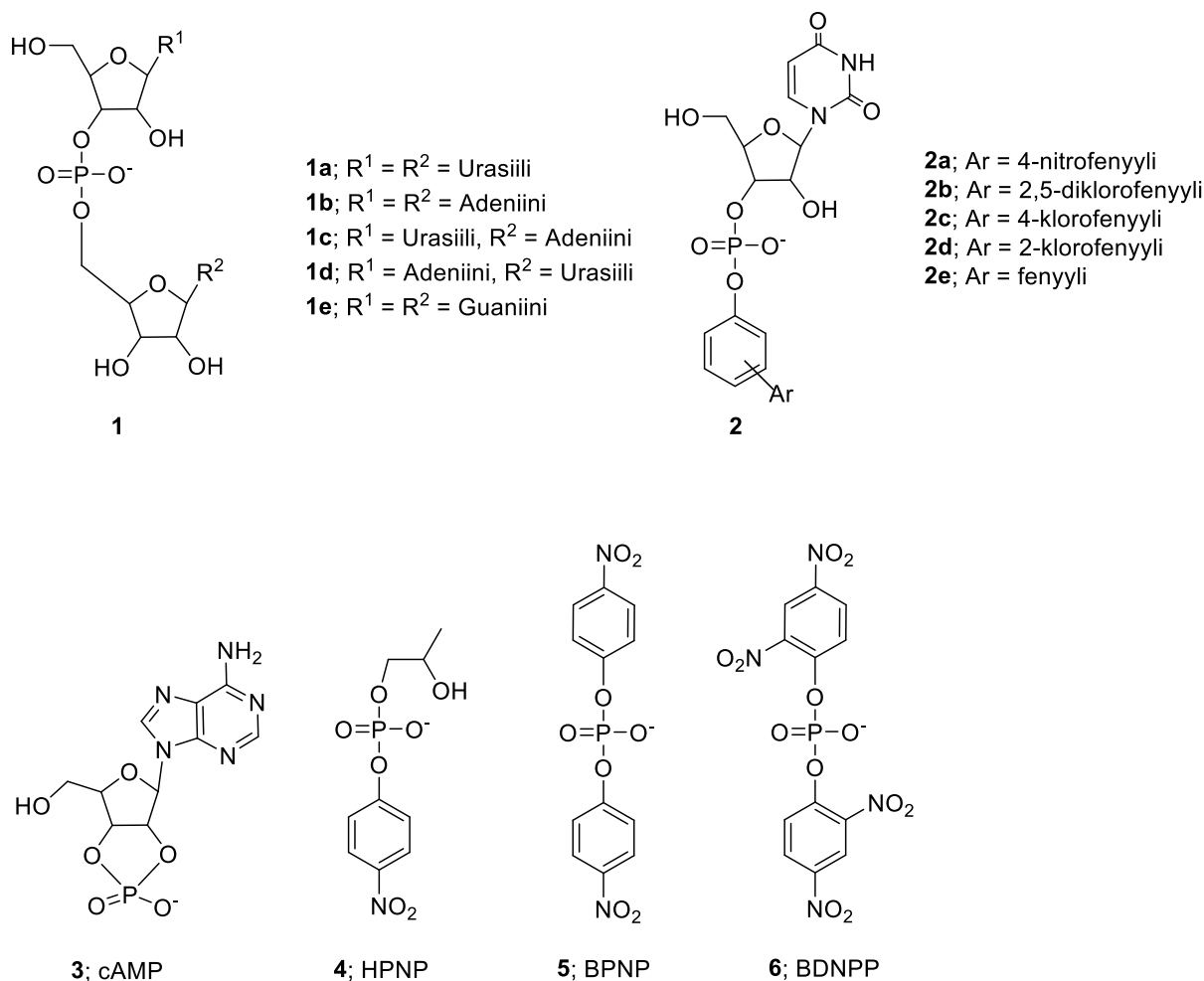
Metallikatalyytit voivat pilkkoa patogeenien nukleinihappoja eri tavoin.³ Virusten RNA:n fosfoesterisidosten pilkkoutuminen voi johtaa rakenteellisten tai funktionaalisten aktiivisuuksien estämiseen. Monet bakteeri-infektioiden hoitoa varten tutkittavat yhdisteet puolestaan hyödyntävät metallikatalyyttien fotoaktiivisuutta DNA:n hajottamiseen.^{3,4,5} Syöpien DNA:n fosfodiesterisidoksen pilkkominen voi johtaa replikaation, transkription tai solujen jakaantumisen kierron häiriöihin sekä apoptoosiin eli solukuolemaan.^{1,3} Esimerkiksi Blenoxane® on kliinisessä käytössä oleva, bleomysiiniperheen glykopeptidi, johon koordinoitunut metalli-ioni vuorovaikuttaa kohdemolekyylin kanssa sekä vaikuttaa biologiseen aktiivisuuteen.³

Metallikompleksien on tarkoitus matkia luonnollisia RNAaseja ja DNAaseja. Luonnolliset nukleasit ovat peptidejä, joiden aktiivisessa keskuksessa voi olla aminohapposivuketjujen lisäksi vesimolekyyliä, epäorgaanista fosfaattia ja metalleja, kuten kuparia, sinkkiä, kalsiumia, kaliumia, nikkeliä, magnesiumia ja magnaania.⁶ Esimerkiksi ribonukleasi A toimii yleisenä emäs-/happokatalyyttinä oligonukleotidien transesterifikaatiossa (Kaavio 1) käyttämällä histidiinisivuketjuja.⁷⁻⁹ Lääkkeiden suunnittelussa on pyritty saavuttamaan samanlaiset ominaisuudet, kuten katalyyttisen tehokkuuden, aktiivisen alueen geometrian ja koordinaation metalli-ionin kanssa, affiniteetin sekä matalan dielektrisen vakion, kuin luonnollisilla nukleaseilla.¹⁰ Yksi haasteista on vesi, joka kilpailee vahvasti anionien vetysidoksista, mutta on heikko Lewisin emäs.¹¹ Kationisten metallikompleksien Lewisin happo -ominaisuudet mahdollistavat koordinoitumisen anioniseen fosfaattiin matalalla affiniteetilla.



Kaavio 1. RNA:n fosfodiesterisidosten pilkkoutumisen yleinen emäs-/happokatalyyysi.

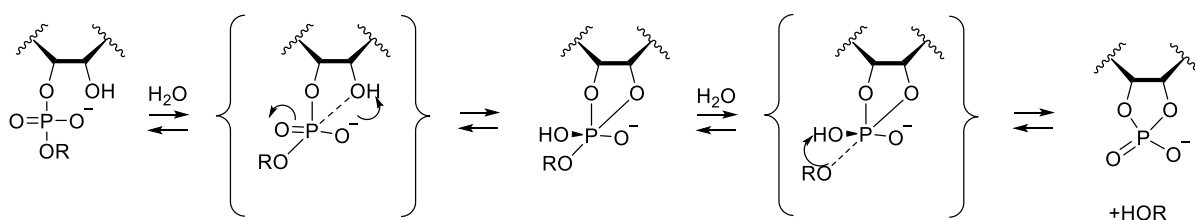
Kohdemolekyylin reaktiomekanismien selvittäminen eri metallikompleksien katalysoimana on tärkeää keinotekoisien nukleasien kehittämiseksi.¹² RNA:n fosfoesterisidosten pilkkoutumista on tutkittu paljon usean vuosikymmenen aikana malliyhdisteiden avulla.^{3,10} RNA-malliyhdisteiden metallikatalyyttistä hajoamista on tutkittu käyttämällä muun muassa uridiinifosfodiesteri-johdannaisia. Suosittuja tutkimuksen kohteita ovat dinukleosidimonofosfaatit, kuten uridylyyli-3',5'-uridiini (3',5'-UpU, **1a**), nukleosidijohdokset, kuten uridiini 3'-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti (UPNP, **2a**) ja syklinen adensiinimonofosfaatti (cAMP, **3**), 2-hydroksipropyyli-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti (HPNP, **4**) sekä DNA-malliyhdisteet bis-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti (BPNP, **5**) ja bis-(2,4-dinitrofenyyli)fosfaatti (BDNPP, **6**).^{3,10,13,14}



1.2 Katalysoimattomat fosfodiesterisidosten pilkkoutumisreaktiot

RNA:n fosfodiesterisidosten pilkkoutumista on tutkittu paljon käyttämällä 3',5'-UpU:a (**1a**) malliyhdisteenä,¹⁵⁻¹⁷ sillä sen hajoamisreaktio on samankaltainen kuin polyuridylylihapon (poly U) reaktio.¹⁷ 3',5'-UpU:n rakenteessa on niin sanotusti huono lähtevä ryhmä (p*K*_a 14,4; 90 °C)¹⁸ ja riboosin rakenne tekee 2'-OH-ryhmästä hyvän nukleofiilin.^{8,19} 3'5'-UpU:n puoliintumisaika

vesiliuoksessa on 110 vuotta pH:ssa 7 ja 25 °C.²⁰ RNA hajoaa intramolekulaarisen nukleofiilin hyökkäyksen seurauksena, jolloin tapahtuu transesterifikaatio, kuten kaaviossa 2 on esitetty.¹⁵ Spontaani reaktio on kaksivaiheinen, ja välituote on fosforaani. Kummassakin vaiheessa vesimolekyylillä välittää protoninsiirron yhtäaikaisesti sidosten muodostumisen kanssa.^{13,21,22} Nukleofiilissä hyökkäyksessä protoni samalla siirtyy 2'-OH-ryhmästä fosfaatille ja hajoamisvaiheessa fosfaatista lähtevälle ryhmälle. Siirtymätila on pentakoordinaatiivinen, trigonaalinen bipyramidi, missä 2'-hydroksiryhmän happi ja lähtevän ryhmän happi ovat apikaalisissa asemissa.^{23,24} Lähtevän ryhmän irtoaminen on nopeutta rajoittava vaihe.^{15,23}



Kaavio 2. Vesikatalyytti siirtää 2'-OH:n protonin fosfaatin hapelle ja tämän jälkeen fosfaatilta lähtevän ryhmän hapelle. Lähtevä ryhmä irtoaa vain apikaalisesta asemasta. Mukailtu lähteestä 17.

Nukleofiilin hyökkäys voi päättyä 3',5'-UpU:n (**1a**) hajoamisreaktion sijaan myös 2',5'-isomeerin muodostukseen neutraaleissa ja happamissa olosuhteissa.¹⁵ Isomerisaatiossa nukleofiilin hyökättyä fosfaattiin tapahtuu ns. Berryn pseudorotaatio eli kaikki apikaalisen aseman ligandit vaihtavat ekvatoriaaliseen asemaan ja kaikki ekvatoriaalisen aseman ligandit vaihtavat apikaaliseen asemaan.¹⁷ Westheimerin sääntöjen²⁴ mukaan ekvatoriaalisessa asemassa oleva lähtevä ryhmä ei voi irrota fosforaanista, mutta 3'-O, joka on pseudorotaation seurauksena apikaalisessa asemassa, voi irrota. Lähtevän ryhmän polaarisuus tai happamuus ei vaikuta isomerisaation nopeusvakioon, kun pseudorotaatio on osittain nopeutta rajoittava vaihe.²¹ Fosfaatin elektronegatiivisuus edistää fosforaanin muodostusta, mutta estää/hidastaa pseudorotaatiota.

Dinukleosidimonofosfaattien, kuten 3'5'-UpU:n (**1a**), lisäksi malliyhdisteinä on usein käytetty ns. aktivoituja substraatteja, kuten *p*-nitrofenyylifosfodiesteriä.^{3,10} Aktivoitu substraatti tarkoittaa sitä, että lähtevän ryhmän irtoaminen ei neutraaleissa olosuhteissa vaadi protonaatiota, sillä *p*-nitrofenolaatti-ioni on resonanssin stabiloima.¹⁰ Aktivoituja RNA-malleja on erilaisia, kuten UPNP (**2a**), HPNP (**4**) ja BPNB (**5**), jotka eroavat toisistaan nukleofiilin suhteen. UPNP:n nukleofiili on sama kuin 3',5'-UpU:lla, mutta UPNP:n transesterifikaation molemmat vaiheet ovat yhtä nopeita, koska *p*-nitrofenolaatti-ioni on parempi lähtevä ryhmä kuin RNA:n alkoksiryhmä ja siksi UPNP hajoaa nopeammin kuin 3'5'-UpU.^{19,23} HPNP:n nukleofiili on huonompi kuin UPNP:n, sillä avoketjuisen rakenteen 2-OH-ryhmä liikkuu vapaammin kuin riboosin 2'-OH, ja siksi HPNP:n transesterifikaatiossa nukleofiilinen hyökkäys on nopeutta rajoittava vaihe.^{14,19} BPNP:n ja BDNPP:n reaktiossa on kyse hydrolyysistä, missä vesimolekyylillä toimii intermolekulaarisena nukleofiilinä, joka

hyökkää fosfaattiin ja lähtevä ryhmä irtoaa, kuten DNA:n pilkkoutumisessa.²⁵ Nukleofiilin ominaisuuksilla voi olla vaikutusta fosfodiesterien transesterifikaatioon, sillä aktivoidut substraatit eroavat reaktiivisuudessa keskenään (Taulukko 1). UPNP:n katalysoimattoman transesterifikaatioreaktion nopeusvakio¹³ on melkein 400 kertaa suurempi kuin HPNP:n²⁶ ja lähes neljä miljoonaa kertaa suurempi kuin BPNP:n.²⁷

Taulukko 1. Erilaisten fosfodiesterien lähtevän ryhmän happamuuden vaikutus reaktionopeuteen

Yhdisteryhmä	β_{LG}^a	Esimerkki-substraatti	pKa	olosuhteet	nopeusvakio s^{-1}
Uridiini alkyyliesterit	-0,59 ^b	3',5'-UpU (1a)	14,4 ^f	pH 5,0; 90 °C	$3,9 \times 10^{-8,i}$
Uridiini aryyliesterit	-0,7 ^c	UPNP (2a)	7,14 ^g	MOPSO; pH 6,5; 25 °C	$4,31 \times 10^{-5,c}$
2-hydroksipropyylifosfodiesterit	-0,42 ^d	HPNP (4)	7,14 ^g	HEPES; pH 7; 25 °C	$1,13 \times 10^{-7,j}$
Diaryylifosfodiesterit	-0,97 ^e	BPNP (5)	7,14 ^g	HEPES; pH 7; 25 °C	$1,1 \times 10^{-11,k}$
		BDNPP (6)	3,93 ^h	pH 8,1; 25 °C	$2,3 \times 10^{-7,l}$

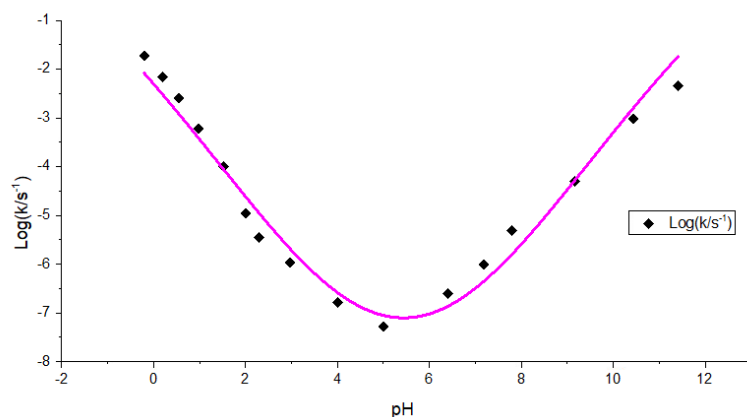
^a β_{LG} -arvot viittaavat yhdistesarjoihin. ^bLähteestä 22. ^cLähteestä 13. ^dLähteestä 19. ^eLähteestä 25. ^fLähteestä 18. ^gLähteestä 28. ^hLähteestä 29. ⁱLähteestä 15. ^jLähteestä 26. ^kLähteestä 27. ^lLähteestä 25.

Fosfoesterisidosten reaktioita on tutkittu monenlaisilla eri menetelmillä.¹⁴ Eräs menetelmä on lähtevän ryhmän Brönstedin korrelaation eli β_{LG} (eng. *beta leaving group*)-arvon määrittäminen, jota on käytetty siirtymätilan analysoimiseen fosfodiesterien transesterifikaatioissa.¹⁴ Yhdisteryhmän pilkkoutumisen β_{LG} -arvo kertoo, miten paljon reaktio riippuu lähtevän ryhmän pKa-arvosta.²¹ Mitä negatiivisempi β_{LG} -arvo on, sitä enemmän lähtevän ryhmän ominaisuudet vaikuttavat reaktion nopeuden määrittävässä vaiheessa. Esimerkiksi uridiini aryyylifosfodiesterien (**2**) pilkkoutumisen β_{LG} -arvo on melko pieni (-0,20),²³ joten todennäköisesti lähtevä ryhmä on protonoitunut ja siirtymätilassa on yhtäaikainen protoninsiirto.²¹ Melko negatiivinen β_{LG} -arvo (-0,59)²² kertoo, että siirtymätilassa on osittainen protoninsiirto, ja hyvin negatiivinen β_{LG} -arvo puolestaan kertoo, että lähtevä ryhmä irtoaa alkoksianionina.²¹

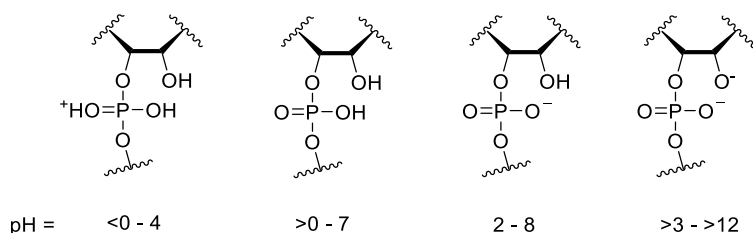
Taulukkoon 1. on koottu yhdisteiden **1**, **2** ja **4–6** katalysoimattomien hajoamisreaktioiden ominaisuuksia suunnilleen samoissa olosuhteissa. Taulukkoon on myös kerätty vastaaville yhdisteryhmille määritettyjä β_{LG} -arvoja. Näiden β_{LG} -arvojen perusteella voisi päätellä, että 3'5'-UpU:n (**1a**), BPNP:n (**5**) ja BDNPP:n (**6**) pilkkoutumisen siirtymätilat muistuttavat melko paljon tuotetta. HPNP:n (**4**) ja UPNP:n (**2a**) pilkkoutumisen β_{LG} -arvot ovat melko suuria, mikä viittaisi siihen, että siirtymätilassa tapahtuu osittainen protoninsiirto. Taulukon 1 perusteella voisi ajatella, että lähtevän ryhmän happamuus vaikuttaa merkittävästi diaryylifosfodiesterien pilkkoutumiseen: reaktion β_{LG} -arvo on -0,97 ja happamampi 2,4-dinitrofenyyli-ryhmä irtoaa pH:ssa 8 noin 20 000 kertaa nopeammin kuin *p*-nitrofenyyli-ryhmä pH:ssa 7.

1.3 Olosuhteiden ja liuoksen vaikutus

pH-nopeus -profiilit näyttävät, miten liuoksen pH vaikuttaa lähtöaineen hajoamisreaktion.^{15,22,25} 3',5'-UpU:n (1a) pilkkoutumisen pH-nopeus -profiilista (Kuvaaja 1)¹⁵ havaitaan, että 3',5'-UpU:n hajoaminen on nopeimmillaan pH:ssa 0 ja 12 ja hitaimmillaan pH:ssa 5. Hydrolyysi on ensimmäisen kertaluvun reaktio hydroniumionin konsentraation suhteen pH:ssa 3–5 ja hydroksidi-ionin konsentraation suhteen pH:ssa 6–11.¹⁵ Kuvassa 1 on esitetty 3',5'-UpU:n ionimuodot, jotka vaikuttavat hajoamisreaktion eri pH:ssa 90 °C:ssa. pH:ssa 0 3',5'-UpU esiintyy vain kationisessa muodossa, mutta pH:n noustessa arvoon 4 kationisen muodon osuus pienenee nolnaan.³⁰ Neutraalin fosfodiesterin osuus käy huipussa pH:ssa 3 ja monoanionin osuus pH:ssa 5. Dianionista muotoa esiintyy pH:sta 4 ylöspäin ja pH:sta 8 lähtien se on 3',5'-UpU:n ainoa muoto.



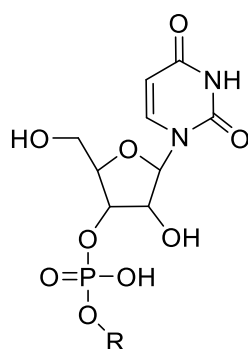
Kuvaaja 1. 3',5'-UpU:n hajoamisreaktion nopeusvakioiden arvot (pH 0.1–11.5; 90 °C; happovesiliuos: $[H^+] > 0,01$ M). Kuvaajan käyrä piirrettiin Origins-ohjelmalla käyttämällä Lorentz-mallia. Datapisteet otettiin lähteestä 15.



Kuva 1. 3',5'-UpU:n eri ionimuodot hajoamisreaktiossa pH:ssa 0.1–12, 90 °C:ssa. Mukailtu lähteestä 30.

Fosfodiesterien reaktiomekanismit vaihtelevat olosuhteiden mukaan. RNA:n happokatalyysissä transesterifikaatiossa välituote on monokationinen fosforaani tai neutraali fosforaani, joka voi isomerisoida tai jonka lähtevä ryhmä voi protonoitua ja irrota.³⁰ Hajoamisreaktion välivaiheet ovat

yhtä nopeita.^{23,31} Uridiini aryylifosfodiesterien (**2**) happokatalyyttisen hajoamisreaktion β_{LG} -arvo on $-0,27$ ²³ ja uridiini alkyylifosfodiesterien (**7**) $-0,12$.³¹ Uridiini aryyli- ja alkyylifosfodiesterien happokatalyyttiseen reaktioon ei siis vaikuta lähtevän ryhmän happamuus merkittävästi.²¹ Tämä selittyy sillä, että lähtevä ryhmä irtoaa alkoholina ja ryhmän elektronegatiivisuus edesauttaa nukleofiilistä hyökkäystä, mutta toisaalta alhaisempi pK_a tarkoittaa, että lähtevä ryhmä protonoituu huonosti.²¹ Uridiini alkyylifosfodiesterien lähtevän ryhmän pK_a ei myöskään vaikuta isomerisaatioon, sillä $\beta_{LG} = -0,18$, mutta hajoaminen on nopeampi reaktio kuin isomerisaatio, kun lähtevän ryhmän $pK_a > 12,2$.³¹



- 7a**; R = 2,2,2-trikloroetyyli
7b; R = 2,2-dikloroetyyli
7c; R = 2,2-difluoroetyyli
7d; R = etoksietyyli
7e; R = metyyli
7f; R = isopropyyli

Uridiini alkyylifosfodiesterien (**7**) isomerisaatio ja pilkkoutuminen neutraaleissa olosuhteissa riippuvat lähtevän ryhmän pK_a :sta eri tavoin. Monoanionisten uridiini alkyylifosfaattien hajoamisreaktion β_{LG} -arvo on $-0,59$, kun taas isomerisaation $-0,03$.²² Neutraaleissa olosuhteissa fosfodiesterit hajoavat emäskatalyyttisesti tai ilman katalyyttiä ja katalysoimattomien reaktioiden osuus kasvaa mitä huonompi lähtevä ryhmä on.^{13,22} Esimerkiksi pH:ssa 6,5 ja 90 °C:ssa $UpEtCl_3$ (**7a**) reagoi lähes täysin emäskatalyyttisesti ja $UpiPr$ (**7f**) reagoi pääosin spontaanisti.¹³ Huonon lähtevän ryhmän irtoaminen vaatii protonaation, kun taas emäskatalyyttisessä reaktiossa lähtevä ryhmä irtoaa alkoksianionina. Molempien vaiheiden siirtymätilojen energiakynnykset madaltuvat lähtevän ryhmän pK_a -arvon pienentyessä.³³ Monoanionisten fosfodiesterien isomerisaatio on nopeampi reaktio kuin lähtevän ryhmän irtoaminen.²² Eroavaisuus isomerisaation ja hajoamisen reaktionopeudessa pienenee kun lähtevän ryhmän pK_a pienenee.

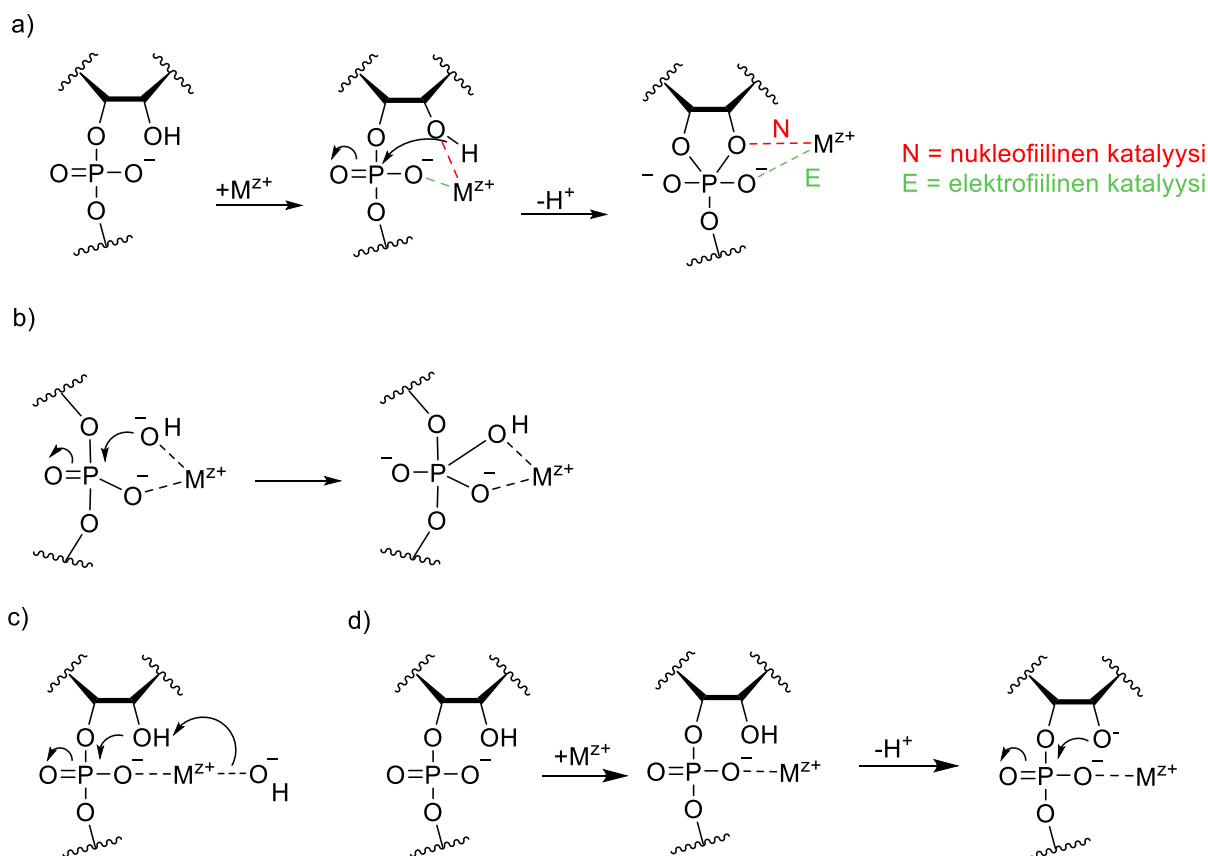
Uridiini fosfodiesterien lähtevän ryhmän ominaisuudet vaikuttavat reaktiomekanismiin merkittävästi emäksisissä olosuhteissa. Uridiini aryylifosfaattien (**2**) emäskatalyyttisen reaktion β_{LG} -arvo on vähemmän negatiivinen ($-0,54$)²⁸ kuin uridiini alkyylifosfaattien (**7**), joiden reaktion β_{LG} -arvo on hyvin negatiivinen ($-1,28$).²² Tämä johtuu mahdollisesti siitä, että happamammat lähtevät ryhmät irtoavat herkemmin ja reaktion hidastava vaihe muuttuu fosforaanin muodostuksesta lähtevän ryhmän irtoamiseen, kun lähtevän ryhmän $pK_a > 12,6$.¹³ Riippumatta lähtevästä ryhmästä uridiini fosfodiesterit eivät isomerisoidu, sillä dianioninen fosforaani on pysymätön.¹⁵ Pseudorotaatio siirtäisi elektronegatiivisen alkoksiryhmän ekvatoriaaliseen asemaan, mikä on Westheimerin säännön²⁴ mukaan epäsuotuisaa. Fosfotriesterien transesterifikaation välituote ei voi kuitenkaan olla dianioni, ja

niiden reaktio johtaakin enimmäkseen isomerisaatioon, jonka reaktionopeus riippuu P-OR-ryhmän happamuudesta.²¹

Liuottimella ja puskurilla on vaikutusta fosfodiesterien reaktionopeuteen ja -mekanismiin.^{16,34,35} 3'5'-UpU:n (1a) ja HPNP:n (4) pilkkoutumista on tutkittu vedessä ja DMSO:ssa erilaisten puskurien katalysoimana. 3'5'-UpU:n katalysoimattomassa reaktiossa fosforaani on epästabiliimpi ja isomerisaatiota tapahtuu DMSO:ssa kolme kertaa vähemmän kuin vedessä.³⁴ Emäskatalyyttisessä reaktiossa 2'-hydroksiryhmä protonoituu DMSO:ssa huomattavasti nopeammin, mutta koska oksianioni myös solvatoituu huomattavasti nopeammin kuin vedessä, nukleofiili on parempi. Vedessä emäksisessä puskuriliuoksessa, kuten 90/10 emäs/happo -morfoliiniliuoksessa, puskurin konsentraation lisääminen hidastaa 3'5'-UpU:n isomerisaatiota ja nopeuttaa hajoamisreaktiota.¹⁶ Puskurin konsentraation muutos vaikuttaa samoin DMSO-liuoksessa, mutta puskuriliuoksen vaikutus 3'5'-UpU:n transesterifikaatioon on merkittävämpi kuin vedessä, koska hydroksidi-ionin konsentraatio on pienempi kuin vedessä.³⁴ HPNP:n pilkkoutumisessa DMSO-liuoksessa puskuriliuoksen vaikutus reaktionopeuteen on suurempi kuin nukleosidifosfodiesterien pilkkoutumisessa: Esimerkiksi 0,1 M piperidiinipuskuri nopeuttaa HPNP:n reaktiota 10³-kertaisesti ja 3'5'-UpU:n reaktiota vain nelinkertaisesti.³⁴

1.4 Metallionien ja -kompleksien katalysoimat reaktiot

Fosfodiesterien transesterifikaatiota on tutkittu paljon metallionien ja metallikompleksien läsnä ollessa.^{3,13,14,36} Metallionit ja -kompleksit tehostavat tai katalysoivat fosfodiesterien transesterifikaatiota.¹⁴ Luultavasti kompleksit toimivat pääosin stoikiometrisinä tekijöinä substraattien hajoamisreaktioissa eikä katalyyteinä, mutta tässä tutkielmassa puhutaan yksinkertaisten katalyyteistä. Katalyysimenetelmiä on useita, kuten elektrofiilinen katalyyysi, missä metalli koordinoituu fosfaatin *non-bridging* hapteen, ja nukleofiilinen katalyyysi, missä metalli koordinoituu esimerkiksi uridiini fosfodiesterin 2'-hydroksidiryhmään (Kaavio 3a).^{12,13} Intermolekulaarisessa nukleofiilisessä katalyyysissä metalliin koordinoitunut hydroksidiligandi hyökkää fosfaattiin, minkä jälkeen lähtevä ryhmä irtoaa (Kaavio 3b).^{37,38} Katalyytti voi myös koordinoitua sekä nukleofiiliin, että fosfaattiin, jolloin voidaan puhua hybridikatalyyysistä tai bifunktionaalisesta katalyyysistä (Kaavio 3a).³⁷ Yleisessä emäskatalyyysissä substraattimetallikatalyytti -kompleksin hydroksidiligandi deprotonoi 2'-OH:n (Kaavio 3b).^{13,14,23} Spesifisessä emäskatalyyysissä liuoksen vahva emäs deprotonoi nukleofiilin (Kaavio 3c) ja samalla metallikatalyytti voi koordinoitua substraattiin.¹³ Reaktiomekanismia on kuitenkin vaikea päätellä yleisen ja spesifisen emäskatalyyysin välillä, sillä ainoa eroavaisuus on protoninsiirrosta.²³ Yleisessä happokatalyyysissä puolestaan substraattimetallikatalyytti -kompleksin vesiligandi deprotonoi lähtevän ryhmän sen irrottamiseksi.²³

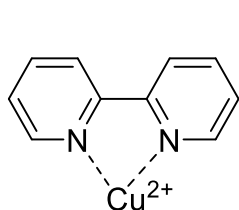
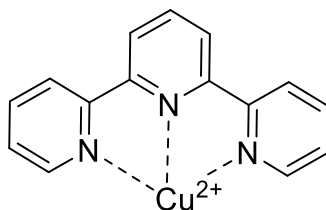


Kaavio 3. a) Nukleofiilinen / elektrofiilinen katalyyssi. b) Yleinen emäskatalyyssi. c) Spesifinen emäs- ja elektrofiilinen katalyyssi. Mukailtu lähteistä 12 ja 14.

Eri katalyyteillä voi olla eri mekanismi tietyn substraatin katalysoinnissa ja yhdellä katalyytillä eri mekanismi erilaisten substraattien reaktiossa.¹³ Metallikompleksit voivat tehostaa uridiini fosfodiesterien reaktiota emäskatalyyttisesti.²³ Kun lähtevä ryhmä on huono, uridiini alkyylifosfodiesterien (7) kohdalla voi olla kyse yleisestä happo-/emäskatalyyseistä. HPNP:n (4) metallikatalyyttisessä reaktiossa on ehdotettu olevan intramolekulaarinen nukleofiilinen katalyyssi (Kaavio 3a), BPNP:n (5) reaktiossa intrakompleksinen nukleofiilinen katalyyssi (Kaavio 3b) ja UPNP:n (2a) reaktiossa yleinen emäskatalyyssi (Kaavio 3c) tai spesifinen emäskatalyyssi (Kaavio 3d).^{13,14,35} HPNP:n metallikatalyyttisen reaktion mekanismi voi myös olla yleinen emäskatalyyssi.^{14,38}

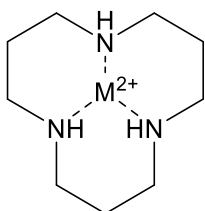
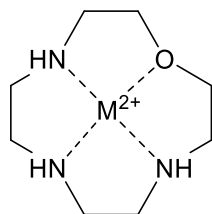
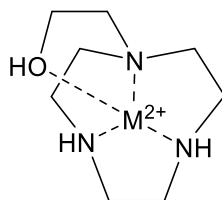
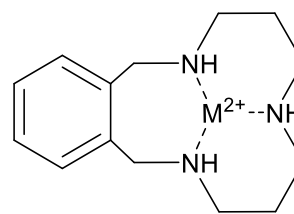
Katalyytin metallilla ja ligandilla on merkitystä fosfodiesterien transesterifikaation nopeuteen.^{10,14} Zn(II)- ja Cu(II)-ionit sitoutuvat substraattiin sopivalla affiniteetilla toisin kuin koboltti- ja iridiumionit, jotka eivät irtoa hajoamistuotteista tarpeeksi nopeasti.¹⁰ Sinkki ja kupari muodostavat katalyyttisesti aktiivisia akvaioneita, mutta ne eivät ole niin tehokkaita katalyytteinä kuin ligandien kanssa muodostetut metallikompleksit.¹⁴ Keinotekoisien nukleasien tutkimuksissa on käytetty ligandeina muun muassa peptidejä, polyatsamakrosyklejä ja polypyridiylilyhdisteitä, joista 2,2'-bipyridiini ja 2,2':6',2''-terpyridiini sekä niiden johdannaiset ovat olleet yleisiä.^{3,14} Seuraavissa osioissa esitetään erilaisia metallikomplekseja, joita on käytetty keinotekoisien nukleasien

kehityksessä, ja viimeisessä osiossa kuparibipyridiinin (CuTerPy, **8**) ja kupariterpyridiinin (CuTerPy, **9**) tutkimuksia fosfodiesterien katalyytteinä.

CuBiPy (**8**)CuBiPy (**9**)

1.4.1 Monofunktionaaliset metallikompleksit

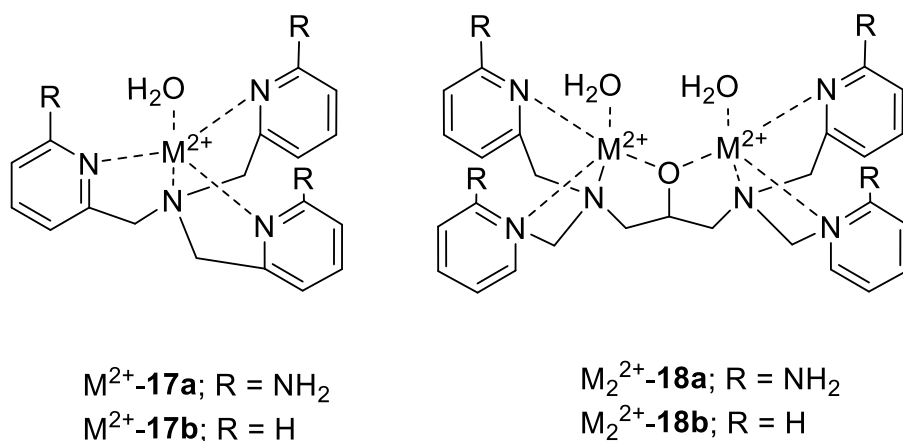
RNA:n reaktiota on tutkittu paljon makrosyklisen metallikompleksien katalysoimana, mutta niiden hyödyntämisessä on monia haasteita.^{39–42} Esimerkiksi kompleksin sitoutuminen fosforaanisiirtymätilaan täytyy olla vahvempi kuin hajoamistuotteeseen, sillä muuten tuotteen hidas irtoaminen kompleksista vaikuttaisi reaktionopeuteen.³⁹ Metallikompleksin täytyisi myös sitoutua selektiivisesti fosfaatin kanssa.⁴⁰ Sinkkiatsamakrosykli-kompleksit Zn²⁺-**10–12** sitoutuvat vahvasti uridiinin typpiatomien kanssa ja toimivat siten hyvin emässelektiivisesti. Tämä mekanismi tosin inhiboi RNA:n hajottamista, koska katalyyttien vuorovaikutus fosfaatin kanssa estyy. Keinotekkoisten nukleaasien suunnittelussa on huomioitava myös se, että metalli-ionin koordinaatiokehässä on tilaa fosfaatille, ja esimerkiksi 50 % asetonitriililiuoksessa olisi liikaa vahvasti koordinoituvia typpiatoimeja.⁴¹ Metallikompleksit, joiden ligandissa on yksi tai kaksi triatsakruunua, kuten esimerkiksi M²⁺-**13**, ovat aktiivisia HPNP:n pilkkoutumisen katalysoinnissa (Taulukko 2). Sen sijaan tetratsakruunukompleksit eivät ole aktiivisia katalyyttejä HPNP:n reaktiossa luultavasti siksi, että metalli ei pysty koordinoitumaan kohteeseen. Metallimakrosykli-kompleksit voisivat olla hyviä, pieniä fosfataaseja, jos niiden ligandi koordinoituisi metalliin vain sopivan vahvasti ja niihin muokattaisiin funktionaalisia ryhmiä, jotka lisäävät selektiivisiä vuorovaikutuksia fosfaatin kanssa.⁴²

M²⁺-**10**M²⁺-**11**M²⁺-**12**M²⁺-**13**

Taulukko 2. Metallikompleksien katalysoimien fosfodiesterien hajoamisreaktioiden nopeusvakioita

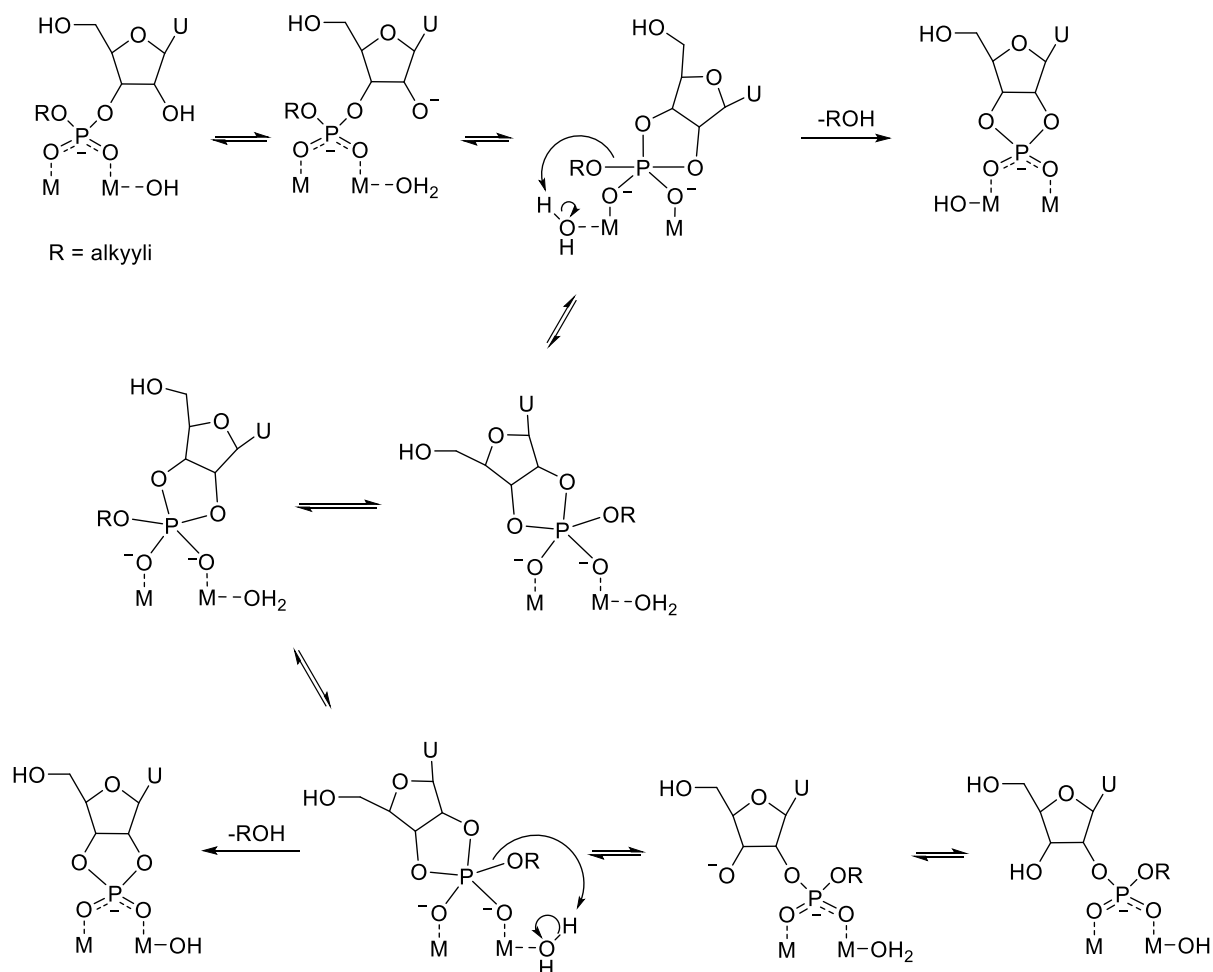
substraatti	katalyytti	olosuhteet	nopeusvakio	viite
BPNP				
	[Yb(OH)] ²⁺	pH 7.40	$k_l = 2.20 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	43
	[Sm(OH)] ²⁺	pH 7.40	$k_l = 1.40 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	43
	[Sm(OH)] ²⁺	pH 7.70	$k_l = 4.40 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	43
	Eu ³⁺ - 22	pH 7–11; 25 °C	$k_2 = 6,72 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	44
	Yb ³⁺ - 22	pH 7–11; 25 °C	$k_2 = 4,13 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	44
BDNPP				
	Tb- 19	HEPES; pH 7; 25 °C ^a	$k_l = 7 \text{ s}^{-1}$	45
	Eu- 19	HEPES; pH 7; 25 °C ^a	$k_l = 18 \text{ s}^{-1}$	45
	Gd- 19	HEPES; pH 7; 25 °C ^a	$k_l = 17 \text{ s}^{-1}$	45
HPNP				
	Zn ²⁺ - 10	pH 8; 25 °C	$k_2 = 9,0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	40
	Zn ²⁺ - 10	pH 7; 25 °C	$k_l = 8,6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	46
	Cu ²⁺ - 10	pH 7; 25 °C	$k_l = 3,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	46
	Zn ²⁺ - 11	pH 8; 25 °C	$k_2 = 8,9 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	40
	Zn ²⁺ - 12	pH 7–10; 25 °C	$k_2 = 7,2 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	42
	Zn ²⁺ - 12	pH 8; 25 °C	$k_2 = 7,3 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	42
	Zn ²⁺ - 13	pH 7; 20 °C	$k_l = 7,05 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	41
	Cu ²⁺ - 13	pH 7; 20 °C	$k_l = 1,98 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	41
	Zn ²⁺ - 17a	pH 7,4; 25 °C	$k_2 = 4,6 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	54
	Zn ₂ ²⁺ - 18a	pH 7,4; 25 °C	$k_l = 0,017 \text{ s}^{-1}$	48
	Zn ₂ ²⁺ - 18b	pH 7,4; 25 °C	$k_2 = 6,6 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	54
	La ³⁺ - 20	pH 7.4; 37 °C	$k_l = 1,14 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	49
	Eu ³⁺ - 20	pH 7.4; 37 °C	$k_l = 1,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	49
	Eu ₂ ³⁺ - 22	pH 7–11; 25 °C	$k_2 = 7,69 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	44
	Yb ₂ ³⁺ - 22	pH 7–11; 25 °C	$k_2 = 1,30 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	44
UPNP				
	Zn ²⁺ - 10	pH 5,9; 25 °C	$k_l = 1,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	13
	Zn ₂ ²⁺ - 15	pH 6,6; 25 °C	$k_l = 1,11 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	13
	Zn ₂ ²⁺ - 16	pH 6,5; 50 °C	$k_l = 2,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	13
NpN^b				
3',5'-UpU	1 mM Zn ₂ ²⁺ - 18	pH 6.5; 25 °C	$k_l = 2,6 \times 10^{-5}$	50
	1 mM Co ₂ ²⁺ - 18	pH 6.5; 25 °C	$k_l = 9,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	50
3',5'-ApU	1 mM Zn ₂ ²⁺ - 18	pH 6.5; 25 °C	$k_l = 1,25 \times 10^{-5}$	50

Williams^{47,50} on kehittänyt mono- M^{2+} -**17**⁴⁷ ja dinukleaariset M_2^{2+} -**18** metallikompleksit⁵⁰, jotka hyödyntävät metallin ominaisuuksia ja vetysidosten luovuttajia. Katalysoimattomaan 3'5'-UpU:n (**1a**) ja HPNP:n (**4**) pilkkoutumiseen verrattuna dinukleaarinen sinkkikompleksin Zn_2^{2+} -**18a** katalysoimat reaktiot ovat miljoona kertaa nopeampia.^{48,50} HPNP:n reaktiossa dinukleaarinen sinkkikompleksi Zn_2^{2+} -**18b** on lähes puolitoista kertaa tehokkaampi kuin mononukleaarinen sinkkikompleksi Zn^{2+} -**17a**, jolla on vetysidoksia luovuttavat aminoryhmät (Taulukko 2).⁵⁴ Kobolttikompleksi Co_2^{2+} -**18a** on metallikomplekseista M_2^{2+} -**18a** tehokkain katalyytti dinukleosidimonofosfaattien hajoamisreaktiossa (Taulukko 2).⁵⁰ M_2^{2+} -**18** metallikompleksit katalysoivat myös 3'5'-UpU:n isomerisaatiota: 1 mM dinukleaarista katalyyttiä Zn_2^{2+} -**18a** tehostaa 3',5'-UpU:n isomerisaatiota 2',5'-UpU:ksi 500-kertaisesti katalysoimattomaan reaktioon verrattuna.¹⁸ M_2^{2+} -**18** on tähän asti ainoa keinotekoinen metallikompleksi, joka katalysoi myös nukleosidifosfodiesterien isomerisaatiota.¹⁴



Yhdisteet **17** ja **18** käyttävät useita katalyysimekanismeja. Esimerkiksi HPNP:n (**4**) pilkkoutumisen katalysoinnissa mononukleaariset kompleksit Zn^{2+} -**17a** ja **17b** tehostavat fosfaatin elektrofiilisyyttä ja siten spesifistä emäskatalyysia.⁴⁷ 3'5'-UpU:n (**1a**) hajoamisreaktiossa taas dinukleaarisen kompleksin Zn_2^{2+} -**18** molemmat sinkki-ionit koordinoituvat fosfaatin oksianioineihin ja yhdessä ligandin luovuttamien vetysidosten avulla stabiloivat dianionista fosforaania ja välituotetta sekä mahdollistavat apikaalisen oksianionin ja siten pseudorotaation.^{18,50} Dinukleaarinen kompleksi Zn_2^{2+} -**18** sitoutuu substraattiin voimakkaammin kuin vastaavat mononukleaariset kompleksit, koska fosfaatti toimii siltana metalli-ionien välillä.^{48,50} Uridiini alkyylifosfodiesterien (**7**) metallikatalyyttisen hajoamisen ja isomerisaation ehdotetut mekanismit¹⁸ on kuvattu kaaviossa 4. Pseudorotaatio on nopeutta rajoittava vaihe, kun substraatissa on hyvä lähtevä ryhmä. Kompleksin Zn_2^{2+} -**18** katalysoiman uridiini 3'-alkyylifosfaattien pilkkoutumisen β_{LG} -arvo on paljon negatiivisempi (-0,92)¹⁸ kuin sinkkiakvaionien tai -monometallikompleksien katalysoimien reaktioiden.²¹ Toisin kuin ei-katalysoidussa reaktiossa, kompleksilla Zn_2^{2+} -**18**:n katalysoiman **7**:n isomerisaation nopeusvakio riippuu lähtevän ryhmän happamuudesta ja β_{LG} -arvo -0,50 on selkeästi suurempi kuin ilman katalyyttiä.¹⁸ Yllämainitut tulokset selittyvät sillä, että reaktionopeuden ja lähtevän ryhmän Brönsted-parametrit ovat samankaltaiset kuin uridiini triestereillä ja/tai sillä, että sinkin vesiligandi luovuttaa protonin lähtevälle ryhmälle.¹⁸

Kompleksi Zn_2^{2+} -**18** toimii siis lähinnä elektrofiilisenä katalyyttinä, mutta voi myös toimia yleisenä happokatalyyttinä.

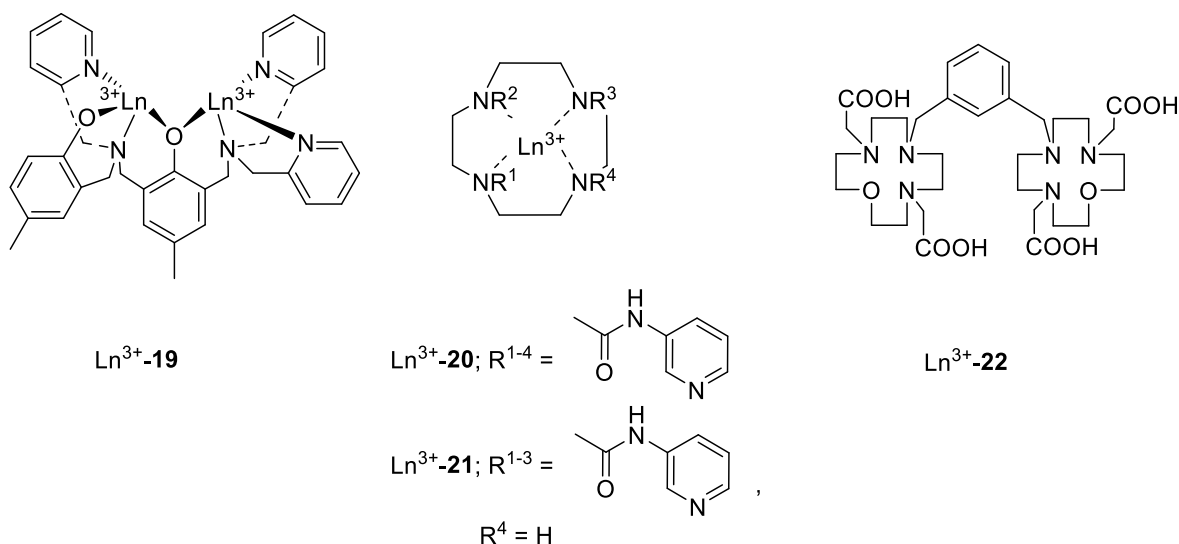


Kaavio 4. Mahdollinen reaktiomekanismi uridiini alkyyliesterien (**7**) hajoamisessa metallikompleksin M_2^{2+} -**18** katalysoimana. M-kirjaimet kuvaavat kompleksin M_2^{2+} -**18** metalli-ioneja. Mukailtu lähteestä 18.

1.4.3 Lantanidikompleksit

Myös lantanidi-ionit, kuten lantaani(III), samarium(III), europium(III), gadolinium(III), terbium(III) ja ytterbium(III), ovat suosittuja RNA:n transesterifikaation tutkimuksissa.^{39,43,45,49} Lantanidihydroksidit ovat hyviä katalyyttejä, jotka toimivat joko nukleofiilinä tai yleisenä emäksenä.⁵⁵ Katalyyttinen aktiivisuus kasvaa, kun lantanidit muodostavat polynukleaarisen yhdisteen ja saostuvat liuoksesta geeliksi pH:ssa 6, kun konsentraatio on tarpeeksi suuri. Esimerkiksi pH:ssa 5,6 Gd^{3+} -ionien katalysoimassa 3'-UMP:n hajoamisreaktiossa nopeusvakion riippuvuus metalli-ionin konsentraatiosta on ensimmäistä kertalukua, kun $[Gd^{3+}] < 5 \times 10^{-3}$, ja toisen ja kolmannen kertaluvun välillä korkeammassa konsentraatiossa, jossa Gd^{3+} alkaa saostua.⁵⁵

Lantanidi-ioneilla on merkittäviä keskinäisiä eroavaisuuksia siinä, miten metalli vaikuttaa katalyytin ominaisuuksiin fosfodiesterien hajomisessa. Ionin suuri säde tekee metallista hyvän elektrofiilin, mikä taas tekee nukleoofiilisestä hydroksidista huonomman emäksen.⁴⁵ Esimerkiksi ytterbiumhydroksidilla on korkeampi varaustiheys kuin samariumhydroksidilla, mutta $[\text{Sm}(\text{III})\text{OH}_2]^{2+}$ katalysoi BPNP:n (5) reaktiota tehokkaammin.⁴³ BDNPP:n (6) hajoamisen katalysoinnissa Eu_2^{3+} -19 ja Gd_2^{3+} -19 ovat yli kaksi kertaa tehokkaampia komplekseja kuin Tb_2^{3+} -19.⁴⁵ Makrosyklisistä lantanidikomplekseista tetrasubstituoitu kompleksi La^{3+} -20 ja trisubstituoitu kompleksi La^{3+} -21 ovat tehokkaampia HPNP:n hajottamisessa kuin vastaavat Eu^{3+} -kompleksit.⁴⁹ Eu^{3+} -20:n aktiivisuuden huippu on kuitenkin lähempänä fysiologisia olosuhteita, eli pH:ssa 8, kun taas La^{3+} -20 saavuttaa maksimin pH:ssa 8,4. Eu^{3+} - ja Yb^{3+} -m-ODO2A-dimeerien Ln_2^{3+} -22 katalysoimien BPNP:n ja BDNPP:n transesterifikaatioiden nopeusvakioiden huiput ovat korkeassa pH:ssa, noin pH:ssa 10 Yb_2^{3+} -22:llä ja pH:ssa 11 Eu_2^{3+} -22:llä.⁴⁴ Eu_2^{3+} -22 on tehokkaampi kuin Yb_2^{3+} -22 BPNP:n reaktion katalysoinnissa (Taulukko 2) ja Ln_2^{3+} -LH₂ on tehokkain metallikompleksin muoto.



Lantanidikompleksien suosio selittyy sillä, että katalyyteillä on saatu hyviä tuloksia RNA-malliyhdisteiden transesterifikaation tutkimuksissa (Taulukko 2). Lantanidikompleksit ovat oksofiilisiä eivätkä sitoudu esimerkiksi uridiinin typpi-atomeihin, kuten Zn^{2+} - ja Cu^{2+} -makrosyklit 10–12.⁴⁰ Ln-komplekseja on kuitenkin vaikea hyödyntää: Negatiivisesti varautuneet ligandit, joissa on esimerkiksi COOH-ryhmiä, muodostaisivat pysyvämpiä metallikomplekseja, mutta ne heikentävät lantanidi-ionien katalyyttistä tehokkuutta.⁵⁶ Sekvenssispesifisten katalyyttien valmistamiseen tarvitaan oligonukleotidikoetin sekä lantanidi-ionin ja ligandin muodostama, pysyvä kelaatti.⁵⁶ Lantanidikompleksit hajoavat katalysoinnin yhteydessä, joten metallikatalyyttien suunnittelussa on

usein käytetty sinkki- ja kupari-ioneja, koska niiden kanssa muodostetut kompleksit ovat pysyvämpiä.^{14,56}

1.4.4 Lähtevän ryhmän ja metallikompleksin rakenteen vaikutus metallikatalyysiin

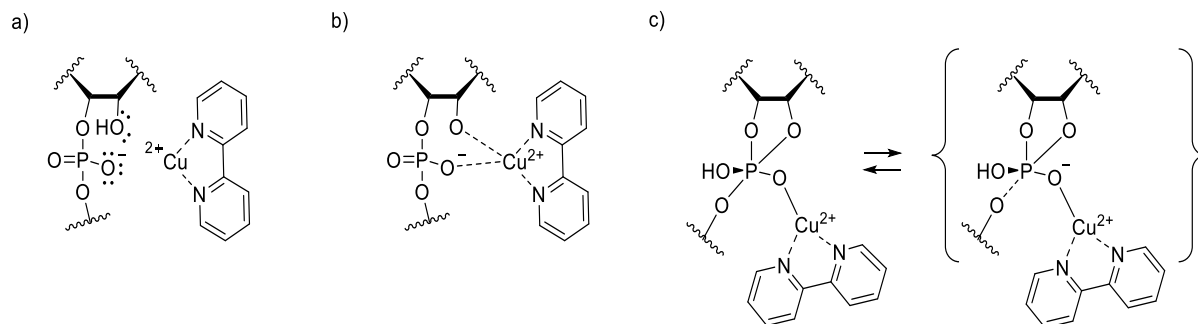
Metallikatalyyttisten reaktioiden nopeusvakioon vaikuttaa lähtevän ryhmän happamuus vaihtelevasti riippuen katalyyttistä ja substraatista.²¹ Sinkkiakvaation katalysoimassa uridiini alkyylifosfodiesterien (7) pilkkoutumisessa lähtevän ryhmän happamuus ei vaikuta niin paljon kuin katalysoimattomassa reaktiossa, sillä reaktioiden vastaavat β_{LG} -arvot ovat $-0,32^{23}$ ja $-0,59^{22}$, ja nikkeliakvaation katalysoimassa pilkkoutumisessa lähtevän ryhmän happamuus vaikuttaa lähes yhtä paljon ($\beta_{LG} = -0,54$).²¹ Aryyliesterit ovat herkimpiä happamuuden vaikutukselle useiden katalyyttien kohdalla.²¹ Mono- ja bimetallikomplekseilla katalyyttinen aktiivisuus kasvaa, kun aryyli ryhmän happamuus pienenee.¹³

Metallikompleksien ominaisuuksia tutkimalla ja rakennetta muokkaamalla voidaan kehittää keinotekoisia nukleaaseja. Kompleksin metalli-ionit voivat koordinoitua vesiligandeihin, joten liuoksen pH vaikuttaa hydrolyysiin ja reaktionopeuteen.⁴⁹ Toisin sanoen ligandin ympäristö vaikuttaa metallin koordinoitumisen määrään ja hydrolyysiin, mikä voi tarkoittaa sitä, että keinotekoisien nukleaasin suunnittelussa voidaan säätää tehokkuutta paremmaksi juuri fysiologisissa olosuhteissa. Kolmas metalli-ioni kompleksissa voi nopeuttaa tai hidastaa hajoamisreaktiota, kuten esimerkiksi kaliksareeneilla, jotka ovat makrosykkejä ja bentseenirenkaita sisältäviä yhdisteitä.⁴⁶ Dinukleaaristen katalyyttien tehokkuuteen vaikuttaa myös ligandin rakenteen geometria.³⁸ Amidiryhmien lisääminen lantanidimakrosyklikompleksiin ja kompleksin jäykempi rakenne pienentää reaktion nopeusvakiota.⁵⁷

1.5 Kuparibipyridiini ja kupariterpyridiini fosfodiesterien pilkkoutumisen katalyytteinä

CuBiPy- ja CuTerPy-kompleksit ovat käytännöllisiä katalyyttejä fosfodiesterien tutkimuksessa, koska ne ovat pieniä ja pysyviä rakenteeltaan ja niiden ominaisuudet tunnetaan hyvin.¹⁹ CuTerPy ja CuBiPy -happo ja -vastinemäs ovat kationisia monometallikomplekseja, jotka sitoutuvat RNA:han elektrostaattisen voiman avulla tai suoralla koordinoinnilla (Kuva 2a,b).⁵⁸ Lisäksi kompleksien metallit voivat tehostaa fosfodiesterien protoninsiirtoa stabiloimalla fosforaanivälituotetta tai -siirtymätilaa metallikationien Lewisin happo -ominaisuuksien ansiosta (Kuva 2c).⁵⁸ Cu²⁺-BiPy(OH)(OH₂) ja Cu²⁺-TerPy(OH)(OH₂) toimivat myös yleisinä emäs-/happokatalyytteinä. Kuparikompleksin metallin hydroksoligandi toimii nukleofiiliniä aryylifosfodiesterien pilkkoutumisen katalysoinnissa.¹³ CuBiPy:n katalyyttinen aktiivisuus fosfodiesterien reaktioissa heikkenee pH:n

noustaessa kuudesta kahdeksaan,²⁶ sillä pH:ssa 7 kompleksi on osittain dimeroitunut ja pH:ssa 8 täysin dimeroitunut.⁵⁹ Dimeerinen kompleksi katalysoi heikosti fosfodiesterien pilkkoutumista.²⁶



Kuva 2. CuBiPy saavuttaa RNA:n a) elektrostaattisen voiman avulla tai b) koordinoitumalla substraattiin sekä c) stabiloi fosforaanivälituotetta ja hajoamisen siirtymätilaa.

CuBiPy:ä ja CuTerPy:ä on tutkittu paljon fosfodiesterien transesterifikaation metallikatalyytteinä.^{13, 14,58,59} Tutkimuksissa on havaittu, että CuBiPy:n ja CuTerPy:n tehokkuus toisiinsa verrattuna riippuu substraatin ominaisuuksista ja olosuhteista.¹³ CuTerPy on parempi katalyytti hyvän intramolekulaarisen nukleofiilin omaavien yhdisteiden, kuten nukleosidi alkyylifosfodiesterien reaktiossa,¹³ mutta huonompi katalyytti BPNP:n (**5**) pilkkoutumisessa.⁶⁰ CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalysoimissa nukleosidi aryylifosfodiesterien hajoamisreaktiossa happamampi lähtevä ryhmä tehostaa katalyytin aktiivisuutta.¹³ CuBiPy on heikompi katalyytti kuin CuTerPy, mutta aryyli-ryhmän pK_a :n laskiessa kompleksien aktiivisuuden erot tasaantuvat. Neutraaleissa olosuhteissa UPNP:n (**2a**) reaktiovaiheet ovat yhtä nopeita ja CuTerPy on vähän tehokkaampi katalyytti kuin CuBiPy.¹³ CuBiPy on CuTerPy:ä tehokkaampi katalyytti intermolekulaarisen nukleofiilin tarvitsevien yhdisteiden, kuten cAMP:n⁶¹ (**3**) ja dinukleosidiligofosfaattien⁶² reaktioissa.¹³ Olosuhteet kuitenkin vaikuttavat CuBiPy:n tehokkuuteen, kuten yllä mainitaan. HPNP:n (**4**) hajoamisreaktion katalysoinnissa CuBiPy on tehokkaampi pH:ssa 6,5–7,5 ja CuTerPy on tehokkaampi pH:ssa 8–9,5.²⁶

Yhdisteiden **1a**, **2a**, ja **3–6** hajoamisreaktioiden suhteelliset nopeusvakiot on koottu taulukkoon 3 sekä verrattu CuBiPy:n ja CuTerPy:n keskinäistä tehokkuusjärjestystä. CuTerPy:n kohdalla ei ole nopeusvakioita BPNP:n reaktioille, koska katalyyttistä vaikutusta ei ole havaittu tähän asti.¹⁴ Taulukon 3 tulosten perusteella näyttäisi siltä, että katalyyttien keskinäiseen paremmuusjärjestykseen vaikuttaa sekä lähtevän ryhmän, että nukleofiilin ominaisuudet.

Taulukko 3. CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalyyttinen tehokkuus (k_{rel}) suhteessa substraattien katalysoimattomaan reaktioon.

substraatti	olosuhteet	$k_{rel}(\text{CuTerPy}) / \text{s}^{-1}$	$k_{rel}(\text{CuBiPy}) / \text{s}^{-1}$	$k_{rel} / k_{rel} (\text{CuTerPy} / \text{CuBiPy})$	viite
BDNPP (6)	pH 5,0; 25 °C	$1,8 \times 10^{-1}$	–	–	63
BPNP (5)	pH 6,5; 75 °C	–	150 ^a	–	60
HPNP (4)	pH 7,0; 25 °C	51,79 ^b	144,36 ^b	0,36	26
cAMP (3)	pH 7,5; 20 °C	1353,3 ^b	2273,3 ^b	0,60	61
UPNP (2a)	pH 6,5; 25 °C	179 ^c	116 ^c	1,53	13
3',5'-UpU (1a)	pH 6,6; 90 °C	2164 ^c	291 ^c	7,44	13

^a[Katalyytti] = 1 mM. ^b[Katalyytti] = 2 mM. ^c[Katalyytti] = 10 mM.

1.6 Työn tarkoitus

Nukleofiilin ominaisuuksia ei ole tutkittu niin paljon kuin lähtevän ryhmän ominaisuuksia.¹⁹ Tämän tutkimuksen kohteena oli erilaisten fosfodiesterisidosten pilkkoutuminen ja kahden kuparipyridiylidisteen toimintamekanismit. Tutkimukseen valittiin RNA-malliyhdisteet, joilla on sama lähtevä ryhmä ja erilainen nukleofiili. Malliyhdisteinä käytettiin BPNP:tä (5), HPNP:tä (4) ja UPNP:tä (2a) ja samoissa olosuhteissa mitattujen tuloksien avulla verrattiin erilaisia nukleofiilejä. CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalyyttisiä ominaisuuksia tutkittiin UPNP:n, HPNP:n ja BPNP:n hajoamisreaktioissa eri olosuhteissa. Tutkimusta varten UPNP syntetisoitiin suojatusta uridiinista ja BPNP hankittiin kaupallisesti. Substraattien hajoamisreaktioista mitattiin nopeusvakiot ja selvitettiin kertaluvut katalyyttikonsentraation suhteen.

2 Kokeelliset menetelmät

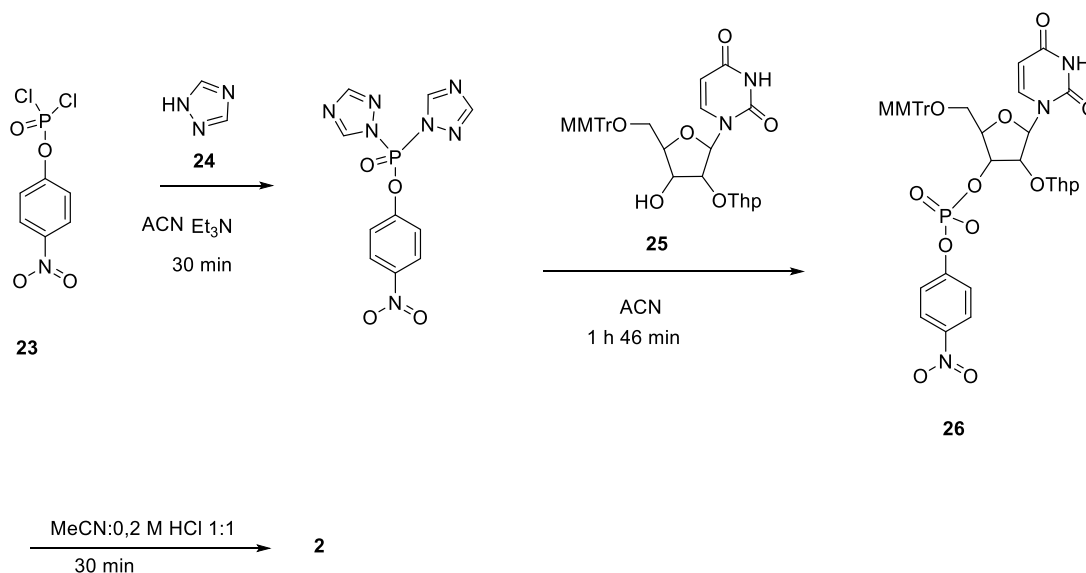
2.1 Uridiini 3'-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatin synteesi

UPNP:n (2a) tutkimista varten valmistettiin suojattua uridiinia, joka fosforyloitiin kuivissa olosuhteissa. Fosforyloinnin jälkeen suojattu UPNP uutettiin ja haihdutettiin kuiviin. Välituotteen puhdistus tehtiin silikageelikromatografisesti, minkä jälkeen kuivattu välituote analysoitiin massaspektrometrisesti. Seuraavaksi suojattu UPNP pestiin ja kuivattiin. Lopuksi poistettiin

suojaryhmät, tuote haihdutettiin pienempään tilavuuteen ja analysoitiin massaspektrometrisesti. Synteesi on esitetty kaaviossa 5.

2.1.1 Fosforylointi

Fosforylointia varten sekoitettiin 0,6052 g (2,36 mmol) (*p*-nitrofenyyli)fosforodikloridaattia (**23**), 0,3205 g (4,64 mmol) 1,2,4-triatsolia (**24**) ja 1,14 ml (8,16 mmol) trietyyliamiinia 15 ml:ssa asetonitriliä 30 minuutin ajan, jotta kloorisubstituentit korvautuisivat 1,2,4-triatsoliryhmillä. Näin fosforodikloridaatti ei muodostaisi dimeeriä kahden nukleosidin kanssa niin helposti. Reaktion lopussa seos oli kellertävä ja sisälsi paljon valkoista trietyyliammoniumsakkaa, joka poistettiin imusuodattamalla seos suoraan keittopulloon, jossa oli 0,988 g (1,67 mmol) 5'-O-(4-metoksitriityyli)-2'-O-tetrahydropyranyyliuridiinia (**25**) 3 ml:ssa asetonitriliä.



Kaavio 5. UPNP:n synteesi.

Fosforylointireaktion annettiin käydä 1 tunti 46 minuuttia ja seosta sekoitettiin magneettisekoittajalla. Reaktion loputtua seokseen lisättiin 35 ml 1,0 M $\text{Et}_3\text{NHOOCCH}_3$ -liuosta, joka valmistettiin etaanihaposta ja trietyyliamiinista, ja sekoitettiin 10 minuuttia. Seosta uutettiin dikloorimetaanilla ($3 \times 20 \text{ ml}$), kunnes orgaaninen faasi jäi värittömäksi. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin natriumsulfaatilla, joka poistettiin imusuodattamalla, ja seos haihdutettiin alipaineessa. Suojattu uridiini 3'-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatti (**26**) kuivattiin vakuumieksikaattorissa.

Tuote **26** puhdistettiin silikageeligromatografisesti ja ajoliuksena käytettiin CH_2Cl_2 -EtOH-gradienttia (3–20 % EtOH ja 1 % Et_3N). Kolme eri fraktiota kerättiin talteen ja haihdutettiin kuiviin. Fraktiot analysoitiin massaspektrometrisesti ja eluenttina käytettiin ACN:H₂O-gradienttia (20–80 % ACN).

Puhdistettu tuote **26** liuotettiin 15 ml:aan dikloorimetaania ja pestiin 0,1 M natriumvetykarbonaattiliuoksella (2 × 11 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla, joka imusuodatettiin pois, ja seos haihdutettiin alipaineessa. Tuote **26** kuivattiin vakuumieksikaattorissa. Tuotteen **26** massa oli 0,61 g (45,6 %). Tuotteesta mitattiin ESI-MS (Liite 1) ja ¹H-NMR (Liite 2).

ESI-MS: [M-H]⁻ = 800,2 g/mol.

¹H-NMR: δ_H = 1,50–1,75 (6H, Thp); 3,22–3,48 (4H, H5' & Thp); 3,80 (3H, MMTr); 4,06 (1H, H4'); 4,31 (1H, H2'); 4,40 (1H, H3'); 4,89 (1H, Thp) 5,38 (2H, Ur-H); 6,00 (1H, H1'); 6,97 (2H, MMTr); 7,29–7,45 (16H, MMTr & NO₂Ph) ; 7,74 (1H, Ur-H); 11,43 (1H, Ur-NH).

2.1.2 Suojaryhmien poisto ja pH:n säätö

Suojaryhmät irrotettiin liuottamalla 0,1099 g (0,137 mmol) tuotetta **26** 10 ml:aan 0,2 M HCl:n ja ACN:n seokseen (1:1) ja sekoitettiin 30 minuuttia. Sitten asetonitriili haihdutettiin alipaineessa. Liuosta uutettiin hiilitetrakloridilla (2 × 5 ml) irronneiden suojaryhmien poistamiseksi, minkä jälkeen orgaanisen liuottimen jäännökset haihdutettiin. Vesiliuoksen pH säädettiin 1,0 M natriumasetaatiliuoksella arvoon 5 ja haihdutettiin pienempään tilavuuteen. UPNP-liuoksen massa oli 0,105 g, (172 % epäpuhtauksineen). UPNP:stä mitattiin ESI-MS (Liite 3) ja ³¹P-NMR (Liite 4). Tuotetta **2a** säilytettiin -80 °C lämpötilassa.

ESI-MS: [M-H]⁻ = 444,04 g/mol.

³¹P-NMR: δ_P = -6,02 (P-O₄⁻).

2.2 Kineettiset mittaukset

Fosfodiesterien hajoamista voidaan tutkia eri menetelmillä, kuten UV-Vis -spektroskopiolla, HPLC:llä, NMR:llä ja MALDI-TOF-MS:llä.^{64,65} HPLC:llä voidaan tutkia pieniä malliyhdisteitä, kun taas DNA tai RNA-oligomeerien tutkimiseen tarvitaan fragmenttien korkealaatuista erottelua esimerkiksi MALDI-TOF-MS:llä.⁶⁴ Oligomeerien hajotessa syntyy niin monta fragmenttia, että ne on vaikea erottaa, mutta korkealaatuisella massalaitteella voidaan analysoida hajoamismekanismia tarkemmin kuin HPLC:llä. UPNP (**2a**), HPNP (**4**) ja BPNP (**5**) ovat niin pieniä, ettei niistä muodostu kuin 4-nitrofenolaatin, syklisen fosfaatin, fosfomonoesteri-isomeerien ja katalyytti-fosforaatti -kompleksien fragmentit, jotka erottuvat hyvin HPLC:llä.^{48,60,65}

UPNP:n, HPNP:n ja BPNP:n reaktiivisuutta tutkittiin olosuhteisiin ja katalyyttiin nähden.

Tutkimuksessa suoritettiin sarja kineettisiä mittauksia pH:ssa 6, 7 ja 8 vaihtelevilla katalyytin

konsentraatioilla. Reaktiolämpötila valittiin substraatin reaktiivisuuden perusteella. Näytteitä pyrittiin ottamaan kymmenen kappaletta ja reaktioita seuraamaan kahden puoliintumisajan verran.

2.2.1 Reaktioliuosten valmistus

Reaktioliuosten valmistukseen valittiin joko 4-morfoliinobutaanisulfonihappo (MOBS) tai 2-hydoksi-3-morfoliinopropaanisulfonihappo (MOPSO) riippuen puskurin pKa:sta olosuhteisiin nähden. Liitteen 5 taulukoissa on laskettu reaktioliuoksissa tarvittavat puskurien konsentraatiot Henderson-Hasselbalch-yhtälön (1) mukaisesti. Reaktioliuosten katalyyttikonsentraatiot olivat 2,0 mM, 4,0 mM, 6,0 mM, 8,0 mM ja 10,0 mM. Reaktioliuosten ionivahvuus säädettiin arvoon 0,1 M lisäämällä natriumnitraattia yhtälöiden 2–4 mukaan. Liitteen 6 taulukoissa on ilmoitettu puskuriliuosten valmistukseen tarvittavat tilavuudet. Natriumhydroksidin kantaliuoksen konsentraatio oli 1 M, katalyytin 50 mM, natriumasetaatin 1 M ja puskurien 0,5 M. Reaktioliuosten pH tarkistettiin pH-elektrodilla ja tarvittaessa lisättiin pieniä määriä 1 M natriumhydroksidia tai 1 M typpihappoa.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log\left(\frac{\text{emäs}}{\text{happo}}\right) \quad (1)$$

$$I(\text{katalyytti}) = \frac{1}{2}\sum(c \times i) = \frac{1}{2}(c \times 2^2 + 2 \times c \times (-1^1)) \quad (2)$$

$$c_{\text{NaNO}_3} = I_{\text{NaNO}_3} = 100 \text{ mM} - I_{\text{Cu-kompleksi}} - I_{\text{puskuri}} \quad (3)$$

$$V_1 = \frac{n}{c_1} = \frac{c_2 \times V_2}{c_1} \quad (4)$$

2.2.2 HPLC-mittaukset

Reaktioiden näytteet analysoitiin PerkinElmer Flexar-HPLC:llä käyttäen ODS Hypersil™-kolonna (150 × 4.6 mm, partikkelin koko 5 μm). Eluenttina käytettiin 50 mM natriumasetaattipuskuria ja asetonitriiliä. Natriumasetaattipuskurin pH oli 4,3 ja sen ionivahvuus säädettiin arvoon 0,1 M ammoniumkloridilla. Eluentin virtausnopeus oli 1,5 ml/min. UV-detektorin aallonpituus oli 280 nm UPNP:n mittauksissa ja 300 nm BPNP:n mittauksissa. Mittauksien ajo-ohjelmat on kuvattu taulukoissa 4–6.

Taulukko 4. HPLC-ohjelman gradientti HPNP:n mittauksissa.

vaihe / min	natriumasetaatti / %	asetonitriili / %
3	95	5
4	70	30
4	70	30
2	95	5

Taulukko 5. HPLC-ohjelman gradientti UPNP:n mittauksissa.

vaihe / min	natriumasetaatti / %	asetonitriili / %
3	93	7
5	75	25
3	75	25
2	93	7

Taulukko 6. HPLC-ohjelman gradientti BPNP:n mittauksissa.

vaihe / min	natriumasetaatti / %	asetonitriili / %
3	85	15
5	85	15
20	35	65
3	85	15

2.2.3 Nopeusvakioiden laskeminen

HPLC:n tuloksista otettiin lähtöaineen piikin pinta-ala, sillä se on suoraan verrannollinen lähtöaineen konsentraatioon. Tuloksista piirrettiin kuvaaja laskemalla pinta-alan luonnollinen logaritmi ajan funktiona. Kuvaajan laskemisessa sovellettiin integroitua 1. kertaluvun nopeusyhtälöä (Yhtälö 6). Nopeusvakio saatiin kuvaajaan piirretyn suoran kulmakertoimen käänteisluvusta.

$$\ln(A) = -kt + \ln(A_0), \text{ missä } A = \text{pinta-ala ja } A_0 = \text{pinta-ala ajan hetkellä } t = 0. \quad (6)$$

3 Tulokset ja niiden tarkastelu

3.1 2-hydroksipropyyli-(p-nitrofenyyli)fosfaatin reaktion tulokset

HPNP:n (4) katalysoidun reaktion nopeusvakiot on kerätty taulukkoon 7 ja verrattu katalysoimattomaan reaktioon. CuTerPy:n suhteelliset nopeusvakiot HPNP:n katalysoimattomaan reaktioon verrattuna eivät juuri muutu eri olosuhteissa. pH:ssa 6 2 mM CuTerPy-liuos tehostaa HPNP:n pilkkoutumista noin 14-kertaisesti ja 10 mM noin 60-kertaisesti. pH:ssa 7 ja 8 hajoamisreaktio tehostuu noin kymmenenkertaisesti 2 mM CuTerPy:ssä. 10 mM CuTerPy tehostaa HPNP:n reaktiota noin 50-kertaisesti pH:ssa 7 ja 56-kertaisesti pH:ssa 8.

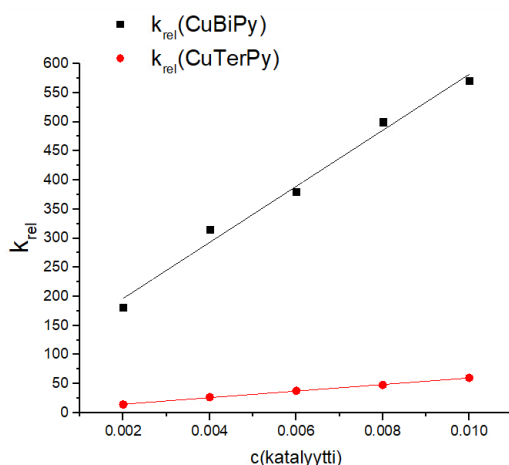
CuBiPy:llä katalysoidun HPNP:n reaktion suhteellinen nopeusvakio pienenee sitä enemmän, mitä suurempi on pH (Kuvaajat 2–4). 2 mM CuBiPy-liuos katalysoi HPNP:n hajoamista noin 180-kertaisesti ja 10 mM CuBiPy noin 570-kertaisesti pH:ssa 6. pH:ssa 7 vastaavasti 2 mM CuBiPy tehostaa hajoamisreaktiota 72-kertaisesti ja 10 mM 191-kertaisesti. pH:ssa 8 katalyyttinen tehokkuus laskee jo merkittävästi, sillä 2 mM CuBiPy katalysoi HPNP:n reaktiota 11-kertaisesti ja 10 mM CuBiPy 35-kertaisesti.

Taulukko 7. CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalysoiman HPNP:n reaktion nopeusvakiot.^{a,b}

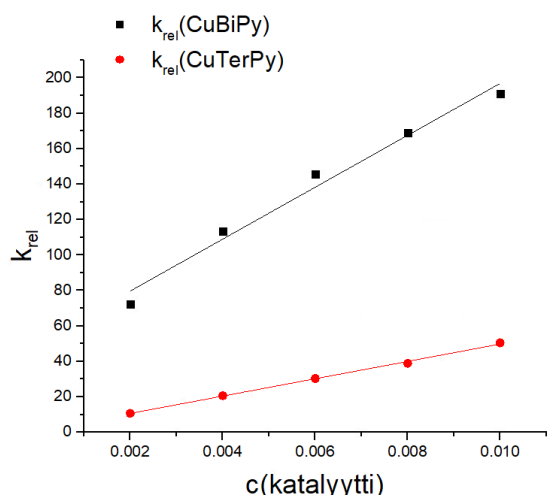
c(CuTerPy) / mM	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 6, 90 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 7, 50 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 8, 25 °C)
10	39 ± 2	3,13 ± 0,08	2,87 ± 0,09
8	31 ± 1	2,41 ± 0,02	2,04 ± 0,08
6	24,2 ± 0,6	1,88 ± 0,02	1,53 ± 0,05
4	17,1 ± 0,4	1,28 ± 0,02	1,09 ± 0,02
2	9,1 ± 0,5	0,660 ± 0,009	0,51 ± 0,02
c(CuBiPy) / mM	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 6, 90 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 7, 50 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 8, 25 °C)
10	365 ± 30	11,84 ± 0,08	1,90 ± 0,07
8	320 ± 4	10,5 ± 0,1	1,48 ± 0,03
6	243 ± 5	9,03 ± 0,06	1,29 ± 0,02
4	202 ± 2	7,04 ± 0,06	0,82 ± 0,04
2	116 ± 4	4,48 ± 0,05	0,620 ± 0,009
0	0,64 ± 0,04	0,062 ± 0,004	0,053 ± 0,003

^a Ionivahvuus on säädetty 1 M NaNO₃:lla arvoon 0,1 M. ^b k -arvot on ln(pinta-ala) vs. t (s) -kuvaajien kulmakertoimesta.

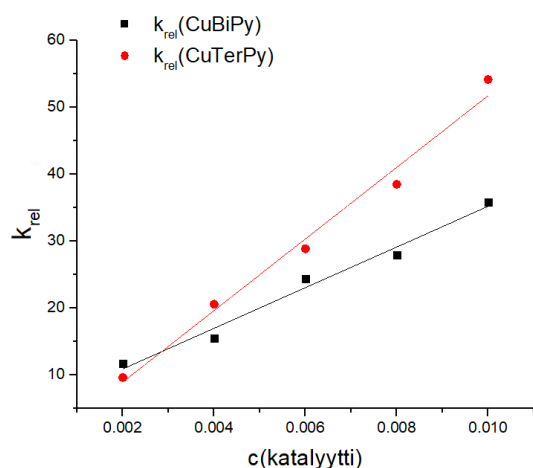
Katalyyttien keskinäiset eroavaisuudet tehokkuudessa HPNP:n reaktion suhteen riippuvat olosuhteista. CuBiPy on tehokkaampi pH:ssa 6 ja 7 ja CuTerPy on vähän tehokkaampi pH:ssa 8 (Kuvaajat 2–4). pH:ssa 6 10 mM CuBiPy on yli yhdeksän kertaa tehokkaampi kuin CuTerPy ja, kun katalyytin konsentraatio on 2 mM, erotus on yli 12-kertainen. pH:ssa 7 katalyyttien keskinäinen eroavaisuus aktiivisuudessa on yli kuusikertainen, kun [katalyytti] = 2 mM, ja enää noin kolminkertainen, kun [katalyytti] = 10 mM. pH:ssa 8 katalyytit ovat melkein yhtä tehokkaita, sillä 2 mM CuBiPy on 1,2-kertaa tehokkaampi ja 10 mM CuTerPy on 1,5-kertaa tehokkaampi kuin vastaava määrä toista katalyyttiä.



Kuvaaja 2. CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalysoiman HPNP:n reaktion suhteellinen nopeusvakio ($k_{rel} = k_{obs} / k_0$) katalysoimattomaan HPNP:n hajoamisreaktioon pH:ssa 6 vs. katalyytin konsentraatio.



Kuvaaja 3. CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalysoiman HPNP:n reaktion suhteellinen nopeusvakio ($k_{rel} = k_{obs} / k_0$) katalysoimattomaan HPNP:n hajoamisreaktioon pH:ssa 7 vs. katalyytin konsentraatio.



Kuvaaja 4. CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalysoiman HPNP:n reaktion suhteellinen nopeusvakio ($k_{rel} = k_{obs} / k_0$) katalysoimattomaan HPNP:n hajoamisreaktioon pH:ssa 8 vs. katalyytin konsentraatio.

Tuloksiin voi vaikuttaa HPNP:n rakenne sekä katalyyttien ominaisuudet. HPNP:n rakenne on avoketjuinen ja nukleofiilin etäisyys fosfaattiin vaihtelee rakenteen kääntyessä, mikä tekee hajoamisreaktiosta hitaamman kuin jos rakenne olisi syklinen. Tällaisen nukleofiilin kohdalla ja alemmassa pH:ssa CuBiPy on tehokkaampi katalyytti kuin CuTerPy, kuten yllä todetaan. CuBiPy:n dimeroituminen²⁶ heikentää katalyytin tehokkuutta, mutta HPNP:n pilkkoutumisen nopeusvakiot ja kertalukuvut korkeammassa pH:ssa eivät suoraan selity CuBiPy:n dimeroitumisella. CuTerPy:n ja CuBiPy:n erot katalyyttisessä tehokkuudessa voi selittyä myös sillä, että vesiligandin pKa on pienempi CuBiPy:llä.¹⁹ pKa -arvot CuBiPy:lle on 6,6 ja CuTerPy:lle on 8,1.²⁵ Tämän työn tulokset eivät kuitenkaan riitä varmistamaan dimeroitumisen tai pKa:n vaikutusta reaktioon.

3.2 Uridiini 3'-(*p*-nitrofenyyli)fosfaatin reaktion tulokset

UPNP:n (**2a**) katalyyttisen hajoamisen nopeusvakiot on kerätty taulukkoon 8 ja verrattu katalysoimattomaan reaktioon. UPNP:tä tutkittiin 25 °C:ssa pH:ssa 6–8, mutta pH:ssa 8 reaktiot osoittautuivat niin nopeiksi, että näytteenotto oli mahdollista ainoastaan 2 mM CuBiPy:ssä. pH:ssa 8 reaktioita seurattiin 0 °C:ssa asteessa. pH:ssa 6 CuTerPy katalysoi UPNP:n reaktiota noin kuusikertaisesti, kun [CuTerPy] = 2 mM, ja noin 41-kertaisesti, kun [CuTerPy] = 10 mM. pH:ssa 7 CuTerPy:n katalyyttinen tehokkuus pysyy suunnilleen samana kuin pH:ssa 6, sillä 10 mM katalyyttiä tehostaa reaktiota 42-kertaisesti, ja 2 mM katalyyttiä yli 13-kertaisesti. CuTerPy:n tehokkuus laskee hieman pH:ssa 8, sillä 2 mM katalyyttiä katalysoi UPNP:n reaktiota kuusikertaisesti ja 10 mM katalyyttiä noin 14-kertaisesti.

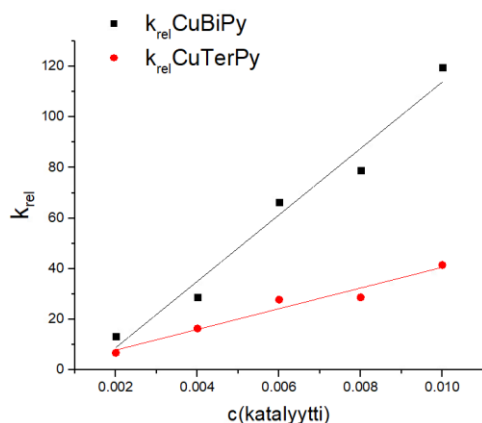
CuBiPy:n katalyyttinen tehokkuus UPNP:n hajoamisessa laskee pH:n noustessa. 2 mM CuBiPy katalysoi UPNP:n pilkkoutumista 13-kertaisesti ja 10 mM lähes 120-kertaisesti pH:ssa 6. pH:ssa 7 taas 2 mM CuBiPy katalysoi UPNP:n reaktiota noin yhdeksänkertaisesti ja 10 mM katalyyttiä 24-kertaisesti. pH:ssa 8 CuBiPy:n katalysoima reaktio tehostuu enää alle kuusikertaisesti, kun [CuBiPy] = 10 mM ja kaksinkertaisesti, kun [CuBiPy] = 2 mM.

Taulukko 8. CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalysoiman UPNP:n reaktion nopeusvakiot.^{a,b}

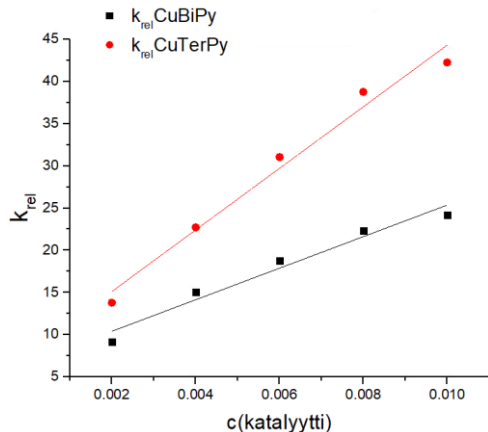
CuTerPy / mM	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 6, 25 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 7, 25 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 8, 0 °C)
10	81 ± 2	848 ± 60	252 ± 30
8	56 ± 3	778 ± 50	213 ± 6
6	54 ± 2	623 ± 50	214 ± 5
4	32 ± 1	456 ± 60	87 ± 20
2	13,1 ± 0,4	277 ± 20	104 ± 6
CuBiPy / mM	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 6, 25 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 7, 25 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 8, 0 °C)
10	233 ± 20	485 ± 20	103 ± 20
8	154 ± 5	448 ± 20	81 ± 4
6	129 ± 6	377 ± 6	58 ± 6
4	56,3 ± 4	302 ± 20	56 ± 2
2	26,0 ± 0,8	183 ± 8	37 ± 3
0	1,95 ± 0,02	20,1 ± 0,2	18,0 ± 0,4
CuBiPy / mM		$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 7, 50 °C)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (pH 8, 25 °C)
2	–	1369 ± 80	3097 ± 200

^aIonivahvuus on säädetty 1 M NaNO₃:lla arvoon 0,1 M. ^b k -arvot on ln(pinta-ala) vs. t (s) -kuvaajien kulmakertoimesta.

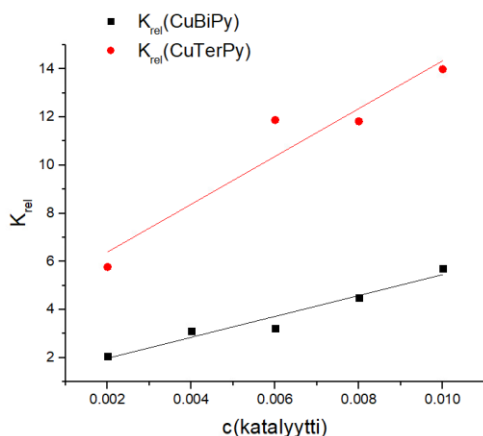
Katalyyttien tehokkuus UPNP:n reaktiossa ei paljoa eroa toisistaan, kuten nähdään kuvaajista 5–7. Tulokset sopivat yhteen aiemman tutkimuksen kanssa.¹³ Tutkimuksessa pH:ssa 6,5 ja 25 °C UPNP:n reaktio tehostuu 10 mM CuBiPy:ssä 116-kertaisesti ja 10 mM CuTerPy:ssä 179-kertaisesti. pH:ssa 6 CuBiPy on siis 2–3 kertaa tehokkaampi kuin CuTerPy, mutta jo pH:ssa 6,5 CuTerPy on puolitoista kertaa tehokkaampi. pH:ssa 7 CuTerPy:n ja CuBiPy:n keskinäiset eroavaisuudet katalyyttisessä tehokkuudessa lisääntyvät hieman alempaan pH:n verrattuna ja pH:ssa 8 CuTerPy on noin kaksi ja puoli kertaa tehokkaampi kuin CuBiPy.



Kuvaaja 5. CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalysoiman UPNP:n reaktion suhteellinen nopeusvakio ($k_{rel} = k_{obs} / k_0$) katalysoimattomaan UPNP:n hajoamisreaktioon pH:ssa 6 vs. katalyyttin konsentraatio.



Kuvaaja 6. CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalysoiman UPNP:n reaktion suhteellinen nopeusvakio ($k_{rel} = k_{obs} / k_0$) katalysoimattomaan UPNP:n hajoamisreaktioon pH:ssa 7 vs. katalyyttin konsentraatio.



Kuvaaja 7. CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalysoiman UPNP:n reaktion suhteellinen nopeusvakio ($k_{rel} = k_{obs} / k_0$) katalysoimattomaan UPNP:n hajoamisreaktioon pH:ssa 8 vs. katalyytin konsentraatio.

UPNP:n reaktion tuloksiin voi vaikuttaa substraatin ja katalyyttien ominaisuudet. UPNP:n riboosi mahdollistaa sen, että nukleofiili pysyy lähellä fosfaattia. Niin sanotusti hyvällä nukleofiilillä ja hyvällä lähtevällä ryhmällä CuTerPy ja CuBiPy ovat suunnilleen yhtä tehokkaita katalyyttejä. Kuten HPNP:n kohdalla, myös UPNP:n kineettisten mittausten tulokset voivat osittain selittyä CuBiPy:n dimeroitumisella tai katalyyttien hydroksiligandien pK_a -arvoilla.

3.3 Reaktioiden kertaluvut ja β_{LG} -arvot

HPNP:n (4) ja UPNP:n (2a) pilkkoutumisreaktioiden nopeusvakiosta ja katalyytin konsentraatiosta voidaan piirtää suora $\log(k)$ vs. $\log(c)$ (Liite 7). Suoran kulmakerroin on katalyytin kertaluku kyseisessä reaktiossa, mikä kertoo muun muassa sen, missä suhteessa katalyytti reagoi substraatin kanssa. Jos esimerkiksi kertaluku on noin 1, katalyytin ja substraatin suhde on todennäköisesti 1:1. Kertaluvun ollessa noin 0,5 katalyytti mahdollisesti reagoi substraatin kanssa 2:1-suhteen, mikä voi kertoa katalyytin olevan dimeeri.

HPNP:n reaktion kertaluvut voivat kertoa CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalyysimekanismeista. Taulukon 9 tulosten mukaan CuTerPy:n katalysoiman HPNP:n hajoamisreaktion kertaluvut ovat 0,88–1,04, kun taas CuBiPy:n katalysoiman reaktion kertaluvut ovat 0,60–0,71. CuBiPy:n ja substraatin suhde voi siis olla muuta kuin 2:1 tai 1:1. Kertaluvut voivat toisaalta selittyä sillä, että suurin osa katalyytistä reagoi 2:1-suhteessa HPNP:n kanssa. CuTerPy:stä suurin osa reagoi substraatin kanssa 1:1-suhteessa pH:ssa 6, ja todennäköisesti kaikki katalyytti reagoi 1:1-suhteessa pH:ssa 7 ja 8.

Taulukko 9. CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalysoiman HPNP:n reaktion kortaluvut eri olosuhteissa.

katalyytti	pH 6	pH 7	pH 8
CuTerPy	0,88 ± 0,02	0,96 ± 0,02	1,04 ± 0,05
CuBiPy	0,71 ± 0,04	0,60 ± 0,02	0,68 ± 0,04

UPNP:n reaktion kortaluvut vaihtelevat eri olosuhteissa (Taulukko 10). Kortaluvut CuTerPy:lle ja CuBiPy:lle ovat 1,10 ja 1,37 pH:ssa 6, mikä voi selittyä sillä, että katalyytin ja substraatin suhde reaktiossa on osittain 1:1 ja osittain 1:2. CuBiPy:n katalysoiman reaktion kortaluku on suurempi kuin CuTerPy:n katalysoiman, joten mahdollisesti suurempi osa katalyyttiä reagoi substraatin kanssa 1:2-suhteen kuin CuTerPy:n reaktiossa. pH:ssa 7 katalyyttien kortaluvut ovat 0,63 ja 0,71, joten osa katalyystä voi reagoida substraatin kanssa 1:1-suhteessa ja osa 2:1-suhteessa, mutta CuTerPy:stä suurempi osa voi reagoida 1:1-suhteessa verrattuna reaktioon CuBiPy:n kanssa. pH:ssa 8 reaktioiden kortaluvut ovat lähellä arvoa 0,50, mikä voisi tarkoittaa, että suurin osa katalyytistä reagoi 2:1-suhteessa substraatin kanssa ja pieni osa 1:1-suhteessa.

Taulukko 10. CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalysoiman UPNP:n reaktion kortaluvut eri olosuhteissa.^a

katalyytti	pH 6	pH 7	pH 8
CuTerPy	1,1 ± 0,2	0,71 ± 0,04	0,54 ± 0,06 ^a
CuBiPy	1,4 ± 0,1	0,63 ± 0,04	0,6 ± 0,1

^aReaktio 4 mM CuTerPy-liuoksella otettiin pois suoran laskemisesta.

Taulukon 11 β_{LG} -arvojen perusteella katalyytit voivat vaikuttaa substraatin protonoitumiseen.¹⁹ Uridiinifosfodiesterien ei-katalysoidun reaktion β_{LG} -arvo on sama kuin CuTerPy:n katalysoiman, joten katalyytti ei vaikuta esimerkiksi UPNP:n protonoitumisen asteeseen kummassakaan reaktiovaiheessa. CuBiPy:n katalysoiman uridiinifosfodiesterien hajoamisreaktion β_{LG} -arvo on negatiivisempi kuin ei-katalysoidun reaktion, joten katalyytti voi tehostaa joko nukleofiilin deprotonoitumista tai lähtevän ryhmän protonoitumista. 2-hydroksipropyyli fosfodiesterien, kuten HPNP:n, kohdalla CuTerPy:n katalysoiman reaktion β_{LG} -arvo on negatiivisempi kuin katalysoimattoman reaktion. CuBiPy:n katalysoiman reaktion β_{LG} -arvo on negatiivisempi kuin CuTerPy:n. HPNP:n reaktiossa siis kuparikompleksit mahdollisesti vaikuttavat protoninsiirtoon.

Taulukko 11. Uridiini ja 2-hydroksipropyyli fosfodiesterien pilkkoutumisen β_{LG} -arvot.

	β_{LG} (ei-kat.)	β_{LG} (CuBiPy)	β_{LG} (CuTerPy)
uridiini fosfodiesterit ^a	-0,7 ± 0,1	-0,9 ± 0,1	-0,7 ± 0,1
2-hydroksipropyyli fosfodiesterit ^b	-0,42 ± 0,01	-0,98 ± 0,05	-0,57 ± 0,01

^aLähteestä 12; pH 6,6; 25 °C. ^bLähteestä 18; pH 6,7; 90 °C.

3.4 Nukleofiilin vaikutus *p*-nitrofenyylifosfodiesterien katalyyttisiin reaktioihin

Fosfodiesterien katalyyttiseen hajoamiseen vaikuttaa eri substraattien erilaiset nukleofiilit. Jotta voitaisiin verrata HPNP:n, UPNP:n ja BPNP:n nukleofiilejä keskenään, substraattien tutkimista varten valittiin samat mittaolosuhteet. Ainoa olosuhde, jossa jokaista *p*-nitrofenyylifosfodiesteriä pystyttiin tutkimaan, on pH 7 ja 50 °C. UPNP reagoi kuitenkin hyvin nopeasti kyseisissä olosuhteissa, joten reaktio seuranta suoritettiin vain 2 mM katalyyttiä. Taulukkoon 12 on koottu mittaustulokset, joista nähdään, että CuBiPy on 27 kertaa tehokkaampi katalyytti BPNP:n kohdalla ja kuusi kertaa tehokkaampi HPNP:n kohdalla kuin CuTerPy. UPNP:n kohdalla CuTerPy on kaksi kertaa tehokkaampi kuin CuBiPy.

Taulukko 12. CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalysoimien substraattien reaktioiden nopeusvakiot.

substraatti	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (CuBiPy)	$k / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (CuTerPy)	k (CuBiPy/CuTerPy)
UPNP (2a)	1369 ± 80	2907 ± 80	0,470
HPNP (4)	$4,48 \pm 0,05$	$0,660 \pm 0,009$	6,79
BPNP (5)	$0,34 \pm 0,03$	$0,0124 \pm 0,0004$	27,2

pH 7; 50 °C.

Taulukon 12 tulosten perusteella HPNP:n, UPNP:n ja BPNP:n reaktionopeuteen vaikuttaa katalyytin ominaisuuksien lisäksi nukleofiilin ominaisuudet. Erilaiset nukleofiilit puolestaan vaikuttavat kuparikompleksien keskinäiseen tehokkuusjäestykseen. Katalyytin paremmuus toiseen nähden riippuu siis olosuhteiden lisäksi substraatin hyvän/huonon nukleofiilin ja hyvän/huonon lähtevän ryhmän suhteesta, kuten on aiemmissa tutkimuksissa todettu.^{13,19} CuBiPy on katalyyteistä tehokkaampi katalysoimaan substraatteja, joilla on huono nukleofiili ja hyvä lähtevä ryhmä. BPNP:n ja HPNP:n transesterifikaatiossa nukleofiilinen hyökkäys on reaktion hitain vaihe. UPNP:llä taas nukleofiilinen hyökkäys ja lähtevän ryhmän irtoaminen ovat yhtä nopeita vaiheita ja siksi katalyytit eivät juuri eroa toisistaan katalyyttisellä tehokkuudellaan.

Taulukon 11. β_{LG} -arvot ja tämän tutkimuksen tulokset tukevat teoriaa siitä, että CuBiPy:n ja CuTerPy:n katalyysimekanismit eroavat toisistaan kyseisten fosfodiesterien reaktiossa.¹⁹ Arvoista ei voi kuitenkaan päätellä, millä mekanismilla CuBiPy tai CuTerPy katalysoi kunkin substraatin. β_{LG} -arvojen perusteella voisi kuitenkin päätellä esimerkiksi, että UPNP:n tapauksessa CuTerPy:n kohdalla kyseessä olisi elektrofiilinen katalyyssi, sillä katalyytti ei vaikuta substraatin protoninsiirtoon kummassakaan reaktion vaiheessa. CuBiPy:n voisi taas ajatella käyttävän yleistä tai spesifistä emäskatalyyysiä, sillä β_{LG} -arvojen perusteella uridiinifosfodiesterien reaktiossa CuBiPy vaikuttaa protoninsiirtoon nukleofiilisessä hyökkäyksessä. CuBiPy todennäköisesti ei vaikuta lähtevän ryhmän irtoamiseen, koska *p*-nitrofenyyli-ryhmä ei tarvitse protonaatiota kuten jotkut huonommat lähtevät

ryhmät. Toisin kuin nukleosidifosfodiesterit, HPNP tarvitsee katalyyttiä koordinoimaan nukleofiilin ja elektrofiilin lähemmäs toisiaan reaktiivisuuden lisäämiseksi. HPNP-metalliligandikompleksi voi nopeuttaa reaktiota edelleen 2-OH-ryhmän deprotonaatiolla (Taulukko 11), joten tämän substraatin tapauksessa voi olla kyse yleisestä emäskatalyyysistä, mutta nukleofiilistä katalyyysiä ei voi sulkea pois. BPNP puolestaan tarvitsee katalyytin hydroksiligandia nukleofiiliseen hyökkäykseen. Nukleofiilistä hydroksiligandia ei tarvitse deprotonoida, eli kyseessä on vain nukleofiilinen katalyyysi. CuBiPy on mahdollisesti parempi katalyytti HPNP:n ja BPNP:n kohdalla, sillä sen hydroksiligandi on vahvempi emäs kuin CuTerPy:n hydroksiligandi.

4 Yhteenveto

Tässä tutkimuksessa kerätty data lisää tietoa HPNP:n, UPNP:n ja BPNP:n katalysoimattomista hajoamisreaktioista sekä metallikompleksien katalysoimista reaktioista. Tulokset sopivat yhteen aiemman tutkimuksen kanssa sekä antavat viitteitä CuBiPy:n dimeroitumisen vaikutuksista katalyyttiseen tehokkuuteen ja nukleofiilin vaikutuksesta *p*-nitrofenyylifosfodiesterien metallikatalyyttiseen pilkkoutumiseen.

CuBiPy:ä ja CuTerPy:ä verrattiin HPNP:n ja UPNP:n reaktioille neutraaleissa olosuhteissa. Kuparikompleksien keskinäinen tehokkuusjärjestys muuttuu pH:n noustessa. CuTerPy on todettu olevan parempi katalyytti, kun malliyhdisteen transesterifikaation molemmat vaiheet ovat yhtä nopeita. Hyvällä lähtevällä ryhmällä ja huonolla nukleofiilillä nukleofiilinen hyökkäys on nopeutta rajoittava vaihe, kuten on HPNP:n ja BPNP:n tapauksessa, ja CuBiPy on tehokkaampi kuin CuTerPy. HPNP:n ja BPNP:n reaktionopeus riippuu merkittävästi katalyytin tehokkuudesta sekä liuoksen hydroksidi-ionin konsentraatiosta.

Nukleofiilien ominaisuuksista saatiin vain vähän dataa, sillä BPNP:n hajoamisreaktiosta mitattiin vain yksi nopeusvakio katalyyttiä kohden. Nukleofiilin vaikutusta fosfodiesterien hajoamiseen voitaisiin tutkia lisää esimerkiksi mittaamalla useamman eri *p*-nitrofenyylifosfodiesterin nopeusvakiot, joista voitaisiin koota nukleofiilin Brönsted-arvot, käyttämällä erilaisia metallikatalyyttejä tai tutkimalla toista yhdisteryhmää, jossa on sama lähtevä ryhmä ja erilaiset nukleofiilit. Lisäksi nopeusvakiot ja niistä saadut kertaluvut tai β_{LG} -arvot¹⁹ eivät riitä katalyyssimenetelmien päättelemiseen. *p*-nitrofenyylifosfaattien reaktion katalyyssimenetelmien päättely voisi varmistua, jos nopeusvakioiden lisäksi tutkittaisiin esimerkiksi substraattien protonoitumisastetta.

Lähteet

1. Cowan, J. A. & Yu, Z. Metal complexes promoting catalytic cleavage of nucleic acids – biochemical tools and therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **43**, 37–42 (2018).
2. Sigman, D. S., Graham, D. R., D'Aurora, V. & Stern, A. M. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline-cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J. Biol. Chem.* **254**, 12269–12272 (1979).
3. Anjomshoa, M. & Amirheidari, B. Nuclease-like metalloscissors: Biomimetic candidates for cancer and bacterial and viral infections therapy. *Coord. Chem. Rev.* **458**, 214417 (2022).
4. Mancin, F., Scrimin, P. & Tecilla, P. Progress in artificial metallonucleases. *Chem. Commun.* **48**, 5545–5559 (2012).
5. Marmion, C. J., McGivern, T. J. P. & Afsharpour, S. Copper complexes as artificial DNA metallonucleases: From Sigman's reagent to next generation anti-cancer agent? *Inorg. Chim. Acta* **472**, 12–39 (2018).
6. Yang, W. Nucleases: Diversity of structure, function and mechanism. *Q. Rev. Biophys.* **44**, 1–93 (2011).
7. Thompson, J. E., Kutateladze, T. G., Schuster, M. C., Venegas, F. D., Messmore, J. M. & Raines, R. T. Limits to Catalysis by Ribonuclease A. *Bioorg. Chem.* **23**, 471–481 (1995).
8. Usher, D. A., Erenrich, E. S. & Eckstein, F. Geometry of the First Step in the Action of Ribonuclease-A. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **69**, 115–118 (1972).
9. Usher, D. A., Richardson, D. I. J. & Eckstein, F. Absolute Stereochemistry of the Second Step of Ribonuclease Action. *Nature* **228**, 663–665 (1970).
10. Desbouis, D., Spiccia, L., Graham, B., Troitsky, I. P. & Belousoff, M. J. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. *Coord. Chem. Rev.* **256**, 897–937 (2012).
11. Smith, B. D. & O'Neil, E. J. Anion recognition using dimetallic coordination complexes. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 3068–3080 (2006).
12. Morrow, J. R. & Iranzo, O. Synthetic metallonucleases for RNA cleavage. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 192–200 (2004).

13. Mikkola, S., Korhonen, H., Koivusalo, T. & Toivola, S. There is no universal mechanism for the cleavage of RNA model compounds in the presence of metal ion catalysts. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 8324–8339 (2013).
14. Mikkola, S., Lönnberg, T. & Lönnberg, H. Phosphodiester models for cleavage of nucleic acids. *Beilstein J. Org. Chem.* **14**, 803–837 (2018).
15. Lönnberg, H., Järvinen, P. & Oivanen, M. Interconversion and Phosphoester Hydrolysis of 2',5'- and 3',5'-Dinucleoside Monophosphates: Kinetics and Mechanisms. *J. Org. Chem.* **56**, 5396–5401 (1991).
16. Breslow, R. & Xu, R. Quantitative Evidence for the Mechanism of RNA Cleavage by Enzyme Mimics. Cleavage and Isomerization of UpU by Morpholine Buffers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10705–10713 (1993).
17. Lönnberg, H. Structural Modifications as Tools in Mechanistic Studies of the Cleavage of RNA Phosphodiester Linkages. *Chem. Rec.* **22**, 1–17 (2022).
18. Mikkola, S., Williams, N. H. & Korhonen, H. The Mechanism of Cleavage and Isomerisation of RNA Promoted by an Efficient Dinuclear Zn²⁺ Complex. *Chem. Eur. J.* **18**, 659–670 (2012).
19. Mikkola, S., Koski, J. I., Poijärvi, E., Tulisalo, A. & Korhonen, H. The cleavage of RNA model compounds: The interplay between the nucleophile and the leaving group. *J. Phys. Org. Chem.* **38**, (2025).
20. Chin, J., Williams, N. H., Takasaki, B. & Wall, M. Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. *Acc. Chem. Res.* **32**, 485–493 (1999).
21. Mikkola, S., Korhonen, H. & Williams, N. H. β_{LG} values in mechanistic studies on the transesterification of RNA models and their application in a metal ion complex promoted transesterification. *J. Phys. Org. Chem.* **26**, 182–186 (2013).
22. Kosonen, M., Yousefi-Salakdeh, E., Strömberg, R. & Lönnberg, H. pH- and Buffer-Independent Cleavage and Mutual Isomerization of Uridine 2- and 3-Alkyl Phosphodiesters: Implications for the Buffer Catalyzed Cleavage of RNA. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1589–1595 (1998).
23. Mikkola, S., Stenman, E., Nurmi, K., Yousefi-Salakdeh, E., Strömberg, R. & Lönnberg, H. The mechanism of the metal ion promoted cleavage of RNA phosphodiester bonds involves a general acid catalysis by the metal aquo ion on the departure of the leaving group. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1619–1625 (1999).

24. Westheimer, F. H. Pseudo-Rotation in the Hydrolysis of Phosphate Esters. *Acc. Chem. Res.* **1**, 70–78 (1968).
25. Kirby, A. J. & Younas, M. The Reactivity of Phosphate Esters. Diester Hydrolysis. *J. Chem. Soc. B.* **78**, 510–513 (1970).
26. Hamilton, A. D. & Liu, S. Catalysis of phosphodiester transesterification by dinuclear Cu(II) complexes: The role of the second Cu(II) ion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 1779–1784 (1997).
27. Chin, J. & Takasaki, B. K. Synergistic Effect between La(III) and Hydrogen Peroxide in Phosphate Diester Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9337–9338 (1993).
28. Davis, A. M., Hall, A. D. & Williams, A. Charge Description of Base-Catalyzed Alcoholysis of Aryl Phosphodiester: A Ribonuclease Model. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5105–5108 (1988).
29. Postmus, C. Jr., Magnusson, L. B. & Craig, C. A. Coordination in Solutions. IV. Association Constants for 1:1 Complexes of Cu(II), Zn(II), Ca(II), La(III), and Y(III) with Anions of Salicylaldehydes. *Inorg. Chem.* **5**, 1154–1157 (1966).
30. Lönnberg, H., Kuusela, S. & Oivanen, M. Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by brønsted acids and bases. *Chem. Rev.* **98**, 961–990 (1998).
31. Kosonen, M., Youseti-Salakdeh, E., Strömberg, R. & Lönnberg, H. Mutual isomerization of uridine 2'- and 3'-alkylphosphates and cleavage to a 2',3'-cyclic phosphate: the effect of the alkyl group on the hydronium- and hydroxide-ion-catalyzed reactions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 2661–2666 (1997).
32. Kellerman, D. L., York, D. M., Piccirilli, J. A. & Harris, M. E. Altered (transition) states: mechanisms of solution and enzyme catalyzed RNA 2'-O-transphosphorylation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **21**, 96–102 (2014).
33. Huang, M. & York, D. M. Linear free energy relationships in RNA transesterification: Theoretical models to aid experimental interpretations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 15846–15855 (2014).
34. Lönnberg, T. A., Lain, L. & Lönnberg, H. Buffer catalyzed cleavage of uridylyl-3',5'-uridine in aqueous DMSO: comparison to its activated analog, 2-hydroxypropyl 4-nitrophenyl phosphate. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 3484–3492 (2015).

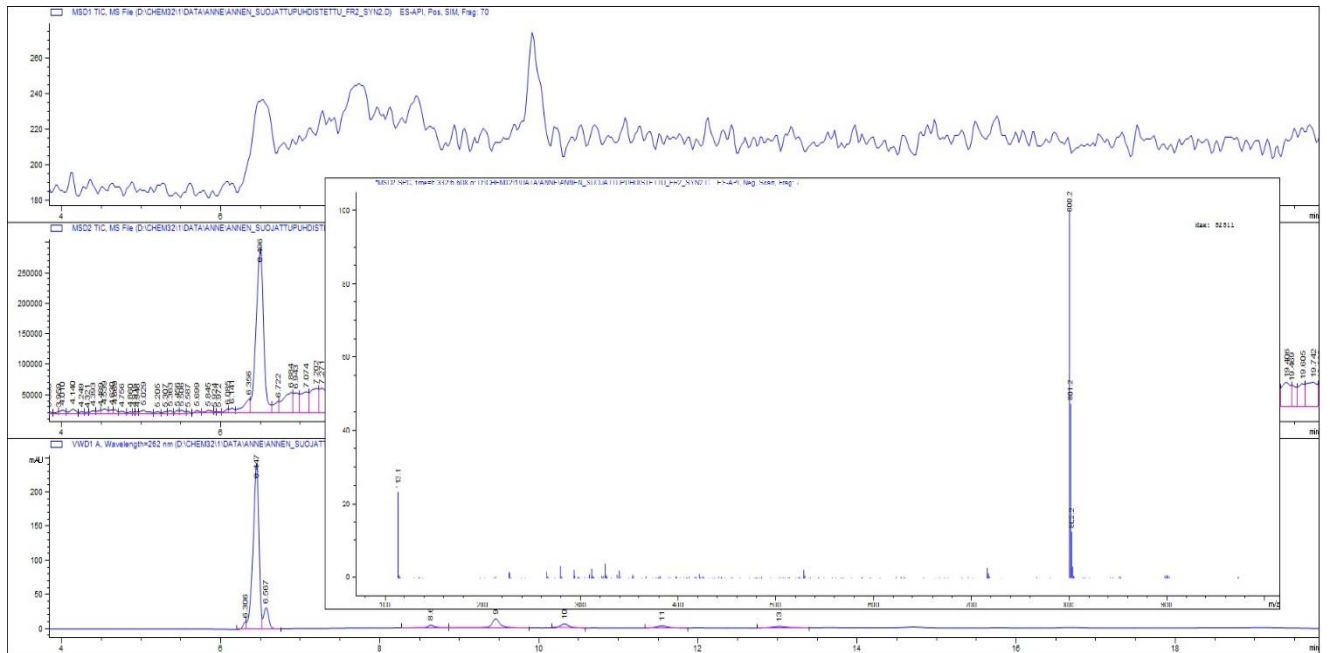
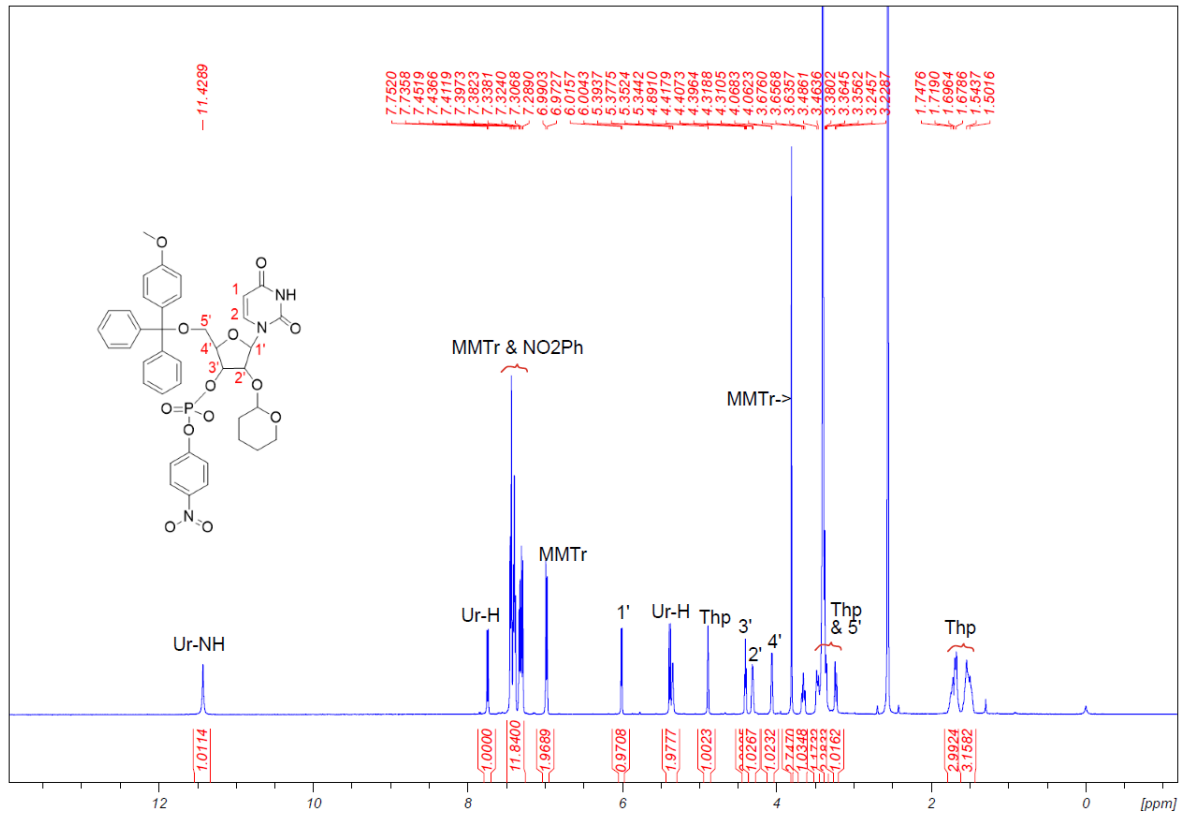
35. Lönnberg, T. & Luomala, M. Intracomplex general acid/base catalyzed cleavage of RNA phosphodiester bonds: The leaving group effect. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6785–6791 (2012).
36. Agbale, C. M., Cardoso, M. H., Galyuon, I. K. & Franco, O. L. Designing metallodrugs with nuclease and protease activity. *Metallomics*, **8**, 1159–1169 (2016).
37. Eiichi, K. & Tohru, K. Roles of Zinc(II) Ion in Phosphatases. A Model Study with Zinc(II)-Macrocyclic Polyamine Complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8935–8941 (1991).
38. Bonfá, L., Gatos, M., Mancin, F., Tecilla, P. & Tonellato, U. The Ligand Effect on the Hydrolytic Reactivity of Zn(II) Complexes toward Phosphate Diesters. *Inorg. Chem.* **42**, 3943–3949 (2003).
39. Morrow, J. R., Amyes, T. L. & Richard, J. P. Phosphate binding energy and catalysis by small and large molecules. *Acc. Chem. Res.* **41**, 539–548 (2008).
40. Morrow, J. R., Rossiter, C. S. & Mathews, R. A. Uridine Binding by Zn(II) Macrocyclic Complexes: Diversion of RNA Cleavage Catalysts. *Inorg. Chem.* **44**, 9397–9404 (2005).
41. Rulíšek, L., Hodačová, J., Bím, D., Svobodová, E. & Eigner, V. Copper(II) and Zinc(II) Complexes of Conformationally Constrained Polyazamacrocycles as Efficient Catalysts for RNA Model Substrate Cleavage in Aqueous Solution at Physiological pH. *Chem. Eur. J.* **22**, 10426–10437 (2016).
42. Morrow, J. R., Richard, J. P., Mathews, R. A. & Rossiter, C. S. A minimalist approach to understanding the efficiency of mononuclear Zn(II) complexes as catalysts of cleavage of an RNA analog. *Dalton Trans*, 3804–3811 (2007).
43. Kremer, C., Torres, J., Brusoni, M., Peluffo F., Domínguez, S. Mederos, A. & Kremer, E. Phosphodiesterolytic activity of lanthanide (III) complexes with α -amino acids. *Inorg. Chim. Acta* **358**, 3320–3328 (2005).
44. Chang, C. A., Lee, H. Y., Lin, S. L., Meng, C. N. & Wu, T. T. Dinuclear Lanthanide(III)-m-ODO2A-dimer Macrocyclic Complexes: Solution Speciation, DFT Calculations, Luminescence Properties, and Promoted Nitrophenyl-Phosphate Hydrolysis Rates. *Chem. Eur. J.* **24**, 6442–6457 (2018).
45. Camargo, M. A., Neves, A., Bortoluzzi, A. J., Szpoganicz, B., Fischer, F. L., Terenzi, H., Serra, O. A., Santos, V. G., Vaz, B. G. & Eberlin, M. N. Efficient phosphodiester

- hydrolysis by luminescent terbium(III) and europium(III) complexes. *Inorg. Chem.* **49**, 6013–6025 (2010).
46. Cacciapaglia, R., Casnati, A., Mandolini, L., Reinhoudt, D. N., Salvio, R., Sartori, A. & Ungaro, R. Catalysis of diribonucleoside monophosphate cleavage by water soluble copper(II) complexes of calix[4]arene based nitrogen ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12322–12330 (2006).
 47. Mareque-Rivas, J. C., Williams, N. H., Feng, G. & Torres Martín De Rosales, R. A highly reactive mononuclear Zn(II) complex for phosphodiester cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13470–13471 (2005).
 48. Feng, G., Natale, D., Prabakaran, R., Mareque-Rivas, J. C. & Williams, N. H. Efficient Phosphodiester Binding and Cleavage by a Zn II Complex Combining Hydrogen Bonding Interactions and Double Lewis Acid Activation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 7056–7059 (2006).
 49. Plush, S. E., Gunnlaugsson, T. & Fanning, A. M. Tri- and tetra-substituted cyclen based lanthanide(III) ion complexes as ribonuclease mimics: A study into the effect of log K_a , hydration and hydrophobicity on phosphodiester hydrolysis of the RNA-model 2-hydroxypropyl-4-nitrophenyl phosphate (HPNP). *Org. Biomol. Chem.* **13**, 5804–5816 (2015).
 50. Mikkola, S., Williams, N. H., Linjalahti, H., Feng, G. & Mareque-Rivas, J. C. Cleavage and isomerization of UpU promoted by dinuclear metal ion complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4232–4233 (2008).
 51. Anslyn, E. V., Aôt-Haddou, H., Sumaoka, J., Wiskur, S. L. & Frantz Folmer-Andersen, J. Remarkable Cooperativity between a ZnII Ion and Guanidinium/Ammonium Groups in the Hydrolysis of RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 4013–4016 (2002).
 52. Lönnberg, H. Cleavage of RNA phosphodiester bonds by small molecular entities: A mechanistic insight. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1687–1703 (2011).
 53. Brown, R. S., Lu, Z.-L., Liu, C. T., Tsang, W. Y., Edwards, D. R. & Neverov, A. A. Dinuclear Zn(II) catalysts as biomimics of RNA and DNA phosphoryl transfer enzymes: changing the medium from water to alcohol provides enzyme-like rate enhancements. *J. Phys. Org. Chem.* **23**, 1–15 (2010).
 54. Williams, N. H., Mareque-Rivas, J. C. & Feng, G. Comparing a mononuclear Zn(II) complex with hydrogen bond donors with a dinuclear Zn(II) complex for catalysing phosphate ester cleavage. *Chem. Commun.* 1845–1847 (2006).

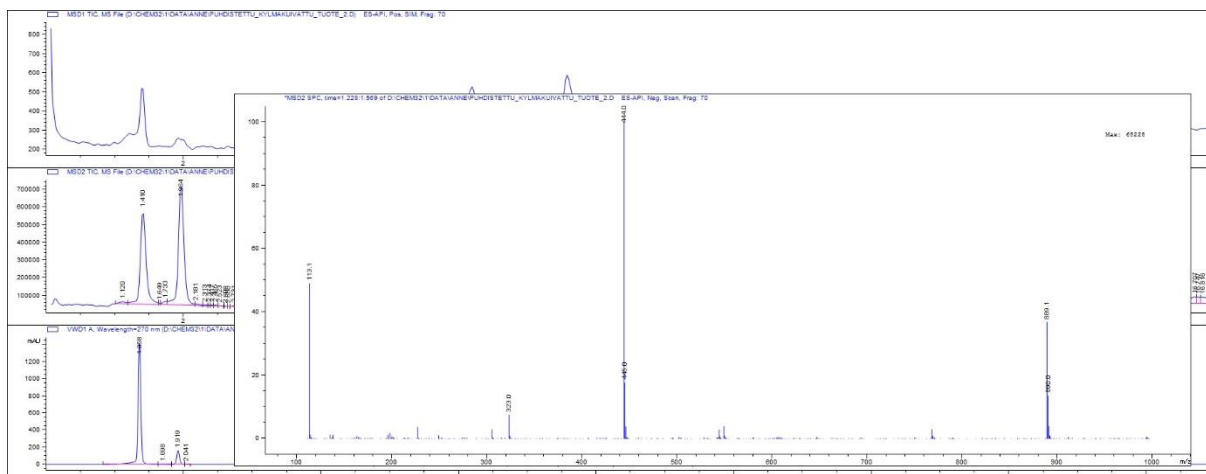
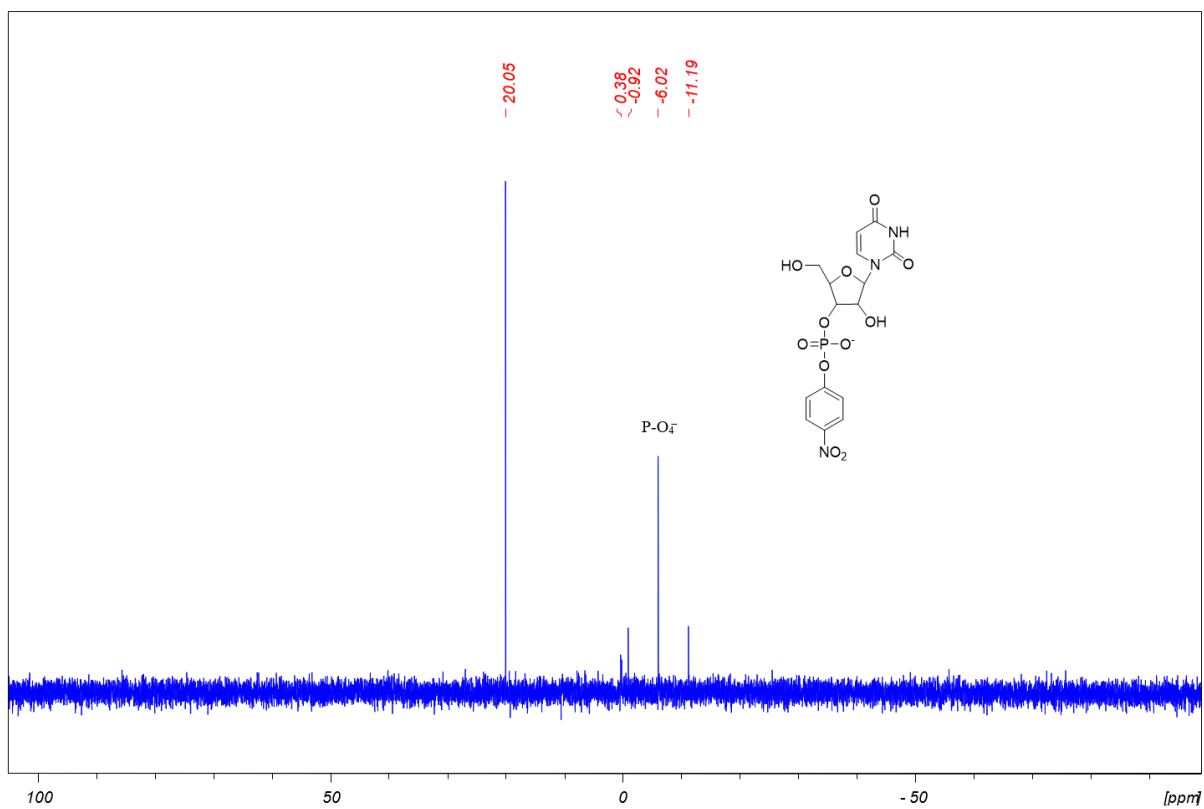
55. Lönnberg, H. & Kuusela, S. Metal Ions That Promote The Hydrolysis Of Nucleoside Phosphoesters Do Not Enhance Intramolecular Phosphate Migration. *J. Phys. Org. Chem.* **6**, 347–356 (1993).
56. Mukkala, V. M., Takalo, H., Liitti, P., Kankare, J., Kuusela, S., & Lönnberg, H. Lanthanide chelates as a tool in nucleic acid chemistry. *Met Based Drugs*, **1**, 201–211 (1994).
57. Morrow, J. R., Chappell, L. L., Voss, D. A. & Horrocks, W. D. Effect of Mixed Pendent Groups on the Solution and Catalytic Properties of Europium(III) Macrocyclic Complexes: Bifunctional and Monofunctional Amide and Alcohol Pendants in Septadentate or Octadentate Ligands. *Inorg. Chem.* **37**, 3989–3998 (1998).
58. Jenkins Autry, L. A. & Bashkin, J. K. Transesterification of RNA by Cu(II) terpyridine. *Inorg. Chim. Acta* **263**, 49–52 (1997).
59. Garribba, E., Micera, G., Sanna, D. & Strinna-Erre, L. The Cu(II)-2,2'-bipyridine system revisited. *Inorg. Chim. Acta* **299**, 253–261 (2000).
60. Morrow, J. R. & Trogler, W. C. Hydrolysis of Phosphate Diesters with Copper(II) Catalysts. *Inorg. Chem* **27**, 3387–3394 (1988).
61. Liu, S., Luo, Z. & Hamilton, A. D. Rapid and highly selective cleavage of ribonucleoside 2',3'-cyclic monophosphates by dinuclear CuII complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**, 2678–2680 (1997).
62. Mikkola, S., Valakoski, S., Heiskanen, S., Andersson, S. & Lähde, M. Metal ion-promoted cleavage of mRNA 5'-cap models: hydrolysis of the N⁷-methylguanine base. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 604–610 (2002).
63. Chin, J., Wall, M., Linkletter, B., Williams, D., Lebus, A.-M., & Hynes, R. C. Rapid Hydrolysis of 2',3'-cAMP with a Cu(II) Complex: Effect of Intramolecular Hydrogen Bonding on the Basicity and Reactivity of a Metal-Bound Hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4710–4711 (1999).
64. Joyner, J. C., Keuper, K. D. & Cowan, J. A. Analysis of RNA cleavage by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* **41**, (2013).
65. Bashkin, J. K., Trawick, B. N. & Daniher, A. T. Inorganic Mimics of Ribonucleases and Ribozymes: From Random Cleavage to Sequence-Specific Chemistry to Catalytic Antisense Drugs. *Chem. Rev.* **98**, 939–960 (1998).

Liitteet

Liite 1. Tuotteen 26 ESI-M

Liite 2. Tuotteen 26 ¹H-NMR

Liite 3. UPNP:n ESI-MS

Liite 4. UPNP:n ^{31}P -NMR

Liite 5. Taulukot A1 ja A2, puskuriliuosten konsentraatiot**Taulukko A1.** MOBS-puskurin pKa ja tasapainoyhtälön mukaiset konsentraatiot.

	pKa(psukuri)	MOBS	+ NaOH	\rightleftharpoons	MOBS-Na ⁺	+ MOBS
pH 7; 50 °C	7,60	50 mM	10 mM		10 mM	40 mM
pH 8; 0 °C	7,16	50 mM	31,2 mM		31,2 mM	18,8 mM
pH 8; 25 °C	7,60 ^a	50 mM	35 mM		35 mM	15 mM
pH 8; 25 °C	7,48 ^b	50 mM	38,4 mM		38,4 mM	11,6 mM

^aArvoa käytettiin HPNP:n reaktioliuosten valmistukseen. ^bArvoa käytettiin UPNP:n reaktioliuosten valmistukseen.

Taulukko A2. MOPSO-puskurin pKa ja tasapainoyhtälön mukaiset konsentraatiot.

	pKa(psukuri)	MOPSO	+ NaOH	\rightleftharpoons	MOPSO-Na ⁺	+ MOPSO
pH 6; 25 °C	7,09	50 mM	3,8 mM		3,8 mM	46,2 mM
pH 6; 90 °C	6,10	50 mM	22 mM		22 mM	28 mM
pH 7; 25 °C	7,09	50 mM	22,4 mM		22,4 mM	27,6 mM
pH 7; 50 °C	7,06	50 mM	23,3 mM		23,3 mM	26,7 mM

Liite 6. Taulukot B1–B3, reaktioliuosten valmistus

Taulukko B1. Reaktioliuokset, joissa suoritettiin HPNP:n hajoamisen tutkimukset. Reaktioliuosten kokonaistilavuus oli 10 ml.

$c(\text{katalyytti}) / \text{mM}$	$V(\text{NaOH}) / \text{ml}$	$V(\text{katalyytti}) / \text{ml}$	$V(\text{NaNO}_3) / \text{ml}$	pH(laskettu)
10	0,22	2,00	0,48	6,00
8	0,22	1,60	0,54	6,00
6	0,22	1,20	0,60	6,00
4	0,22	0,80	0,66	6,00
2	0,22	0,40	0,72	6,00
10	0,10	2,00	0,60	7,00
8	0,10	1,60	0,66	7,00
6	0,10	1,20	0,72	7,00
4	0,10	0,80	0,78	7,00
2	0,10	0,80	0,84	7,00
10	0,35	2,00	0,35	8,00
8	0,35	1,60	0,41	8,00
6	0,35	1,20	0,47	8,00
4	0,35	0,80	0,53	8,00
2	0,35	0,40	0,59	8,00

Reaktiolämpötilat: pH 8; 25 °C; pH 7; 50 °C ja pH 6; 90 °C. Liuosten pH mitattiin pH-elektrodilla huoneen lämmössä.

Taulukko B2. UPNP:n tutkimuksissa käytetyt reaktioliuokset.

$c(\text{katalyytti}) / \text{mM}$	$V(\text{NaOH}) / \text{ml}$	$V(\text{katalyytti}) / \text{ml}$	$V(\text{NaNO}_3) / \text{ml}$	pH(laskettu)
10	0,038	2,00	0,662	6
8	0,038	1,60	0,722	6
6	0,038	1,20	0,782	6
4	0,038	0,80	0,842	6
2	0,038	0,40	0,902	6
10	0,224	2,00	0,476	7
8	0,224	1,60	0,536	7
6	0,224	1,20	0,596	7
4	0,224	0,80	0,656	7
2	0,224	0,40	0,716	7
10	0,312	2,00	0,388	8
8	0,312	1,60	0,448	8
6	0,312	1,20	0,508	8
4	0,312	0,80	0,568	8
2	0,312	0,40	0,628	8

pH:t 6 ja 7; 25 °C, pH 8; 0 °C

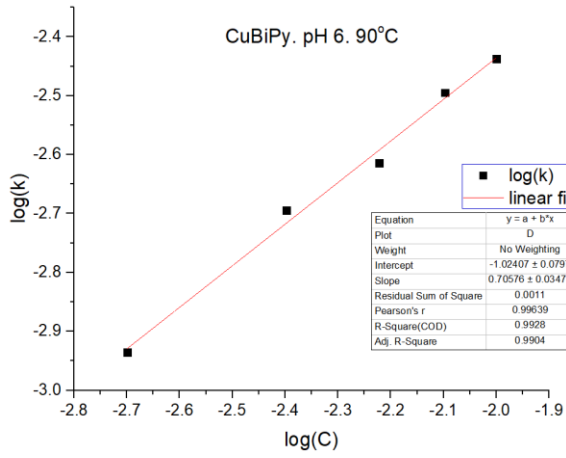
Taulukko B3. Reaktioliuokset, joissa HPNP:n, UPNP:n ja BPNP:n reaktiot tutkittiin samoissa olosuhteissa.

$c(\text{katalyytti}) / \text{mM}$	$V(\text{NaOH}) / \text{ml}$	$V(\text{katalyytti}) / \text{ml}$	$V(\text{NaNO}_3) / \text{ml}$	pH(laskettu)
2	0,233	0,40	0,707	7

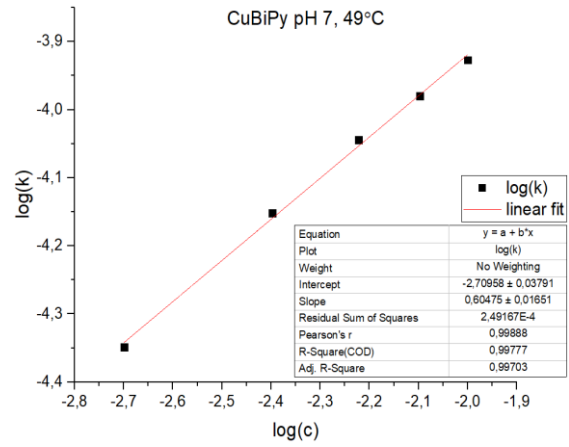
50 °C.

Liite 7. Reaktioiden log (k) vs. log (c) -kuvaajat

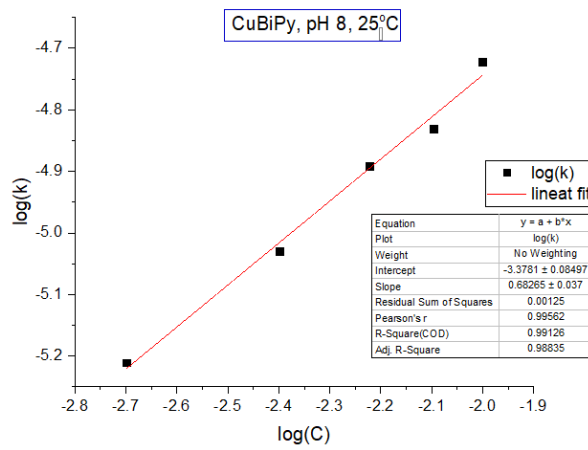
HPNP ja CuBiPy, pH 6



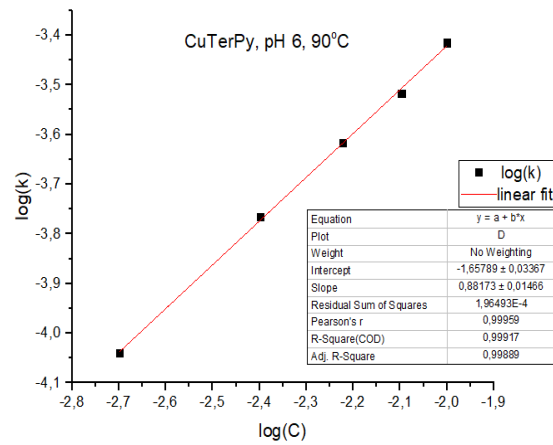
HPNP ja CuBiPy, pH 7



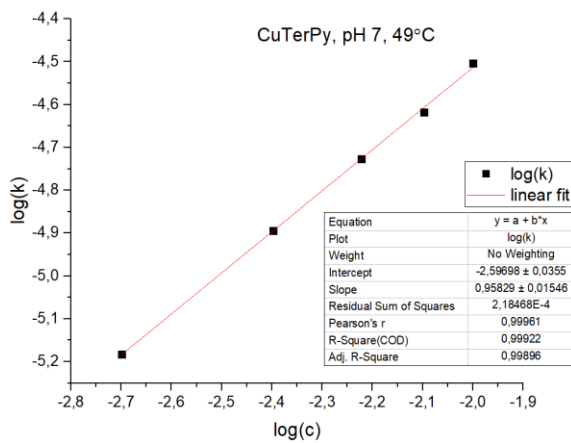
HPNP ja CuBiPy, pH 8



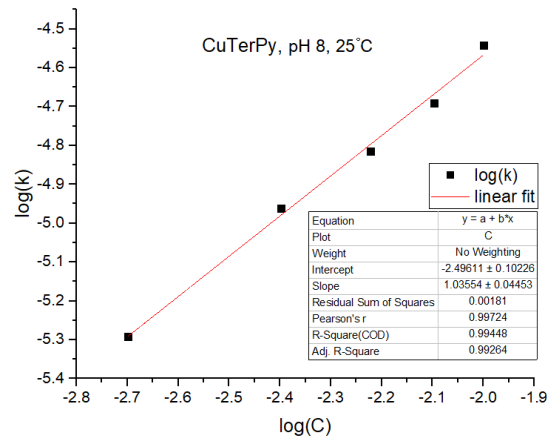
HPNP ja CuTerPy, pH 6



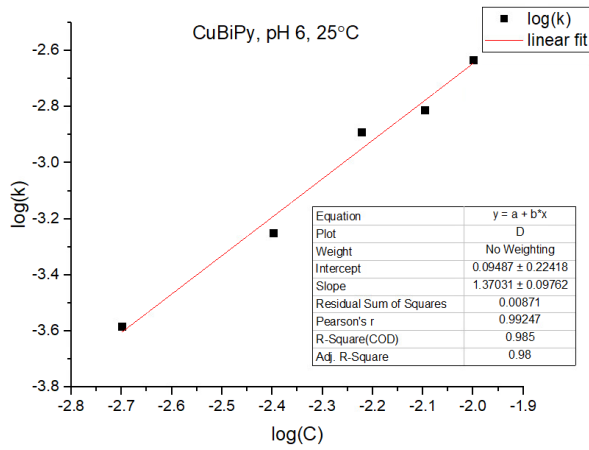
HPNP ja CuTerPy, pH 7



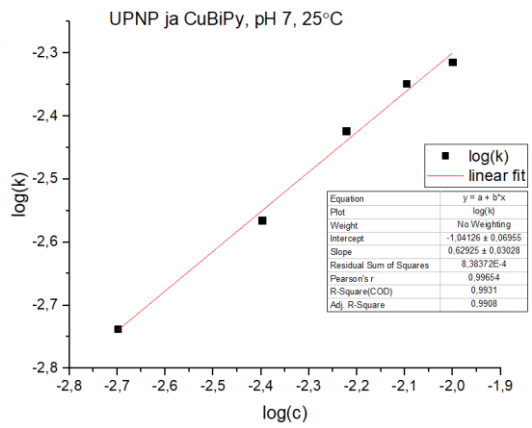
HPNP ja CuTerPy, pH 8



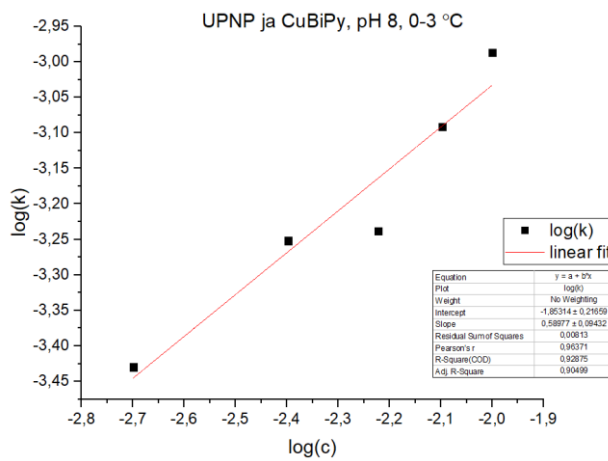
UPNP ja CuBiPy, pH 6



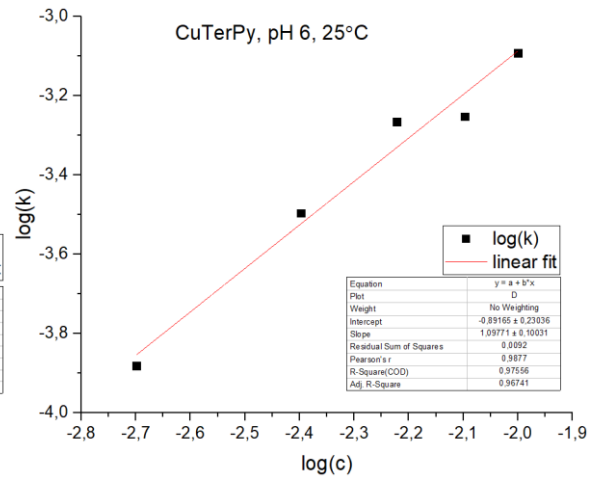
UPNP ja CuBiPy, pH 7



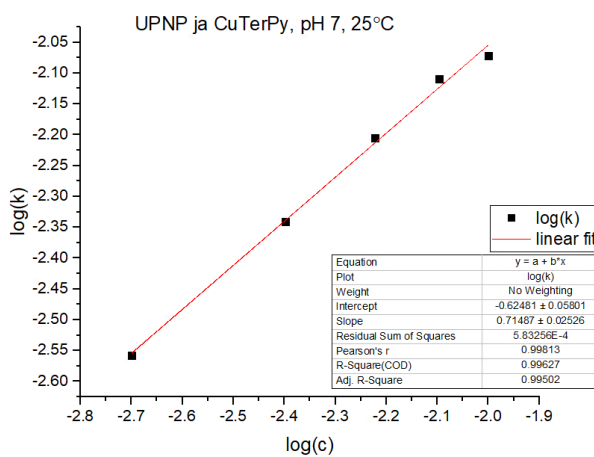
UPNP ja CuBiPy, pH 8



UPNP ja CuTerPy, pH 6



UPNP ja CuTerPy, pH 7



UPNP ja CuTerPy, pH 8

