

2-trifluorometyylianiilinukleotidi metallivälitteisenä

¹⁹F NMR-koettimena

Mahdollinen alaotsikko

Bio-orgaaninen tutkimusryhmä
pro gradu -tutkielma

Laatija:
Assi Lepistö

20.06.2024
Turku

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

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Lääkekehityksen kemia

Tekijä: Assi Lepistö

Otsikko: 2-trifluorometyylianiiliniinukleotidi metallivälitteisenä ¹⁹F NMR-koettimena

Ohjaaja(t): Professori Tuomas Lönnberg, professori Pasi Virta

Sivumäärä: 40 sivua

Päivämäärä: 20.06.2024

Biologisesti merkittävien sekvenssien tunnistamiseen keskittyvien hybridisaatiokoettimien käyttö terapeuttisissa ja diagnostisissa sovelluksissa asettaa useita vaatimuksia koettimen rakenteelle. Hybridisaatiokoettimen pariutuessa luonnollisen vastinjuosteen kanssa, sen on vähintään jäljiteltävä mittasuhteiltaan ja fysikokemiallisilta ominaisuuksiltaan luonnollista juostetta. Hybridisaatiokoettimen pariutumista on kyettävä seuraamaan siten, että se erottuu biologisesta taustastaan. Hybridisaatiokoettimella tavoitellaan usein korkeampaa affiniteettia komplementaariseen juosteeseen. Metallit ovat osa nukleiinihappojen normaalia toimintaa ja ylläpitävät fysiologisissa olosuhteissa sen rakennetta. Metallionien yhteensopivuutta onkin hyödynnetty jo vuosikymmenten ajan luonnollisten nukleiinihappojen ominaisuuksien ja toiminnallisuuden muokkaamiseen. Metallit muodostavat nukleiinihappojen kanssa koordinaatiosidoksia- ja komplekseja, jotka ovat usein liian labiileja laimeissa ja vähämetallisissa olosuhteissa. Metallionien kovalenttinen sitoutuminen hybridisaatiokoettimessa olevaan nukleotidianalogiin tarjoaa merkittävän edun pysyvyydessä koordinaatiosidoksiin verrattuna. Erityisesti elohopean kovalenttinen sitoutuminen nukleotidianalogiin on tuottanut potentiaalisia hybridisaatiokoettimia vähämetallisiin ja laimeisiin liuoksiin, joilla on korkea affiniteetti ja selektiivisyys komplementaarisiiin vastinjuosteisiin. Tässä pro gradu -tutkimusprojektissa valmistettiin oligonukleotidi, jonka tarkoituksena oli toimia lineaarisena metallivälitteisenä koettimena. Hybridisaation lähiympäristön tutkimista varten koetin leimattiin trifluorimetyyliryhmällä, joka mahdollisti ¹⁹F NMR-spektroskopian käytön. Koetin koostui 11 nukleotidin pituisesta juosteesta, jossa yksi kanoninen nukleotidi korvattiin C-nukleotidianalogilla. C-nukleotidianalogissa nukleoemäksenä toimi aniliini, joka oli leimattu trifluorimetyyliryhmällä C2-hiilestä. Nukleotidianalogin sijainti nukleiinihappoketjussa oli joko 3'-päässä, 5' päässä tai ketjun keskellä. Viimeiseksi mainittua juostetta, jossa nukleosidianalogi sijaitsi ketjun keskellä, yritettiin merkuroida aniliinin C5 hiilestä siinä onnistumatta. Turun Yliopiston bio-orgaaninen tutkimusryhmä sai sittemmin ratkaistua merkurointiongelman ja juoste merkuroitiin onnistuneesti.

Avainsanat: metallivälitteinen emäspariutuminen, lineaarinen koetin, merkurointi, ¹⁹F-NMR

Sisällysluettelo

1	Johdanto	7
1.1.1	Vetysidos on merkittävä kaksoiskierteen geometriaa ylläpitävä tekijä	9
1.2	Watson-Crick pariutuminen	9
1.2.1	Vaihtoehtoiset emäspariutumisen muodot	10
1.3	Keinotekoinen pariutuminen	10
1.3.1	Hybridisaatiokoetin	11
1.4	Metallit ja nukleiinihapot	11
1.4.1	HSAB-teoria	11
1.4.2	Metallivälitteisessä pariutumisessa vetysidokset korvataan metallisidoksilla	12
1.5	Metallivälitteisen emäspariutumisen rajoitteet terapeuttisissa ja diagnostisissa sovelluksissa	12
1.5.1	Metallien koordinaatiogeometria	13
1.5.2	Organometallinen koordinaatiokompleksi	13
1.5.3	Metallointi	14
1.6	Metallin valinta metallivälitteiseen emäspariutumiseen biologisesti merkittävien sekvenssien tunnistamisessa	15
1.7	Palladium	16
1.8	Elohopea	17
1.8.1	5-merkurisytsiini	17
1.8.2	3-fluori-2-merkuri-6-metyylianiiliini	18
1.8.3	Molekulaarinen majakkakoetin	20
1.8.4	Karbatsolit: 1,8-dimerkuri-6-fenyylikarbatsoli, 1-merkuri-6-fenyylikarbatsoli ja 8-merkuri-6-fenyylikarbatsoli	21
1.9	Metallivälitteisen hybridisaation analysointi termodynaamisilla menetelmillä	22
1.9.1	UV-spektroskopia	23
1.9.2	Ympyrädikroismispektroskopia (CD)	24
1.10	Yleisimmät tutkimusmenetelmät metallivälitteisten makromolekyylien atomitasoisen seurantaan: NMR ja röntgenkristallografia	25
1.10.1	Röntgenkristallografia	26
1.10.2	¹⁹ F NMR-spektroskopia	27
1.11	SNP-tunnistus elohopeavälitteisten hybridisaatiokoettimien potentiaalisena sovelluskohteena	28
2	Tulokset ja tulosten tarkastelu	30

2.1.1	Yleiset menetelmät	33
2.1.2	Metyyli-2-deoksi- α,β -D-ribofuranosidi (2)	33
2.1.3	Metyyli-3,5-bis-O-(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2-deoksi- α,β -D-ribofuranosidi (3)	33
2.1.4	3,5-Bis-O-(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-1,2-didehydro-1,2-dideoksi-D-ribofuranosidi (4)	34
2.1.5	3-O-(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-1,2-didehydro-1,2-dideoksi-D-ribofuranosidi (5)	34
2.1.6	4-Jodi-2-(trifluorimetyyli)fenyylitrifluoriasetamidi (7)	35
2.1.7	{4-[3-O-(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2-deoksi-2,3-didehydro- β -D-erythro-pentofuranosyyli]-2-trifluorimetyylifenyylitrifluoriasetamidi (8)	35
2.1.8	2-trifluori-N-(4-((2R,5R)-5-(hydroksimetyyli)-4-oxotetrahydrofuran-2-yyli)-2-(trifluorometyyli)fenyyl)asetamidi (9)	36
2.1.9	2-trifluori-N-(4-((2R,4S,5R)-4-hydroksi-5-(hydroksimetyyli)tetrahydrofuran-2-yyli)-2-(trifluorimetyyli)fenyyl)asetamidi (10)	37
2.1.10	N-(4-((2R,4S,5R)-5-((bis(4-metoksifenyyl)fenyyl)metoksi)metyyli)-4-hydroksitetrahydrofuran-2-yyli)-2-(trifluorimetyyli)fenyyl)-2,2,2-trifluoriasetamidi (11)	37
2.1.11	(2R,3S,5R)-2-((bis(4-metoksifenyyl)fenyyl)metoksi)metyyli)-5-(4-(2,2,2-trifluoriasetamidi)-3-(trifluorimetyyli)fenyyl)tetrahydrofuran-3-yl(2-syanoetyyli)diisopropyylifosforiamidiitti (12)	38
2.1.12	Oligonukleotidikoettimen valmistus	39
2.2	Johtopäätökset	40
	Lähteet	43
	Liitteet	58
	Liite 1. Lisämateriaali	58

Lyhenteet

A	adeniini
ACN	asetonitriili
aq.	vesiliuos
CD	ympyrädikroismi
Cy2NMe	N,N-disykloheksyyylimetyyliamiini
D	donoriatomi
DCM	dikloorimetaani
dd	dupletin dupletti
ddd	dupletin dupletin dupletti
DMTrCl	4,4-dimetoksitriitylikloridi
DNA	deoksiribonukleiinihappo
DSC	differentiaalinen pyyhkäisykalorimetri
dt	dupletin tripletti
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
ESI-TOF	elektronisumutusionisaatio yhdistettynä lentoajan mittaukseen
FRET	fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto
G	guaniini
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HRMS	korkean resoluution massa spektrometria
HSAB	kova-pehmeä happo-emäs teoria
HSQC	heteronukleaarinen lyhyen kantaman korrelaatio-spektroskopia
ITC	isoterminen titrauskalorimetria
<i>J</i>	J-kytkentä
M	metalli-ioni
m	multipletti
MAD	moniaaltainen anomaalinen diffraktio
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
Ph	fenyyliryhmä

Py	pyridiini
q	kvartetti
R _f	retentiotekijä
RNA	ribonukleiinihappo
RP HPLC	käänteisfaasin korkean erotuskyvyn nestekromatografia
C	sytosiini
s	singletti
SNP	yhden nukleotidin monimuotoisuus
STAB	natriumasetoksiboorihydridi
T	tymiini
t	tripletti
TBAF	tetrabutyyliammoniumfluoridi
TBDMS	<i>tert</i> -butyyylimetyylisilyyli
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyyliitolueeni
TFAA	trifluoretikkahappoanhydridi
THF	tetrahydrofuraani
TLC	ohutkerroskromatografia
T _m	sulamislämpötila
TMS-OTf	trimetyylisilyylitrifluorometaanisulfonaatti
U	urasiili
UV	ultravioletti
WC	Watson-Crick

1 Johdanto

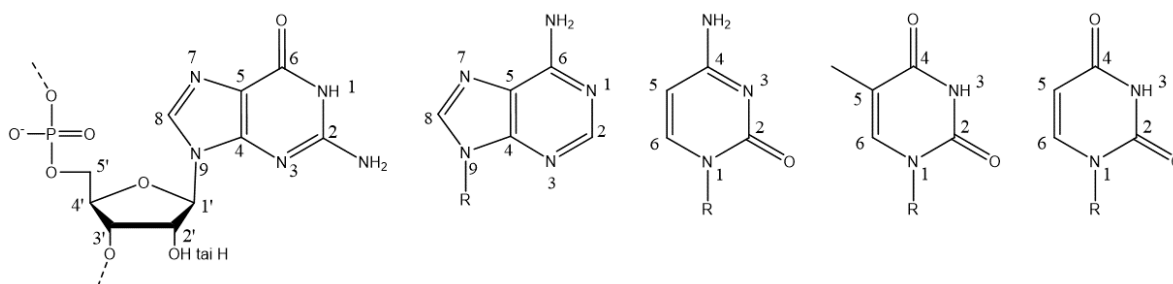
Nukleiinihapot kuuluvat elämälle välttämättömiin biologisiin makromolekyyleihin. Tärkeimmät nukleiinihapot ovat DNA eli deoksiribonukleiinihappo ja RNA eli ribonukleiinihappo. DNA:n pääasiallinen tehtävä on toimia varastona perinnölliselle tiedolle ja välittää perimätietoa eteenpäin tuleville sukupolville. RNA:n toiminnot ovat sen sijaan hyvinkin moninaiset. RNA osallistuu muun muassa geenien ilmentämiseen, proteiinisynteesiin ja geneettisen tiedon säätelyyn, sekä muihin biologisiin prosesseihin.

Nukleiinihapot ovat polymeerejä, joiden yksikkörakenteita eli monomeereja kutsutaan nukleotideiksi. Nukleotidit koostuvat sokeriosasta, fosfaattiosasta sekä emäsosasta. Nukleosidi on nimitys rakenteelle ilman fosfaattiosaa. Nukleotidit muodostavat nukleiinihappoja fosfodiesterisidoksella, jossa sidos muodostuu sokeriosan 5' hiilestä seuraavan nukleotidin sokeriosan 3' hiileen. Nukleiinihappojen emäsjärjestys ilmoitetaan 5'-päästä 3'-päähen. Eli ensimmäisenä olevan nukleotidin sokeriosan 5'-hiilessä on vapaa hydroksyyliiryhmä ja vastaavasti viimeisenä olevan nukleotidin sokeriosan 3'-hiilessä on vapaa hydroksyyliiryhmä. Oligonukleotideilla viitataan nukleiinihappoketjuihin, jotka ovat lyhyitä. Oligo- etuliitteellä tarkoitetaan muutamaa (3–10 kpl)¹, mutta käytännössä oligonukleotideilla voidaan viitata myös nukleiinihappoketjuihin, joissa on satoja perättäisiä nukleotideja. Kaksoiskierteissä juosteet asettuvat tai rakentuvat kaksoiskierteisiksi rakenteiksi niin, että koodaava juoste ja vastinjuoste ovat vastakkaisuuntaiset. Juosteet ovat siis rinnakkain siten, että koodaavan juosteen suunta on 5'→3' ja vastinjuosteen suunta on 3'→5'. DNA esiintyy pääasiassa kaksoiskierteenä, kun taas RNA yksijuosteisena.

Nukleotidin sokeriosa on viisihiilinen pentoosisokeri, DNA:ssa 2'-deoksiriboosi ja RNA:ssa riboosi. Pentoosisokeri määrittää vahvasti toiminnallisen eron DNA:n ja RNA:n välillä. DNA:ssa pentoosisokerin C2'-hiileen on kiinnittynyt vety, kun taas RNA:ssa tilalla on hydroksyyliiryhmä. Hydroksyyliiryhmä tekee RNA:sta merkittävästi labiilimman kuin DNA, sillä C2'-hydroksyyliiryhmän läsnäolo RNA:ssa mahdollistaa muun muassa lähellä olevien fosfodiesterisidoksien pilkkoutumisen.^{2,3} Labiilius mahdollistaa RNA:n reaktiivisuuden ja sen moninaiset tehtävät, kun taas perintötekijöiden säilymiselle DNA:n sisältämän deoksiriboosin stabiilimpi rakenne on eduksi. RNA:ssa C2'-hydroksyyliiryhmä määrittää RNA:n muodostaman kaksoiskierteen sekundaarirakenteen A-kierteeksi, kun taas pääosin (fysiologisissa nesteissä) B-kierteinen DNA voi esiintyä myös A, B, D tai Z-kierteisenä.^{4,5}

Fosfaattiosa vastaa isoilta osin DNA:n ja RNA:n fysikaalisista ominaisuuksista. Fosfaattiosa yhdessä sokeriosan kanssa muodostaa nukleiinihappojen tukirungon. Nukleiinihappoketjussa säännöllisesti toistuva polyanionisuus on tärkeässä asemassa useasta syystä. 1. Tukirangan toistuva varaus ohjaa emäsosien suuntautumista toisiaan kohden siten, että vetysidosten muodostuminen oikeaan kohtaan olisi mahdollinen⁶. 3. Varaus estää kaksoiskierteitä poimuttumasta^{6,7}. 3. Tukirangan fysikaalinen vaikutus rakenteeseen on niin merkittävä, ettei pienet rakenteen muutokset, kuten emästen vaihtuminen tai muuttuminen estä DNA:n kahdentumista, mahdollistaen evolutiiviset muutokset^{6,8-10}. 4. Tukirangan varaukset lisäävät nukleiinihappojen vesiliukoisuutta.⁵

Emäsosat ovat tyypipitoisia, tasomaisia heterosyklisiä molekyyliä. Emäsosat luokitellaan kahteen tyyppiin rengasrakenteiden määrän perusteella: pyrimidiinit koostuvat yhdestä renkaasta ja puriineissa renkaita on kaksi. Pyrimidiinejä ovat tymiini (T, vain DNA:ssa), sytosiini (C), urasiili (U, vain RNA:ssa) ja puriineja ovat guasiini (G) ja adeniini (A). Edellä mainittuja kutsutaan kanonisiksi emäksiksi. Emäsosat yhdistyvät sokeriosaan *N*-glykosididoksella siten, että pentoosisokerin anomeerisesta hiilestä C1' on sidos joko pyrimidiiniemäksen N1-tyypen tai puriiniemäksen N9-tyypen. Glykosididoksen stereokemialla on merkitystä. Luonnollisissa nukleiinihapoissa glykosidididos on aina β -sidoks, jossa emäsosa on samalla puolella sokeriosan tasoa kuin sokeriosan 5' hiilen hydroksyyliiryhmä. α -glykosididoksessa emäsosa ja 5' hiilen hydroksyyliiryhmä ovat eri puolella tasoa. Keinotekoisissa nukleosideissa luonnollinen *N*-glykosidididos korvataan usein *C*-glykosididoksella, joka on vähemmän labiili. Nukleiinihappoketjun vierekkäisten emäsosien pinoutumisella on merkittävä vaikutus DNA kaksoiskierteen stabiiliuteen¹¹. Pinoutumisen lisäksi emäsosat vuorovaikuttavat kaksoiskierteessä vastakkaisen juosteen eli komplementaarisen juosteen kanssa myös vetysidoksin. Vetysidoksia muodostuu kaksi kappaletta adeniinin ja tymiinin (RNA:ssa urasiilin) välille, sekä guaniinin ja sytosiinin välille kolme kappaletta. Vetysidosten muodostumista edellä mainittujen emäsparien välille kutsutaan Watson-Crick-pariutumiseksi.¹²



Kuva 1. Kanoniset emäkset: guaniini (G), adeniini (A), sytosiini (C), tymiini (T) ja urasiili (U).

1.1.1 Vetysidos on merkittävä kaksoiskierteen geometriaa ylläpitävä tekijä

Vetysidoksen sidosenergia koostuu useista voimista ($E_{\text{kokonais}} = E_{\text{elektrostaattinen}} + E_{\text{polarisaatio}} + E_{\text{varauksen siirto}} + E_{\text{dispersio}} + E_{\text{vaihtoenergia}}$) sidoksen muodostavien atomien ja niiden ympäristön yhteisvaikutuksesta, joista elektrostaattisilla voimilla on suurin vaikutus nukleoemästen välisissä vetysidoksissa. Toisiaan lähellä olevien vetysidosten sidosenergiat eivät ole suoraan yhteenlaskettavissa, sillä vetysidokset muodostavat usein toisiinsa vaikuttavia verkostoja. Yksittäisten vetysidoksien sidosenergiat nukleoemäksiä vastaavissa vuorovaikutuksissa ovat kuitenkin pääosin noin 1 kcal mol^{-1} suuruisia. Lineaarisuus on vetysidosten karakteristinen geometrinen piirre ja sidoksen lineaarisuuden vuoksi vetysidoksella on merkittävä, geometriaa säätelevä vaikutus.^{13,14} Vastakkaisten emäsparien välillä olevien vetysidosten yhdessä pitävät voimat ovat suhteellisen pieniä. Alhaisilla sidosenergioilla on kuitenkin biologista merkitystä, sillä se mahdollistaa muun muassa kaksoiskierteisen DNA:n ”hengittämisen” (*engl.* DNA breathing)¹⁵ eli kaksoiskierteen avautumisen ja uudelleen pariutumisen. DNA:n ”hengittäminen” mahdollistaa DNA:n sisältämän geneettisen informaation käyttöönoton.

1.2 Watson-Crick pariutuminen

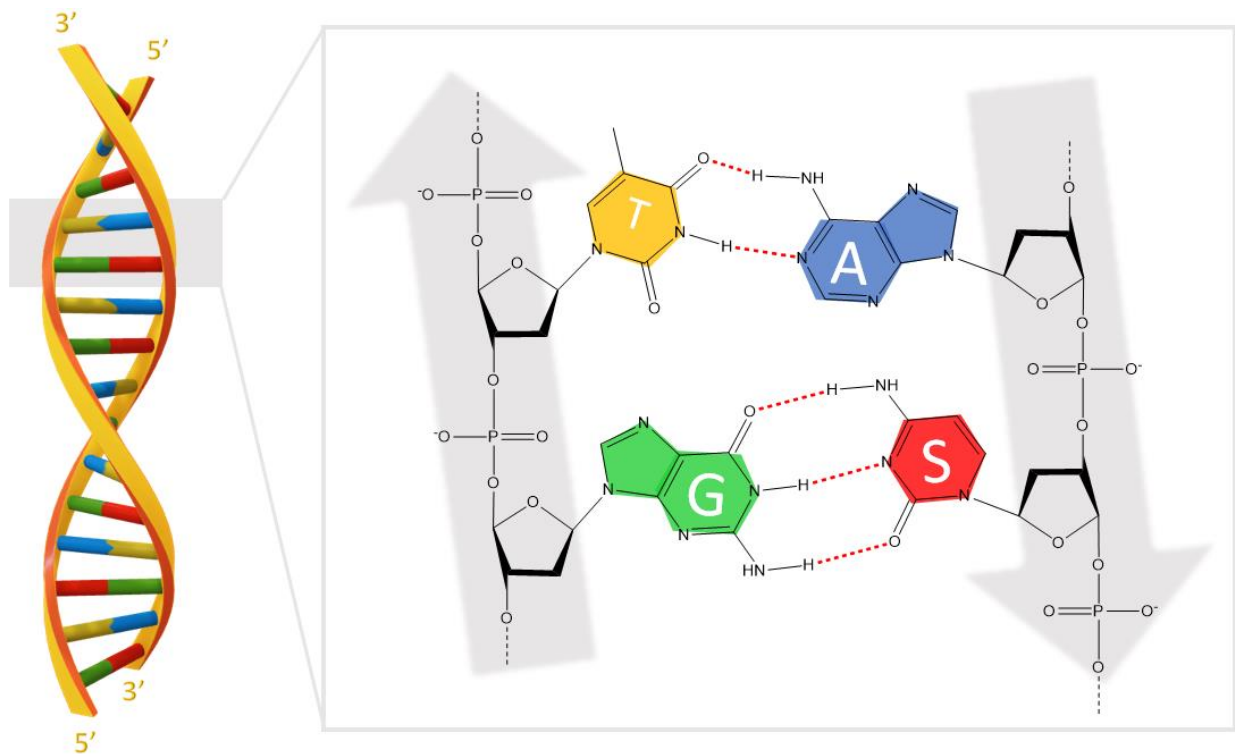
Watson-Crick-pariutumisessa pyrimidiini- ja puriiniemäkset muodostavat vetysidosten välityksellä emäsparit. Muodostuvat emäsparit lukkiutuvat lähes tasomaiseksi rakenteeksi suhteessa tukirankaan, kuten tikkaiden porrasaskelmat¹⁶. Guaniinin ja sytosiinin välille muodostuu kolme vetysidosta ja adeniinin ja tymiinin (RNA:ssa urasiilin) välille kaksi vetysidosta.

Watson-Crick-emäspariutumisessa DNA:n toiminnalliset ominaisuudet pysyvät muuttumattomina sekvenssin eli emäsjärjestyksen vaihtelusta huolimatta, mahdollistaen perimätiedon monipuolisen koodaamisen ja RNA:n synteessin koodin mukaisesti. Fysiologisissa olosuhteissa Watson-Crick-parit A-T/U ja G-C ovat energeettisesti suotuisimmat ja siten yleisimmin esiintyvät emäsparit DNA-kaksoiskierteissä.¹⁷ Yllä mainittuihin ominaisuuksiin vaikuttaa useat tekijät, joista mainittakoon kolme tärkeää piirrettä: 1. Watson-Crick-parit A-T/U ja G-C ovat mittasuhteiltaan lähes identtiset¹⁸. Parien mittasuhteiden samankaltaisuus auttaa pitämään tukirankaan kohdistuvia avaruudellisia muutoksia mahdollisimman vähäisinä emäsjärjestyksen vaihtelusta huolimatta¹⁹. 2. Watson-Crick-pariutuminen pitää emäkset avaruudellisesti suotuisassa asennossa emäspinoutumisen näkökulmasta (kuten vaaka-askelmat tikkaissa)¹³ 3. Watson-Crick-pariutumisessa tukirankaan kohdistuu vain vähäistä kiertymistä.⁵ Tarkat mittasuhteet ja pariutumissäännöt toimivat myös varmistuksena perimän eheydelle. Muutokset voivat käynnistää DNA:n tehokkaan korjauskoneiston^{20–22}, apoptoosin eli geneettisesti ohjelmoidun solukuoleman tai pysäyttää solusyklin.^{23,24}

1.2.1 Vaihtoehtoiset emäspariutumisen muodot

Nukleiinihapot pariutuvat myös muilla tavoilla kuin Watson-Crick-pariutumisella^{25–27}. Vaihtoehtoiset pariutumismuodot tuottavat yleensä muita kolmiulotteisia rakenteita kuin kaksoiskierteitä ja näillä rakenteen muutoksilla on tärkeä merkitys eliöiden nukleiinihappojen toiminnassa, erityisesti RNA:ssa²⁸. Esimerkiksi Hoogsteen-emäspareilla on geenien toiminnan säätelyssä korvaamaton rooli^{29–31}.

Vallitseva emäspariutumisen muoto riippuu niin emäsjärjestyksestä kuin ympäröivistä olosuhteista, eikä Watson-Crick-pariutuminen ole kaikissa olosuhteissa optimaalisin. Emäspariutumisen pariutumismuotoon vaikuttavat intramolekulaariset vuorovaikutukset: vetysidokset emäsparien välillä, viereisten emästen pinoutumisvuorovaikutukset ja rakenteen muodostumiseen liittyvä entropian alenema. Ympäristön vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa liuoksen vastaionit ja hydraatio.³²



Kuva 2. Watson-Crick-pariutuminen DNA:n kaksoiskierteessä.

1.3 Keinotekoinen pariutuminen

Keinotekoisissa nukleiinihappoissa yhteen tai useampaan nukleotidiin on lisätty tai poistettu kemiallisia ryhmiä tai ne on kokonaan korvattu analogisilla molekyyileillä. Muunnelmat voivat kohdistua fosfaattiosaan, sokeriosaan tai emäsosaan. Pariutumisen näkökulmasta kiinnostuksen

kohde on yleensä emäsosa, sen ollessa määrittävä tekijä juosteiden komplementaarisuudessa ja selektiivisyydessä.

1.3.1 Hybridisaatiokoetin

Hybridisaatiolla tarkoitetaan kahden yksijuosteisen nukleiinihapon pariutumista komplementaarisesti kaksoiskiarteeksi. Kun tutkitaan hybridisaatiota, yleensä toinen juosteista on hybridisaatiokoetin. Hybridisaatiokoetin voi olla luonnollinen tai keinotekoinen nukleiinihappoketju, johon on lisätty jokin kemiallinen ryhmä eli leima. Leimaus mahdollistaa kemiallisen ympäristön muutoksen, kuten pariutumisen, todentamisen. Kemiallinen leima voi olla esimerkiksi radioaktiivinen, fluoresoiva tai sisältää NMR-aktiivisia ytimiä. Hybridisaatiotutkimuksilla voidaan tutkia juosteiden komplementaarisuutta, selektiivisyyttä, kaksoiskiirteen muotoa ja pysyvyyttä. Erityisesti keinotekoisien nukleiinihappojen kohdalla molekyyli-tason muutoksien vaikutus kaksoiskiarteeseen tuo merkittävää tietoa. Kaksoiskierteitä yhdessä pitävät voimat ovat suhteellisen pieniä, jotta nukleiinihappojen purkautuminen tarvittaessa, esimerkiksi replikaatiota tai korjaamista varten, olisi mahdollinen. Ympäristön lämpötilan nosto aiheuttaa kaksoiskiirteen purkautumisen, jota kutsutaan tässä yhteydessä sulamiseksi. Siirtymää kaksoiskierteestä erillisiksi juosteiksi voidaan seurata usealla eri menetelmällä. Tällaisia menetelmiä ovat UV-sulamislämpömittaukset, ympyrädikroismispektroskopia (circular dichroism, CD), NMR-spektroskopia ja viskositeettitutkimus.¹⁹

1.4 Metallit ja nukleiinihapot

Polyanionisen rakenteensa vuoksi DNA ja RNA esiintyvät aina yhdessä kationien eli positiivisesti varautuneiden ionien kanssa. Kationeina fysiologisessa ympäristössä ovat polyamiinit sekä metalli-ionit, pääasiassa Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ja Ca^{2+} .^{33,34} Tämän lisäksi metalleilla on muita, DNA/RNA:n toiminnalle välttämättömiä funktioita.^{35,36} Metallioneilla on suuri vaikutus DNA:n ja RNA:n rakenteeseen ja toimintaan. Metallien vuorovaikutusta DNA:n ja RNA:n kanssa on tutkittu laajalti, niin fysiologisen toiminnan näkökulmasta, ympäristön tuomien metallien vaikutuksen kartoittamiseksi kuin niiden käyttämiseen nanoteknologiin tarkoituksiin, muokaten luonnollisten nukleiinihappojen ominaisuuksia.³⁵⁻⁴⁰

1.4.1 HSAB-teoria

Metallit vuorovaikuttavat kaikkien nukleotidien osien kanssa (emäs-, fosfaatti- ja sokeriosan).^{33-35,41-}
⁴³ Kullekin metallille suosiollisin sitoutumiskohta riippuu useista tekijöistä, kuten metalli-ionin varauksesta, koosta, pK_a :sta ja geometriasta. Metallien sitoutumista voidaan arvioida HSAB-teorian

avulla (HSAB = *engl.* Hard and Soft Acid Base theory, teoria kovista ja pehmeistä hapoista ja emäksistä). Teorian mukaan metallit (Lewis hapot) ja ligandit (Lewis emäkset) ovat pehmeitä tai kovia riippuen niiden taipumuksesta muodostaa ionisidoksia (kovat) tai kovalenttisia sidoksia (pehmeät).⁴⁴⁻⁴⁶ Ligandilla tarkoitetaan keskusatomiin, yleensä metalliin, sitoutuneita ryhmiä.

1.4.2 Metallivälitteisessä pariutumisessa vetysidokset korvataan metallisidoksilla

Metallivälitteisessä pariutumisessa emästen väliset vetysidokset $N-H\cdots O/N-C$ korvataan $X-M-X$ koordinaatiosidoksilla (X = määrittelemätön atomi, M = metalli-ioni). Koordinaatiosidos on kovalenttisen sidoksen erikoismuoto, joka eroaa kovalenttisesta sidoksesta muun muassa jaettujen sidoselektronien alkuperän ja sidoksen rikkoutuessa syntyvien hajoamistuotteiden⁴⁷ perusteella. Koordinaatiosidos voi olla sidosluonteeltaan hyvinkin kovalenttinen tai ioninen, riippuen vuorovaikutuksessa olevista atomeista⁴⁸. Vetysidosten korvaaminen metallivälitteisillä koordinaatiosidoksilla nostaa emästen välistä sidosenergiaa ja saattaa johtaa kaksoiskierteen pysyvyyden merkittävään kasvuun.⁴⁸⁻⁵¹

Koordinaatiosidokset muodostuvat pääosin pyrimidiinien N3- ja puriinien N1 ja N7-typpiatomien välille.⁵² Näillä tyypillisillä, endosyklisen typpiatomien välisillä koordinaatiosidoksilla, on kuitenkin yksi merkittävä rajoittava tekijä, nimittäin heikko pysyvyys laimeissa ja vähämetallisissa ympäristöissä kuten solun sisäisissä nesteissä.⁵¹

1.5 Metallivälitteisen emäspariutumisen rajoitteet terapeuttisissa ja diagnostisissa sovelluksissa

Metallivälitteistä emäspariutumista on tutkittu laajalti muun muassa nanoteknologisissa sovelluksissa, metallisensoreina ja geneettisen koodiston laajentamisen näkökulmasta.^{37,38,53} Näissä sovelluksissa nukleiinihappojen muokkaukset on voitu tehdä yhtä lailla molempiin pariutumisessa osallisina oleviin emäksiin. Biologisesti merkittävien sekvenssien tunnistamiseen keskittyvät terapeuttiset ja diagnostiset sovellukset sen sijaan perustuvat keinotekoisien ja luonnollisten nukleiinihapon hybridisaatioon, jolloin mahdollisuutta muokata vastinjuostetta ei ole. Lisähaastetta tuo koordinaatiokompleksien dissosiaatioalttius fysiologisissa nesteissä.⁵⁴

Nukleiinihapot poistuvat elimistöstä nopeasti: nukleotideja poistuu virtsan mukana, muokkaamattomien nukleiinihappojen puoliintumisaika plasmassa vaihtelee muutamasta minuutista muutamaan tuntiin⁵⁵⁻⁵⁹ ja solun sisällä ne pilkkoutuvat tehokkaasti nukleaasien toimesta^{60,61}. Nukleiinihappojen nopea poistuminen tai hajoaminen elimistössä johtaa usein riittämättömiin farmakologisiin vaikutuksiin. Jotta riittävä vaste syntyy, nukleiinihappojen on säilytettävä

toiminnallisuutensa siihen asti, että kontakti luonnollisen vastinjuosteen kanssa on mahdollinen.^{56,62,63}

1.5.1 Metallien koordinaatiogeometria

Metallivälitteisessä emäspariutumisessa, jossa vastinjuoste on luonnollinen nukleinihappo, mahdollisten koordinaatorakenteiden määrä on rajallinen. Lineaarinen, kolmikulmainen tasomainen tai kolmikulmainen pyramidi, nelikulmainen tasomainen ja oktaedri ovat koordinaatorakenteita, jotka on onnistuttu liittämään nukleinihappojen kaksoiskiarteeseen.^{54,64-70}

Vetysidoksilla on keskeinen, geometriaa säätelevä rooli nukleoemästen orientaatioissa: emästen on oltava tasomaisia, päällekkäisiä ja tietyssä kulmassa toisiinsa nähden, jotta emäspinoutuminen on mahdollista. Emäspinoutuminen on yksi tärkeimmistä kaksoiskiirteen pysyvyyteen vaikuttavista tekijöistä. Kun vetysidokset korvataan metallisidoksilla, metallisidoksien koordinaatorakenne on pääosin vastuussa emästen orientaatiosta.

Optimaalinen metallien koordinaatorakenne emäspariutumisessa joko jäljittelee vetysidosten geometriaa tai ylläpitää muutoin emästen suuntautumista toisiinsa nähden. Emästen orientaation ylläpitämisen lisäksi myös koko on rajoittava tekijä. Liikaa tilaa vievä koordinaatorakenne saattaa muuttaa kaksoiskiirteen mittasuhteita, jolla voi olla vaikutuksia kaksoiskiirteen fysikokemiallisiin ominaisuuksiin ja mittasuhteiden vääristymä voi indusoida nukleinihappoja korjaavia tai tuhoavia tekijöitä terapeuttisessa käytössä. Metallisidoksien tuoma sidosenergia kasvu ei yksinään riitä parantamaan kaksoiskiirteen pysyvyyttä, jos kaksoiskiirteen rakenteen muutos on epäsuotuisa⁵¹.

Teoriassa nelikulmainen tasomainen koordinaatorakenne on ainoa kaksoiskiarteeseen soveltuva koordinaatorakenne, joka lukitsisi molempien pariutuvien emästen orientaation tasomaiseksi, mikäli nukleotidianalogi ja vastinemäs sitoutuisivat keskusmetallin kaksihampaisesti (ligandi, joka sitoutuu keskusmetalliin kahdella eri sidoksella). Muut kaksoiskiarteeseen soveltuvat koordinaatorakenteet mahdollistavat yhden tai useamman koordinaatiosidoksen rotaation. Koordinaatiosidosten rotaatiota ja sitä kautta ligandien kiertymistä estäviä tekijöitä ovat myös ligandiin emästen kanssa samassa tasossa muodostuvat vetysidokset.

1.5.2 Organometallinen koordinaatiokompleksi

Organometallisessa kompleksissa on vähintään yksi sidos, jossa hiili on sitoutunut atomiin, jonka elektronegatiivisuus on pienempi kuin hiilen. Elektronegatiivisuuseron takia sidos on polaarinen $C^{\delta-}-M^{\delta+}$. Sidoksen ioniluonne kasvaa elektronegatiivisuuseron mukana.^{46,71,72} Hiili muodostaa kuitenkin useiden metallien kanssa sidoksia, jotka ovat luonteeltaan kovalenttisia.

Koordinaatiokomplekseihin verrattuna, jotka saavuttavat yleensä riittävän korkean affiniteetin vähämetallisissa ja laimeissa olosuhteissa vain kelatoitumisen (ligandi muodostaa enemmän kuin yhden sidoksen keskusmetallin kanssa) kautta, organometallikompleksien etu on, että jopa yksi hiili–metallisidos voi riittää tarpeeksi pysyvän kompleksin saavuttamiseksi. Tällöin metalli-ioni jää suurelta osin paljaaksi ja antaa näin enemmän vapautta lisävuorovaikutusten toteuttamiseen.⁵¹

1.5.3 Metallointi

Nukleiinihappojen ja metalli-ionien väliset koordinaatiokompleksit saadaan kätevästi itsejärjestymisen kautta, edellyttäen, että nukleiinihapoilla on sopiva korkean affiniteetin sitoutumispaikka ja metalli-ionit riittävän labiileja kineettisesti. Tämä on toimiva tapa yksinkertaisissa tapauksissa ja lyhyillä nukleiinihapoilla.^{73–78} Monimutkaisemmissa ja oligonukelotidiketjun pituuden kasvaessa todennäköisyys odottamattomille koordinaatiosidoksille kuitenkin lisääntyy.⁵¹ Nukleiinihapon metallointi kovalenttisesti ”lukitsee” metallin valittuun kohtaan.^{79–83} Organometallisen koordinaatiokompleksin haasteita ovat sen sijaan valmistus ja puhdistus.⁵¹

Organometallisen koordinaatiokompleksin valmistamisessa on kolme lähestymistapaa. Ensimmäinen, ja teoriassa helpoin lähestymistapa on organometallisen kompleksin sisällyttäminen yhdeksi rakenneyksiköksi perinteiseen automaattisella syntetisaattorilla toteutettavaan fosforiamidiittikytkentään. Tämä on onnistunut vain muutamalla organometallisella koordinaatiokompleksilla, joissa keskusmetallien koordinaatioluku on ollut täynnä, kuten ferroseenilla^{84,85} ja tetra-alkyyliitinalla⁸⁶.

Toinen vaihtoehto on post-synteettinen kovalenttinen metallatio keinotekoisien nukleiinihapon kanssa, jossa on valmiina reaktiivinen kohta. Tämä lähestymistapa muistuttaa tyypillistä koordinaatiokompleksin valmistusta. Tällä lähestymistavalla on onnistuttu liittämään elohopeaioni Hg(II) kovalenttisesti siten, että reaktiiviseksi kohdaksi on riittänyt vain yksi elektronegatiivinen endosyklinen hiiliatomi^{87–91}. Platinaryhmän metallien kovalenttinen liittäminen on vaatinut ohjaavan ligandin^{92–94}. Haasteena on, että usein on käytettävä kymmenien ekvivalenttien ylimäärää metallisuoloja ja metalloidun nukleiinihapon puhdistaminen metallisuolasta ja reagoimattomista nukleiinihapoista vaatii useita kromatografisia puhdistuskertoja.⁵¹ Huomattavaa on myös, että elohopeaioni Hg(II) sitoutuu kovalenttisesti jo miedoissa olosuhteissa myös sytosiiniin ja urasiiliin C5-hiiliin.⁸⁷ Tästä syystä keinotekoisien nukleiinihapon sytosiinit ja urasiilit on korvattu 5-metyylisytosiineilla ja tymiineillä, jotta merkurointi on saatu ohjattua haluttuun kohtaan. Lyhyillä

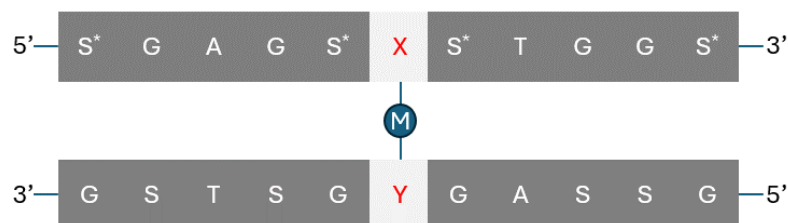
nukleiinihapoilla selektiivinen merkurointi edellä mainituilla muokkauksilla on onnistunut.^{88,90,91,95–98}

Kolmantena vaihtoehtona on valmistaa koko nukleoemäs metallikomplekseineen erillään nukleiinihaposta. Nukleiinihapo muokataan siten, että halutusta reaktiokohdasta löytyy uniikki ”kahva”, jonka kanssa nukleoemäs muodostaa liitoksen esimerkiksi Michael-addition kautta.^{99–106} Tämän vaihtoehdon merkittävänä etuna on eri reaktio-olosuhteet nukleiinihapolle ja metalloidulle nukleoemäkselle sekä reaktiokohdan tarkka säätely. Haittapuolena on tilaa vievät liitoskohdat.

1.6 Metallin valinta metallivälitteiseen emäspariutumiseen biologisesti merkittävien sekvenssien tunnistamisessa

Organometallisia, nukleiinihappoihin kovalenttisesti sitoutuneita metalli-ioneja ovat tähän mennessä koboltti^{107–110}, rauta⁸⁵, elohopea⁸⁹, palladium⁷⁹, platina¹¹¹ ja tina^{86,112,113}. Keinotekoisien nukleiinihapon käyttötarkoitus kuitenkin rajaa käytettävien metallien määrää. Biologisesti merkittävien sekvenssien tunnistamiseen tarkoitettujen korkea-affiniteettisten nukleiinihappojen sisältämien organometallisten koordinaatiokompleksien tulee olla vähintäänkin fysikokemiallisilta ominaisuuksiltaan pysyviä fysiologisissa nesteissä, kuten plasmassa ja solun sisäisissä nesteissä, koordinaatiokompleksi ei saa olla niin tilaa vievä että se vääristäisi kaksoiskierteen avaruudellisia mittasuhteita, sen tulee ylläpitää emästen tasomaista orientaatiota tukirankaan nähden sekä koordinaatiokompleksin sisältämän metalli-ionin tulee olla kykeneväinen pariutumaan (kineettisesti riittävän labiili), eli muodostamaan koordinaatiosidos vähintään yhden biologisesti esiintyvän nukleoemäksen kanssa.

Turun Yliopiston bio-organisen tutkimusryhmä on tällä hetkellä ainoa metallivälitteistä pariutumista edellä mainituilla kriteereillä tutkiva ryhmä. Tutkimusryhmän tutkijia metalli-ioneja ovat olleet Hg(II) ja Pd(II). Tutkimusryhmä on tutkinut kaikkien esiteltyjen nukleotidianalogien hybridisaatiota samalla 11 emäksen pituisella sekvenssillä (Kuva 3).

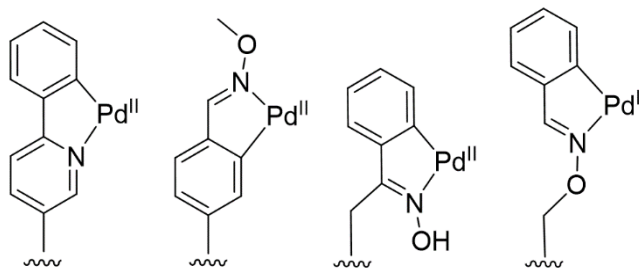


Kuva 3. Turun Yliopiston bio-organisen tutkimusryhmän käyttämä sekvenssi metallivälitteisen emäspariutumisen tutkimiseen ja sen komplementaarinen juoste. X = nukleotidianalogi, Y= adeniini, sytosiini, guaniini tai tymiini, M = kovalenttisesti nukleotidianalogiin sitoutunut metalli-ioni. *Elohopeavälitteisessä pariutumisessa keinotekoisien nukleiinihapon sytosiinit on korvattu 5-metyylisytosiinilla.

1.7 Palladium

Palladium-ioni Pd(II) täyttää teoriassa edellisen kappaleen kriteerit. Pd(II)-ioni muodostaa koordinaatiogeometrialtaan pääosin nelikulmaisia tasomaisia koordinaatorakenteita, jotka soveltuvat kaksoiskierteen sisälle niin emäspinoutumisen kuin mittasuhteidensa näkökulmasta, mikäli ligandit eivät ole liian tilaa vievät.^{54,114} Pd(II)-ionin ja hiilen välinen sidos on luonteeltaan vahvasti kovalenttinen ja siten dissosiaatioalttius fysiologisissa nesteissä on vähäinen. Pd(II) on pehmeä metalli, ja sen affiniteetti nukleoemäksiin on korkea, joten koordinaatiosidoksen muodostuminen luonnollisen emäksen kanssa on todennäköinen.^{51,54}

Organometallisen palladiumkompleksin valmistaminen onnistuu post-synteettisellä metalloinnilla. Ohjaavia ligandeja sisältävät aromaattiset rengasrakenteet osallistuvat syklopalladointiin miedoissa reaktio-olosuhteissa, joita nukleiinihapot kestävät.^{51,93,100}



Kuva 4. Turun Yliopiston bio-organisessa tutkimusryhmässä tutkitut organometalliset palladiumkompleksit.^{93,115}

Palladiumvälitteinen metallipariutumisen ja sen tutkiminen on osoittautunut kuitenkin haasteelliseksi (kuva 4). Pd(II)-välitteisten emäsparien muutokset lämpötilan vaikutuksesta ovat monimutkaisia ja hitaita, mikä vaikuttaa sulamiskäyrien tulkintaan ja tekee UV-sulamislämpömittauksista vähemmän luotettavia.⁵¹ UV-sulamislämpömittaukset perustuvat nukleiinihappojen ”hengittämiseen”, eli kaksoiskierteiden aukeamiseen ja uudelleensulkeutumiseen. Luonnollisten nukleiinihappojen kaksoiskierteet avautuvat ja sulkeutuvat nopeasti (DNA:n ”hengittäminen”, kappale 1.1.1) ja yksivaiheisesti (kiinni– auki–kiinni) lämpötilan noustessa ja laskiessa. Pd(II)-välitteisen emäsparin sisältävät kaksoiskierteet aukeavat sen sijaan monivaiheisesti (esimerkiksi, kiinni–osittain auki–kokonaan auki–osittain kiinni–kiinni) ja usein kaksoiskierteen purkautumisen ja uudelleen sulkeutumisen välillä on havaittu hystereesiä, eli muutoksen hitautta ja kaksoiskierteen aukeamisen ja uudelleensulkeutumisen sulamiskäyrien merkittävää eroavuutta.^{93,116,117} UV-sulamislämpötilamittauksia on yritetty korvata FRET-analyysillä¹¹⁷ (FRET = *engl.* fluorescent resonance energy transfer, fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto) ja ¹⁵NMR spektroskopiolla¹¹⁵ keskinkertaisin tuloksin.⁵¹

Tutkimusmetodien haasteiden lisäksi tutkittujen palladiumkompleksien havaittiin olevan kaksoiskierteiden päissä stabiloivia ja keskellä epästabiloivia. Tämä on tyypillistä koordinaatiokomplekseilla, jotka eivät täysin sovi geometrialtaan kaksoiskierteen sisään.^{118,119} Parhaimmillaan kaksoiskierteiden sulamislämmöt nousivat lähelle muokkaamattomia kaksoiskierteitä.⁵¹

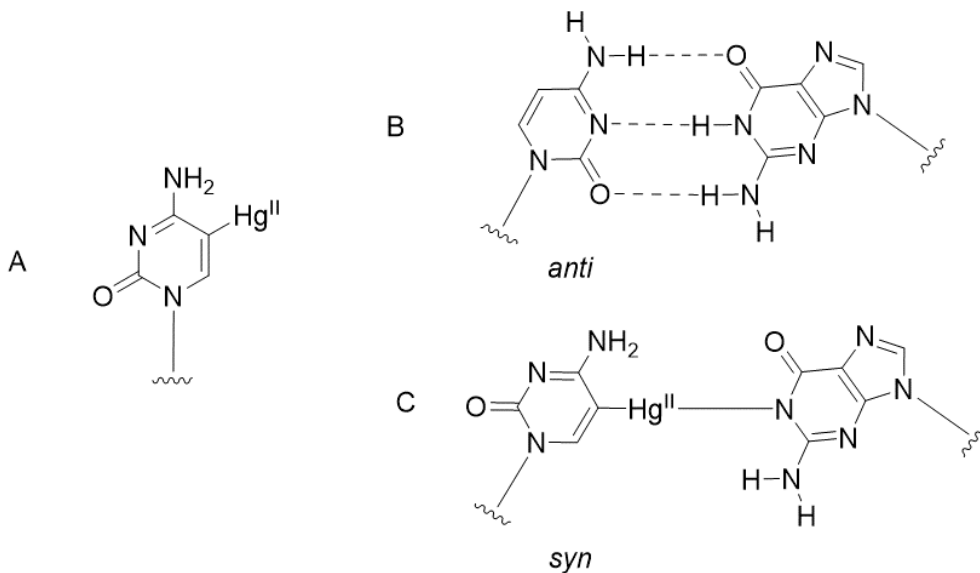
1.8 Elohopea

Elohopeaioni Hg(II) muodostaa pääosin koordinaatiokemialtaan lineaarisia koordinaatorakenteita. Se on HSAB-teorian mukaan pehmeä metalli ja Pd(II):n tavoin sillä on korkea affiniteetti nukleoemäksiin ja se kykenee muodostamaan hiilen kanssa koordinaatiosidoksia, jotka ovat luonteeltaan vahvasti kovalenttisia. Keinotekoisien nukleiinihappojen metallointi onnistuu post-synteettisesti (kts. kappale 1.5.3).

Ensimmäinen ja tutkituin metallivälitteinen emäspari oli Hg(II)-ionin vakauttama T:T väärinpariutuma, jossa Hg(II) muodosti metallisillan tyymiinien N3-atomeihin, muodostaen N3–Hg^{II}–N3 koordinaatiokompleksin. Koordinaatiokompleksi nosti merkittävästi väärinpariutumisen sisältävän kaksoiskierteen pysyvyyttä, sekä osoittautui mukailevan Watson-Crick-emäsparin mittasuhteita^{120–125}.

1.8.1 5-merkurisytoosiini

Koska Hg(II) sitoutuu kovalenttisesti miedoissa olosuhteissa sytosiinien ja urasiilien C5-atomeihin⁸⁷, 5-merkurisytoosiini oli luonteva ensimmäinen ehdokas organometallisen metallivälitteisen emäspariutumisen tutkimiseen Turun Yliopiston bio-orgaanisessa tutkimusryhmässä. 5-merkurisytoosiinissa kompleksoituva Hg(II)-ioni ei sijaitse emäksen Watson-Crick-laidalla, vaan emäspariutuminen edellyttää sytosiinin glykosididoksen C1'–N1 rotaatiota siten, että emäksen asento muuttuu *anti*-asennosta *syn*-asentoon (kuva 5).⁸⁸ *Anti*-asennossa Watson-Crick laita on kohti vastakkaista emästä ja emäs on pääosin työntynyt kohti kaksoiskierteen keskustaa. *Syn*-asennossa Watson-Crick-laita on kohti tukirankaa. Luonnollisissa emäksissä *anti*- ja *syn*-asennot ovat matalaenergisimmät orientaatiot emäksille, *anti*-asennon ollessa kaikkien neljän emäksen kohdalla energeettisesti edullisin.⁵

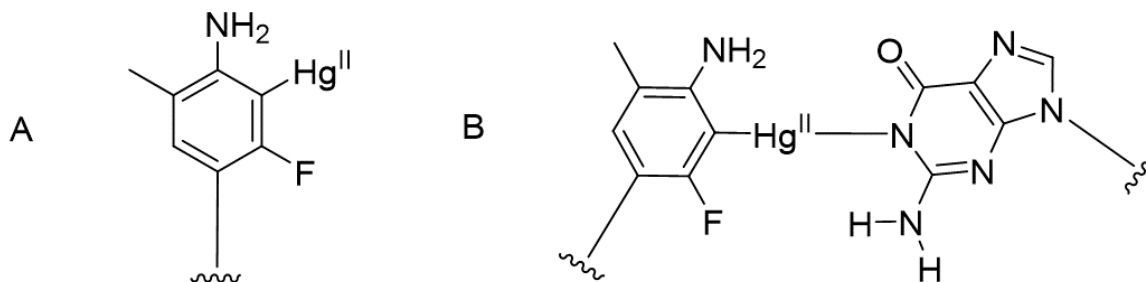


Kuva 5. A) 5-merkurisytosiini B) Sytosiinin ja guaniinin muodostama Watson-Crick emäspari C) 5-merkurisytosiinin elohopeavälitteinen emäspari guaniinin kanssa.

Täten tutkittavalla emäsanalogilla on ”kahdet kasvot” jotka olivat kykeneväisiä muodostamaan emäsparin. 5-merkurisytosiinin havaittiin pariutuvan vahvasti deprotonoituvien tymiinin ja guaniinin kanssa, kun taas adeniinin ja sytosiinin kanssa pariutuminen oli heikompaa kuin yhdenkään luonnollisen emäksen muodostaman väärinpariutuman. Hybridisaatiokoetimella, jonka pariutuminen perustuisi 5-merkurisytosiinin muodostamaan metallivälitteiseen emäspariin, kyettäisiin erottamaan UV-sulamislämpötilamittauksilla guaniini adeniinista ja sytosiini tymiinistä, mutta ei adeniinia sytosiinista.

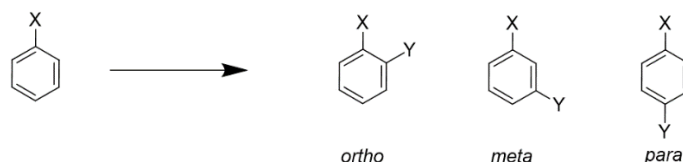
1.8.2 3-fluori-2-merkuri-6-metyylianiiliini

Avaruudellisesta näkökulmasta isoin muutos sytosiinin ja 3-fluoro-2-merkuri-6-metyylianiiliinin (kuva 6) välillä on varmasti okso-substituentin poistuminen *para*-asemasta merkuroituun kohtaan nähden.



Kuva 6. A) 3-fluori-2-merkuri-6-metyylianiiliini B) 3-fluori-2-merkuri-6-metyylianiiliinin ehdotettu metallivälitteinen pariutuminen guaniinin kanssa.

Pyrimidiiniemäksien suurempi taipumus *anti*-asentoon perustuu osin siihen, että *syn*-asennossa nimenomaan happi on epäsuotuisassa kontaktissa 5'-fosfaattiryhmän kanssa. Pyrimidiiniin ollessa *syn*-asennossa happiatomi on *para*-asemassa C5-hiileen (merkuroituvaan hiileen) nähden⁵. *N*-glykosididoksen vaihtaminen *C*-glykosididokseen vähentää glykosididoksen labiiliutta.¹²⁶ Tymiinin rengasrakenteen vaihto aniliinin helpottaa substituenttien synteesiä ja niiden vaikutusten hallintaa merkurointia ohjaavina ryhminä (kuva 7).



Kuva 7. Aromaattisen renkaan substituentilla (X) on usein vaikutusta, mihin asemaan (*ortho*, *meta*, *para*) elektrofiili Y substituoituu.

3-fluori-6-metyylianiiliinissa on myös yksi merkittävä lisäys, nimittäin fluori C3-hiilessä. Deaktivoiva fluoriryhmä C3-hiilessä ja aktivoiva aminoryhmä C1-hiilessä vahvistavat toistensa *ortho*-ohjaavaa vaikutusta C2-hiilen merkurointiin (taulukko 1). Fluoriryhmä on pääasiassa *para*-asemaan ohjaava, mutta metyyliryhmä C6-hiilessä estää merkuroitumisen *para*-asemaan. Ohjaavan vaikutuksen lisäksi fluoriryhmä toimii myös leima-aineena ¹⁹F-NMR-spektroskopiassa. Fluorileima mahdollistaa metallivälitteisen pariutumisen sekundaarirakenteen ja atomitason seurannan aniliinissa, joka ei sisällä endosyklisiä, ¹⁵N-leimaukseen soveltuvia typpi-atomeja.

Taulukko 1. Eri substituenttien vaikutuksia aromaattisen renkaan elektrofiiliseen substituutioon.

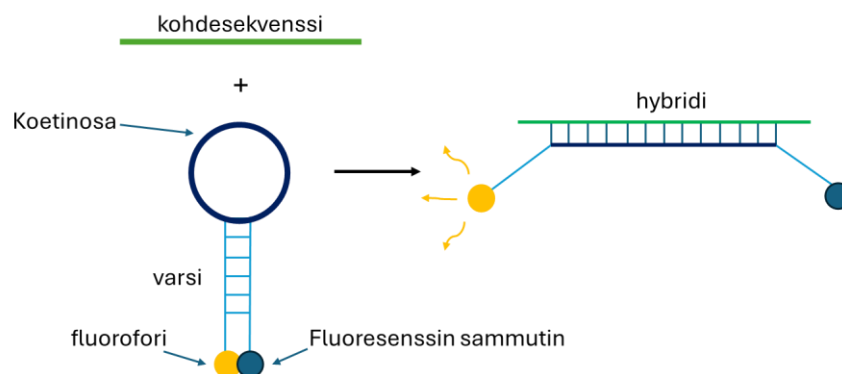
Elektronegatiivinen vaikutus	Ryhmä/yhdiste	Aktivaatio	Suunta
elektronien luovutus konjugaation kautta	aniliinin -NH ₂	vahvasti aktivoiva	<i>ortho</i> , <i>para</i>
elektronien luovutus induktiivisesti	alkyyli	aktivoiva	<i>ortho</i> , <i>para</i> , vähäisemmässä määrin <i>meta</i>
elektronien luovutus konjugaatiolla ja elektronien vetäminen induktiivisesti	-F	deaktivoiva	<i>para</i> , vähäisemmässä määrin <i>ortho</i>
elektronien vetäminen induktiivisesti	-CF ₃	deaktivoiva	<i>meta</i>
elektronien luovutus konjugaation kautta	-NR ₂	vahvasti aktivoiva	<i>ortho</i> , <i>para</i>

3-fluori-2-merkuri-6-metyylianiiliinin metallivälitteinen pariutuminen nosti kaksoiskierteiden sulamislämpötiloja kaikkien kanonisten vastinemästen kohdalla, erityisesti tymiin, verrattuna merkuroitumattomaan nukleotidianalogiin. Guaniinin ja tymiin kohdalla metallivälitteisen pariutumisen sulamislämpötilat olivat korkeammat kuin kanonisen Watson-Crick A-T parin.

Sulamislämpötilat erottuivat toisistaan vähintään 6 celsiusasteella, mahdollistaen kanonisten emästen luotettavan erotuskyvyn UV-sulamislämpötilamittauksilla. Saadut sulamislämpötilat olivat suuruusjärjestyksessä $A < C < G < T$. Vastinemäket kyettiin erottamaan toisistaan myös ^{19}F NMR-spektroskooppisesti. ^{19}F NMR-spektroskopiolla kyettiin tämän lisäksi todentamaan Hg(II)-ionin dissosiaatio.⁹⁰

1.8.3 Molekulaarinen majakkakoetin

Molekulaarisen majakkakoettimen toiminta perustuu rakenteeseen, joka muistuttaa hiuspinniä. Rakenteessa on silmukka, varsi ja varren päässä fluorofori ja fluoresenssin sammutin. Silmukka sisältää koetinosan, johon kohdesekvenssi pariutuu komplementaarisesti. Kohdesekvenssin pariutuessa hybrisaatiokoettimen kanssa, varsiosan kaksoiskierre purkaantuu (kuva 9). Koetinosan hybridisaation on oltava voimakkaampaa kuin varsiosaa yhdessä pitävien voimien, jotta rakenne suoristuisi. Hiuspinnirakenteen avautuessa varsiosan 5'-päättyyn kovalenttisesti kiinnitetty fluorofori poistuu 3'-päättyyn kovalenttisesti kiinnitetystä fluoresenssin sammuttajan vuorovaikutuksesta ja fluoroforin fluoresenssi voidaan havaita.¹²⁷



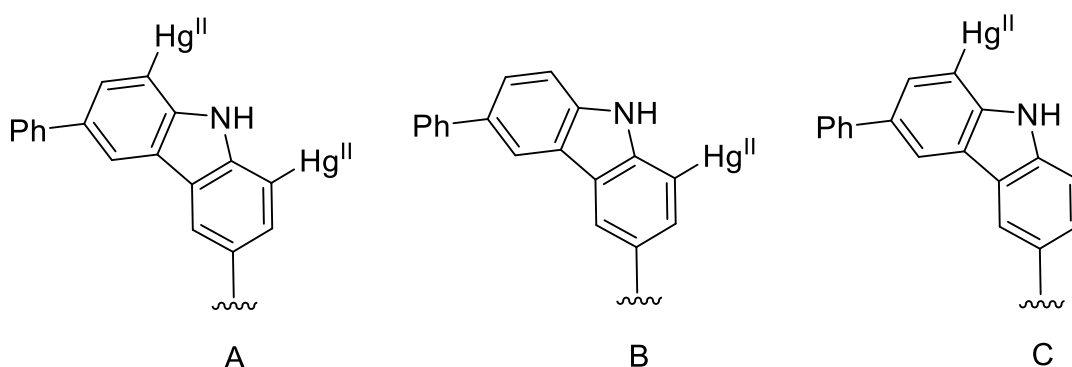
Kuva 8. Karkea kuvitus molekulaarisen "majakkakoettimen" toimintaperiaatteesta. Kohdesekvenssi hybridisoituu silmukassa olevaan hybrisaatiokoettimeen ja hybridisaation vaikutuksesta hiuspinni-rakenne purkautuu. Purkautumisen yhteydessä fluorofori ja fluoresenssin sammutin joutuvat erilleen toisistaan ja fluoroforin fluoresenssi voidaan havaita.

Koska 3-fluori-2-merkuri-6-aniliini osoittautui erotuskyvyltään erinomaiseksi niin UV-sulamislämpötilamittauksissa kuin ^{19}F NMR spektroskopiassa, nukleotidianalogia testattiin onnistuneesti myös FRET-ilmiöön (FRET = *engl.* fluorescent resonance energy transfer, fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto) pohjautuvassa molekulaarisessa "majakkakoettimessa" (*engl.* molecular beacon). 3-fluori-2-merkuri-6-aniliinin metallivälitteisellä pariutumisella kyettiin erottamaan kaikki vastinemäket toisistaan, fluoresenssien intensiteetit olivat suuruusjärjestyksessä: $A < C \ll T < G$.

Fluorensenssi tymiinin ja guaniinin kohdalla oli merkittävästi vahvempaa kuin adeniinin ja sytosiinin kohdalla.⁹⁶

1.8.4 Karbatsolit: 1,8-dimerkuri-6-fenyylikarbatsoli, 1-merkuri-6-fenyylikarbatsoli ja 8-merkuri-6-fenyylikarbatsoli

Sytosiiniin ja aniliinin perustuvien nukleotidianalogien lisäksi tutkimusryhmä on tutkinut elohopeavälitteistä pariutumista karbatsolipohjaisilla nukleotidianalogeilla. 1,8-dimerkuri-6-fenyylikarbatsoli⁹⁸, 1-merkuri-6-fenyylikarbatsoli ja 8-merkuri-6-fenyylikarbatsolin⁹⁷ pariutumista tutkittiin aiemmin (kts. kappale 1.6) mainitulla sekvensseillä.



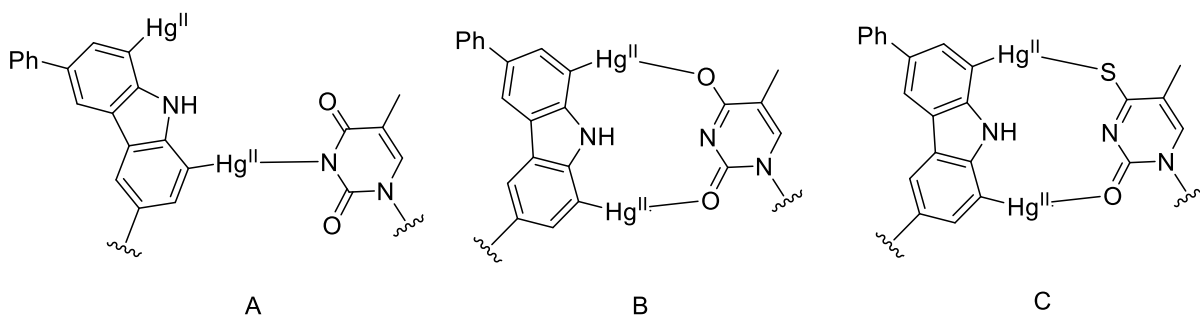
Kuva 9. A) 1,8-dimerkuri-6-fenyylikarbatsoli B) 1-merkuri-6-fenyylikarbatsoli C) 8-merkuri-6-fenyylikarbatsoli.

Karbatsolien metallaatio toteutettiin post-synteettisesti. Karbatsolien sisältämä aminoryhmä on vahvasti *ortho*- ja *para*-ohjaava. Neljästä mahdollisesta *ortho*-asemasta kaksi on sitoutuneita toisiinsa ja kaksi vapaana. *Para*-asemien merkurointi on estetty fenyyli-ryhmällä C6-hiilestä ja C3-hiilestä lähtevä C-glykosidisisidos estää toisen. *Ortho*-asemien merkuroituessa toisiaan vastaavilla reaktionopeuksilla merkurointia ei edes yritetty ohjata erikseen C1- ja C8-hiiliin, vaan merkuroinnin eteneminen keskeytettiin ennen aikaisesti, jotta merkurointi olisi vain osittaista osassa reaktiotuotteita. Reaktioseoksesta erotettiin kromatografisesti kaikki kolme edellä mainittua, merkuroitua karbatsolia, joten valittu tapa oli toimiva.

Karbatsolien muodostamien metallivälitteisten kaksoiskierteiden UV-sulamislämpötilat noudattivat aiempien merkuroitujen nukleotidianalogien suuruusjärjestystä A<C<G<T. Adeniinin ja sytosiinin kohdalla kaksoiskierteiden sulamislämpötilat vastasivat aiemmin tutkittujen nukleotidianalogien tuloksia, mutta erityisesti guaniinin ja tyymiinin kohdalla sulamislämpötilat olivat hieman alempia. 1-merkuri-6-fenyylikarbatsolin metallivälitteinen pariutuminen kanonisten vastinemästen kanssa johti 3-fluori-2-merkuri-6-aniilin veroiseen erotuskykyyn.

Karbatsolien metallivälitteinen pariutuminen poikkesi aiemmista nukleotidianalogeista, etenkin dimerkuroidulla 1,8-dimerkuri-6-fenyylikarbatsolilla. DFT-laskennallisen optimoinnin (*engl.* Density Functional Theory = tiheysfunktioaaliteoria) avulla saatujen arvioiden mukaan elohopeaionit muodostivat koordinaatiosidokset tyymiin molempiin oksosubstituentteihin (O2 ja O4) tyymiinin endosyklisen N3-typen sijaan.

Tämä sitoutumistapa on erityisen suosiollinen harvinaisten luonnollisten emästen, 2- ja 4-tiopyrimidiinien näkökulmasta, jossa pyrimidiinimäksen C2- tai C4-hiilessä on tioliryhmä. Pehmeällä elohopeaionilla on hyvin vahva affiniteetti rikkiin. Tutkimusryhmä tutki kaikkien karbatsolien metallivälitteistä pariutumista 2- ja 4-tiolityymiineihin. Jokaisen metallivälitteisen kaksoiskierteen sulamislämpötila nousi vähintään 75 celsiusasteeseen, ja ne osoittivat hyvin suurta termodynaamista pysyvyyttä metalloitujen karbatsolinukleotidianalogien ja tiopyrimidiinien välillä. Dimerkuroidulla karbatsolilla kyettiin erottamaan tiotymiinit luonnollisista vastinemäksistä, ja molemmilla monimerkuroiduilla karbatsoleilla kyettiin erottamaan 2- ja 4-tiopyrimidiinit toisistaan. 1-merkuri-6-fenyylikarbatsolin erotuskyky niin luonnollisten vastinjuosteiden kuin tiotymiinien kohdalla oli vaikuttavinta.



Kuva 10. Karbatsolien pariutuminen oli DFT-optimoinnin mukaan aniliinipohjaisista nukleotidianalogeista poikkeavaa^{97,98}. A) 1,8-dimerkuri-6-fenyylikarbatsolin elohopeavälitteinen pariutuminen tyymiiniin, jos se noudattaisi aiemmin tutkittuja nukleotidianalogeja B) 1,8-dimerkuri-6-fenyylikarbatsolin pariutuminen elohopeavälitteisesti tyymiiniin DFT-optimoinnin mukaan⁹⁸ C) 1,8-dimerkuri-6-fenyylikarbatsolin pariutuminen elohopeavälitteisesti 4-tiotymiiniin⁹⁷.

Tionukleosideilla on harvinaisuudestaan huolimatta useita biologisesti merkittäviä tehtäviä^{128–136} ja niiden puuttumisella on yhteyksiä useisiin sairauksiin^{137–144}. Tionukleosidien harvinaisuuden ja merkityksen vuoksi karbatsolit tarjoavat potentiaalisen vaihtoehdon niiden tunnistamiseen biologisesti merkittävistä sekvensseistä.

1.9 Metallivälitteisen hybridisaation analysointi termodynaamisin menetelmin

Hybridisaatiota voidaan tutkia useilla, toisiaan täydentävillä menetelmillä. Useat toisistaan riippumattomat tutkimustavat ovat välttämättömiä luotettavan lopputuloksen saamiseksi.

Termodynamiikan avulla voidaan tutkia rakenteellisia muutoksia, kuten pariutumista tai poimuttumista. Gibbsin energia, entropia, entalpia ja lämpökapasiteetti muuttuvat, ja niiden muutosta voidaan mitata^{145,146}. Koettimien hybridisaatiota tutkiessa yleisimmät käytetyt analyysit ovat UV-sulamislämpötilamittaukset sekä kalorimetriset menetelmät: DSC-kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry) ja ITC-kalorimetria (Isothermal Titration Calorimetry).^{145,146} Kaksoiskiirteen kierteisyyttä voidaan tutkia CD-spektroskopiolla (Circular Dichroism eli ympyrädikroismi).^{147,148}

1.9.1 UV-spektroskopia

UV-spektroskopiolla voidaan tutkia kaksoiskiirteen denaturaatiota ja renaturaatiota eli purkautumista erillisiksi juosteiksi ja uudelleen sulkeutumista kaksoiskierteeksi, joka vastaa DNA:n ”hengittämistä”. Kaksoiskierre absorboi UV-valoa eri tavalla kuin yksittäinen juoste ja absorboidun valon määrän mittauksella voidaan saada tietoa esimerkiksi lämpötilan vaikutuksesta kaksoiskiirteen denaturoitumiseen. Kun kaksoiskierre denaturoituu lämpötilan vaikutuksesta, sitä kutsutaan sulamiseksi. Sulamislämpötila T_m on arvo, jossa tutkittavassa liuoksessa on puolet kaksoiskierrettä ja puolet yksittäisiä juosteita. T_m -arvoa käytetään usein vertailtaessa kaksoiskierteiden pysyvyyksiä.

UV-sulamislämpötilamittauksilla arvioidaan pääasiassa hybridisaatiossa muodostuneen kaksoiskiirteen termodynaamista pysyvyyttä. Termodynaamista pysyvyyttä voidaan mitata mittaamalla vapaan energian erotus lopputuotteen (kuten kaksoiskiirteen) ja alkutuotteiden välillä (yksittäiset juosteet). Termodynaamisia suureita ei voida mitata suoraan, mutta niiden muutosta voi. Termodynaamisia suureita ovat Gibbsin energia G , entalpia H , lämpökapasiteetti C_p , ja entropia S . UV-sulamislämpötilamittauksien perusteella voidaan laskea ΔG , ΔH ja ΔS Van't Hoffin yhtälön avulla.^{149–151} Lämpökapasiteetti ΔC_p mitataan luotettavasti vain kalorimetrisellä mittauksella¹⁴⁵. Rakenteen, kuten kaksoiskiirteen termodynaaminen potentiaali, eli Gibbsin energia koostuu nukleiinihappojen kohdalla useasta osasta, joista kukin koostuu entalpisesta ja entropisesta osuudesta (kaavio 1). Gibbsin energian muutos kertoo tietyn prosessin tai reaktion suunnan. Suuri ja negatiivinen arvo kuvaa reaktiota, joka suosii reaktion lopputuotteita.

Entalpia kuvaa rakenteen sisäenergioita tietyssä paineessa ja tilavuudessa. Entalpian muutos ΔH kuvaa reaktion lämpösisältöä; esimerkiksi sidosten rikkoutuminen vaatii energiaa ja sidosten muodostuminen vapauttaa sitä. Energiaa vaativat reaktiot (endotermiset) tuottavat positiivisen arvon, ja energiaa vapauttavat (eksotermiset) reaktiot tuottavat negatiivisen entalpian muutoksen ΔH . Entropia ilmaisee epäjärjestyksen määrää, ja siihen vaikuttavat geometriaa vahvasti säätelevien sidosten tai vuorovaikutuksien määrä (jäykkä rakenne tuottaa negatiivisemmän arvon kuin joustava).^{151,152}

Gibbsin energian muutos, ΔG_{kok} koostuu useasta osatekijästä, jotka voidaan nukleiinihappojen kohdalla jakaa useaan eri lähteeseen.¹⁵³

$$\Delta G_{\text{kok}} = \Delta G_{\text{konf}} + \Delta G_C + \Delta G_{\text{pol}} + \Delta G_v + \Delta G_{r-t} + \Delta G_W + \Delta G_H + \Delta G_{\text{sidokset}} + \Delta G_{\text{el}} \quad (1)$$

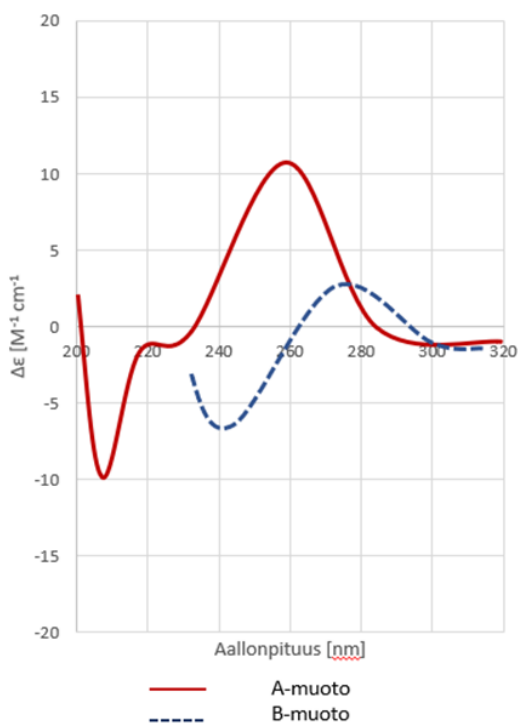
ΔG_{konf} kuvaa kaksoiskiirteen ja yksittäisten juosteiden konformaatioiden eroja, kuten rotameerien kiertymisen estymistä (pääosin entropinen); ΔG_C kuvaa Coulombin lakia (pääosin entalpinen); ΔG_{pol} kuvaa polyelektrolyyttistä vaikutusta (pääosin entropinen); $\Delta G_{(v)}$ kuvaa hydraation vaikutusta (entropinen); $\Delta G_{(r-e)}$ kuvaa rotaation ja etenemisliikkeen vapautta (entropinen); $\Delta G_{(W)}$ van der Waals; $\Delta G_{(H)}$ vetysidoksia (entalpinen); $\Delta G_{(\text{sidokset})}$ kuvaavat sidosten pituuksien ja sidoskulmien vaikutusta (entalpinen); $\Delta G_{(\text{el})}$ kuvaa sähköisiä vuorovaikutuksia, kuten polarisaatiota (entalpinen).¹⁵³

UV-spektroskooppista tutkimusta voidaan myös vahvistaa leimaamalla tutkittava molekyyli fluoresoivilla leima-aineilla, jolloin tutkittavaa molekyyliä tarvitaan huomattavasti vähemmän¹⁵⁴. UV-sulamislämpömittauksissa yleisoletuksena on, että reaktio etenee yksivaiheisena, eli kaksoiskierre denaturoituu suoraan yksittäisiksi juosteiksi. Oletuksen soveltuvuutta voidaan testata kalorimetrisellä mittauksella, DSC-kalorimetrillä (Differential scanning calorimetry). Mikäli DSC-kalorimetrisellä mittauksella saatu entalpian ΔH_{cal} arvo on yhtä suuri kuin sulamiskäyrästä Van't Hoffin yhtälön avulla laskettu entalpia ΔH_{VH} , oletusta yksivaiheisuudesta voidaan käyttää ja yhtälö on luotettava. Mikäli $\Delta H_{\text{VH}} < \Delta H_{\text{cal}}$, reaktioon sisältyy mahdollisesti myös huomioon otettavia välivaiheita.¹⁴⁹ Oletus yksivaiheisuudesta sopii parhaiten kaksoiskierteille, joiden pituus on alle 12 emäsparia¹⁵⁵. UV-spektroskopian etuja ovat nopeus, edulliset laitteistot sekä suhteellisen pienet näytemäärät (2,5–250 μM)¹⁴⁶.

1.9.2 Ympyrädikroismispektroskopia (CD)

Ympyrädikroismispektroskopiassa (CD eli circular dichroism) kiraaliset molekyylit ovat vuorovaikutuksessa pyöröpolaroituneen elektromagneettisen säteilyn kanssa. Oikea- ja vasenkierteinen pyöröpolaroitunut valo absorboituu kiraalisiin molekyyliin eri tavoin, ja tätä eroa kutsutaan ympyrädikroismiksi.¹⁴⁷ Ympyrädikroismispektroskopialla voidaan seurata nukleiinihappojen, kuten DNA:n ja RNA:n rakenteen muutoksia alati muuttuvissa olosuhteissa (muun muassa suolapitoisuus, lämpötila). Koska ympyrädikroismispektroskopialla voidaan mitata sekundaarirakenteen muutoksia lämpötilan muuttuessa, sillä voidaan myös tutkia kaksoiskierteiden sulamislämpöjä. Sulamislämpötila perustuu tällöin kierteisyyden häviämiseen. Ympyrädikroismispektroskopia on herkkä menetelmä, joka mahdollistaa jo hyvin pienten määrien tutkimisen (DNA:n konsentraatiolla 20 $\mu\text{g/ml}$), mutta sillä on mahdollista tutkia myös pitkiä nukleiinihappoja¹⁴⁷. Menetelmä on halpa ja nopea, mikä on eduksi rutiininomaisessa reaktioiden ja

muutosten seurannassa. Metallivälitteisen pariutumisen seurannassa yksi mielenkiinnon kohde on, muodostaako kaksoiskierre luonnollista vastaavan kierteen vai aiheuttaako metallivälitteinen pariutuminen merkittäviä muutoksia kaksoiskiirteen sekundaarirakenteeseen. B-muotoinen kaksoiskierre on tyypillinen DNA:ssa ja A-muotoinen kaksoiskierre RNA:ssa sekä RNA/DNA-hybrideissä. Molemmilla on tunnistettavissa oleva, karakteristinen ympyrädikroismispektri. A-muotoinen kaksoiskierre antaa karakteristisen spektrin, jossa on vallitseva maksimi noin 260 nm:n aallonpituudella, noin $7\text{--}12 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$:n intensiteetillä sekä negatiivinen minimi noin 210 nm:n kohdalla.¹⁴⁷ B-muotoinen kaksoiskierre antaa matalat (intensiteetti alle $5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ja loivat minimi ja maksimit negatiivisena 245 nm:n aallonpituudella ja positiivisena 260–280 nm:n aallonpituudella (Kuva 4).¹⁴⁷



Kuva 4. CD-spektri. Kuvitteelliset, karakteristiset spektrit A-muotoiselle ja B-muotoiselle kaksoiskierteille.

1.10 Yleisimmät tutkimusmenetelmät metallivälitteisten makromolekyylien atomitason seurantaan: NMR ja röntgenkristallografia

Ydinmagneettinen resonanssi (*engl.* Nuclear Magnetic Resonance, NMR) ja röntgenkristallografia (*engl.* X-ray crystallography) ovat olleet perinteisiä tutkimusmetodeja makromolekyylien atomitason rakenteiden ja niiden muutosten analysointiin ja seurantaan. Biomakromolekyylien rakenteiden analysoinnissa yleisesti käytetyt NMR-aktiiviset ytimet ^1H , ^{15}N sekä ^{13}C kärsivät signaalien taustakohinasta, ^{15}N - ja ^{13}C -ytimien kohdalla pitkistä mittausajoista ja ^1H -ytimien kohdalla

biomakromolekyylien koon kasvaessa signaalien suuresta lukumäärästä.^{156–159} Röntgenkristallografian suurimpana rajoitteena on biomakromolekyylien kiteytys. Oikeiden kiteytysolosuhteiden löytäminen voi olla hyvin haastavaa ja joissain tapauksissa mahdotonta. Röntgenkristallografiolla ei myöskään kyetä seuraamaan dynaamisia muutoksia, joissa välivaiheet voivat olla hyvin lyhytikäisiä.⁵

1.10.1 Röntgenkristallografia

Röntgenkristallografian tarkoituksena on saada kolmiulotteinen rakennekuva molekyylistä mahdollisimman luonnollisessa olomuodossa. Lopullinen rakennekuva muodostetaan saadun diffraktiokuvion avulla laskennallisesti ja kristallografin tulkinnalla. Fourier'n sarjan laskemiseen tarvitaan säteen aallonpituus, amplitudi ja vaihe. Aallonpituus on sama kuin lähteneen säteen aallonpituus. Kiteessä oleviin atomeihin osuva säteily diffraktoituu ja diffraktoituneista säteistä saadaan diffraktiokuvio, joista voidaan laskea intensiteetti. Intensiteetistä saadaan laskettua amplitudi. Aallon vaihe sen sijaan jää kokonaan havaitsematta ja tätä kutsutaan röntgenkristallografian vaiheongelmaksi. Vaiheongelmaa voidaan ratkaista useilla tavoilla. Kaikki vaiheongelman ratkaisut ovat vain arvioita, joten lopullisen kuvan muodostamiseen tarvitaan kristallografi, joka tulkitsee saatua kuvaa ja tekee siihen muutoksia tarvittaessa.

Makromolekyylien, kuten nukleiinihappojen ja proteiinien vaiheongelma on ollut pitkään hankala ratkaistava. Makromolekyylien kiteet ovat hauraita, joten röntgensäteiden aiheuttamat vahingot ovat pitäneet kiteiden säteilytysajat hyvin lyhyenä. Kryokristallografiolla on saatu parannettua kiteiden kestävyttä säteilytyksen aikana.¹⁶⁰ Kehittynyt kryotekniikka ja vaihtuvaa röntgenaallonpituutta tuottava synkrotoni ovat mahdollistaneet uusia menetelmiä.

Käytetyin menetelmä makromolekyylien tutkimiseen on tällä hetkellä MAD (multiwavelength anomalous diffraction).¹⁶¹ MAD-metodilla on saatu ratkaistua makromolekyylien vaiheongelma anomaaliseen sirontaan kykenevien atomien avulla. Anomaaliseen sirontaan kykenevät atomit ovat raskaita atomeita, joten vety, typpi ja happi eivät edistä anomaalista sirontaa. MAD-metodissa säteilytetään makromolekyyliä vaihtuvan röntgenaallonpituuden synkrotonilla, jolloin saadaan useita mittaussarjoja vaihtuvilla aallonpituuksilla. Näistä mittaussarjoista saadaan tarvittava määrä vaiheinformaatiota, ja elektronitiheyskartta voidaan ratkaista. Kun alkeiskopin elektronitiheydet on kartoitettu, kristallografin on luotava malli, joka sopii elektronitiheyskarttaan täydellisesti. Sidosten pituuksien, kulmien, konformaatioiden ja etäisyyksien lähimpiin ryhmiin on vastattava vakiintuneita arvoja. Yleensä on tiedossa yhdisteen kemiallinen koostumus, mutta ei konfirmaatiota.

Elohopeaa on käytetty laajalti anomaalisen sironnan tuottavana ytimenä nukleiinihapoissa.^{162,163} Kun makromolekyylisiin lisätään anomaalista sirontaa tuottava ydin, on tärkeää, että ydin sijoittuu kiteissä aina suunnilleen samaan paikkaan, sillä epäsäännöllisyys voi heikentää vaiheiden määrittystä.¹⁶² Kovalenttinen sitoutuminen tutkittavaan makromolekyylin palvelee tätä tarvetta.

Rakennekuvaa varten molekyyli on kiteytettävä, sillä yksittäinen molekyyli ei riitä diffraktoimaan röntgensädettä, vaan vasta usean alkeiskopin yhteisvaikutus saa aikaan detektoitavan diffraktiokuvion. Saatu rakennekuva onkin tästä syystä kaikkien yksittäisten molekyylien konformaatioiden ja mahdollisten säteilytysajan aiheuttamien muutoksien summa. Makromolekyylien kiteyttäminen on merkittävä pullonkaula röntgenkristallografian käyttämisessä, eikä sen ratkaisemiseksi ole tullut varsinaista läpimurtoa. Kiteyttäminen perustuu edelleen kiteytysolosuhteiden etsimiselle yrityksen ja erehdyksen kautta. Makromolekyylien kiteyttämistä hankaloittaa se, että suurin osa makromolekyyleistä on kiteytettävä niiden emäliuoksessa, joka on otettava huomioon kiteytysolosuhteita seuloessa.

Röntgenkristallografian käyttö makromolekyylin rakenteen tutkimisessa olisi harkittava tarkkaan, sillä se vaatii hyvin kalliita laitteita ja työmäärät ovat molekyylien valmistamisesta lähtien aikaa vieviä. Röntgenkristallografia on kuitenkin niin merkittävä menetelmä rakenteen tutkimiseen, että sen kehittyminen myös aiemmin hyvin haastavien, biologisesti merkittävien makromolekyylien osalta on tällä hetkellä nopeaa^{164–167}, eikä uusimpia kehityssuuntia käydä tässä tutkielmassa läpi.

1.10.2 ¹⁹F NMR-spektroskopia

Biomakromolekyylin leimaaminen fluorilla mahdollistaa vaihtoehtoisen, NMR-aktiivisen ¹⁹F-ytimen käytön yleisesti käytettyjen NMR-aktiivisten ytimien ¹H, ¹⁵N sekä ¹³C sijaan. Biomakromolekyylit eivät sisällä fluoria lainkaan ja fluorin 19-isotoopin herkkyys vastaa lähes vedyn 1-isotoopin herkkyyttä.¹⁶⁸ ¹⁹F NMR spektroskopia mahdollistaa jopa puhdistamattomien näytteiden tutkimisen, joka tietyissä tapauksissa on edellytys natiivin olomuodon tutkimiselle¹⁶⁹.

Vaikka fluori on erittäin yleinen alkuaine erityisesti maankuoren mineraaleissa, sitä ei juurikaan löydy elävistä organismeista tai niiden käyttämästä ravinnosta.^{168,170} Tästä syystä, etenkin terapeuttisessa ja diagnostisessa käytössä, fluori ei kärsi muualta näytteistä tulevista signaaleista. Fluorin ja hiilen välinen yksinkertainen sidos on vahvasti kovalenttinen sidos¹⁷¹ ja organofluori on lähes reagoimaton biologisessa ympäristössä.^{157,168,171} ¹⁹F on ainoa fluorin pysyvä isotooppi 100 %:n esiintyvyydellä ja sen spin-kvanttiluku on ½. Fluorin gyromagneettinen suhde on korkea ja sen herkkyys on 0,83 % vedyn herkkyydestä (taulukko 4). Korkea gyromagneettinen suhde tuo NMR-spektriin laajuutta. ¹⁹F:n herkkyyden ja olemattoman biologisen esiintyvyyden takia tutkittavan

näytteen puhdistaminen ei ole välttämätöntä. Tästä on erityistä hyötyä esimerkiksi supramolekulaaristen tapahtumien seurannassa ¹⁶⁹.

Taulukko 2¹⁷². NMR aktiivisten (spin $\frac{1}{2}$) ydinten ominaisuuksia.

Isotooppi	Esiintyvyys x/%	Gyromagneettinen suhde $\gamma/10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$	Suhteellinen herkkyys suhteessa ¹ H
¹ H	99,99	26,752	1,00
¹⁹F	100	25,181	0,83
¹³ C	1,07	6,728	$1,70 \times 10^{-4}$
¹⁵ N	0,368	-2,713	$3,84 \times 10^{-6}$
³¹ P	100	10,839	$6,65 \times 10^{-2}$

Perinteiset NMR-aktiiviset ytimet, kuten ¹H, ¹³C ja ¹⁵N, kärsivät biomakromolekyylien tutkimisessa muun muassa signaalien päällekkäisyyksistä, taustakohinasta ja ¹⁵N-ytimen kohdalla sen heikosta gyromagneettisesta suhteesta ja isotoopin alhaisesta esiintyvyydestä. ¹⁹F NMR-spektroskopia on osoittautunut luotettavaksi tavaksi tutkia biomakromolekyylien rakennetta.^{173–175}

Biomakromolekyylien (esim. proteiinit, DNA, RNA) rakenne ja konformaatiodynamiikka ovat tärkeitä niiden toiminnan ja vaikutustapojen ymmärtämiseksi. Suuren kokonsa vuoksi biomakromolekyylien tutkiminen tavanomaisin ¹³C-, ¹H- ja ¹⁵N- tai ¹H-HSQC NMR-tekniikoin on hankalaa. Röntgenkristallografiolla saadaan tarkka kuva rakenteesta, mutta dynaamisia muutoksia eri ympäristöissä (esim. muuttuvassa lämpötilassa) tai tapahtumaketjussa sillä on vaikea seurata. ¹⁹F NMR-mittauksin saadaan sekä rakennetietoa että tietoa dynaamisista muutoksista, kuten kokonaisista tapahtumaketjuista, joissa välivaiheet saattavat olla suhteellisen lyhytikäisiä^{159,169,176,177}.

1.11 SNP-tunnistus elohopeavälitteisten hybridisaatiokoettimien potentiaalisena sovelluskohteena

Korkea affiniteettiset, selektiiviset hybridisaatiokoettimet, kuten yllä esitellyt elohopeavälitteiset hybridisaatiokoettimet, yhdistettynä molekulaariseen ”majakkakoettiin” olisivat teoriassa erittäin luotettava lääketieteellinen ja diagnostinen sovellus biologisesti merkittävien sekvenssien tunnistamisessa. Genotyypin eli tarkan emäsjärjestyksen määrittäminen on olennaista perimän monimuotoisuuden ja siinä tapahtuvien variaatioiden vaikutusten ymmärtämiseksi. ”Majakkakoettimien” rajoitteena ovat olleet G-T- ja S-T-väärinpariutumiseen liittyvät väärät tulokset, sekä vaikeus tunnistaa yksittäisiä nukleotideja sekvenssistä^{178,179}. Turun yliopiston bio-organisen tutkimusryhmän tutkimustulokset termodynaamisesti hyvin pysyvien, korkea-

affiniteettisten ja selektiivisten organometallisten hybridisaatiokoettimien, erityisesti elohopeavälitteisten, yhdistäminen ”majakkakoettimien” jo todistettuun toimivuuteen biologisessa ympäristössä voisi tuoda ratkaisun yksittäisten nukleotidien monimuotoisuuksien luotettavampaan tunnistamiseen.

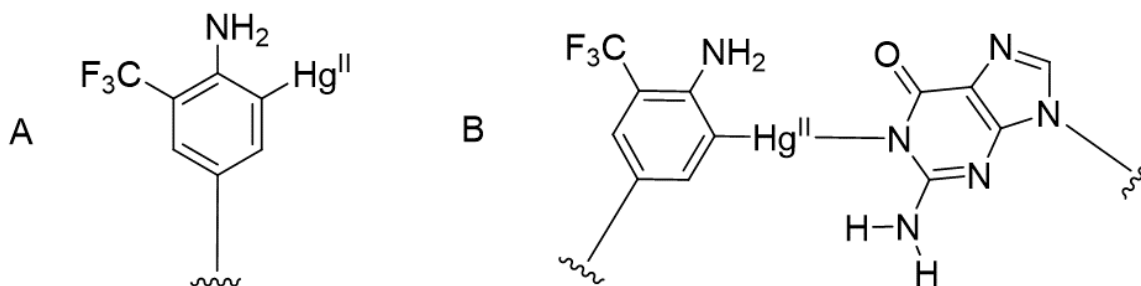
Snipit eli yhden nukleotidin monimuotoisuudet (*engl.* Single Nucleotide polymorphism, SNP) ovat yleisin variaation muoto ihmisen genomissa. Suurin osa snipeistä ei aiheuta minkäänlaista muutosta geenin ilmenemisessä, mutta osasta voi aiheutua vakavia sairauksia, kuten kystistä fibroosia.^{180,181} Ihmisen genomissa snippejä on noin joka tuhannennessa emäsparissa.^{182,183} Snippi määritellään yleisesti yhden nukleotidin variaationa, joka tapahtuu yli 1 %:ssa populaatiosta.¹⁸⁴ Vaikka snipit eivät aiheuttaisi sairauksia, niillä voi olla vaikutusta lääkkeiden farmakokinetiikkaan ja niiden tutkimisella voidaan päästä lähemmäs personoituja lääkkeitä.¹⁸⁵

Metalli-ionit tarjoavat useita eri lähestymistapoja snippien tunnistamiseen. Snippien tunnistaminen metalli-ionien avulla voidaan luokitella kolmeen eri kategoriaan.⁸³ Ensimmäisessä kategoriassa metalli-ioni osallistuu emäspariutumiseen tutkittavan emäksen ja hybridisaatiokoettimen välillä. Genotyypin määrittäminen perustuu hybridisaation affiniteetin mittaamiseen^{37,38,53,79,186,187} Toisessa kategoriassa koettimen sisältämä metallikompleksi tuottaa signaalin, joka on riippuvainen sen välittömässä läheisyydessä olevasta emäksestä^{96,188} Kolmannessa kategoriassa metallikompleksi toimii passiivisena merkkiaineena systeemissä, jossa snipin tunnistus perustuu yksinomaan WC-pariutumiseen^{189–192}.

2 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tässä pro gradu -tutkimusprojektissa valmistettiin 2-trifluorimetyylianiilinukleotidi, joka yhdistettiin fosforiamidiittistrategialla osaksi yhdentoista nukleotidin pituista oligonukleotidia juosteen 3'-päähän, juosteen keskelle ja 5'-päähän. Nukleotidianalogi oli tarkoitus merkuroida post-synteettisesti, mutta merkuroinnin hitauden ja puhdistusongelmien vuoksi siinä ei tässä työssä onnistuttu. Turun Yliopiston bio-orgaaninen tutkimusryhmä sai sittemmin nukleotidianalogin merkuroitua ja puhdistettua.

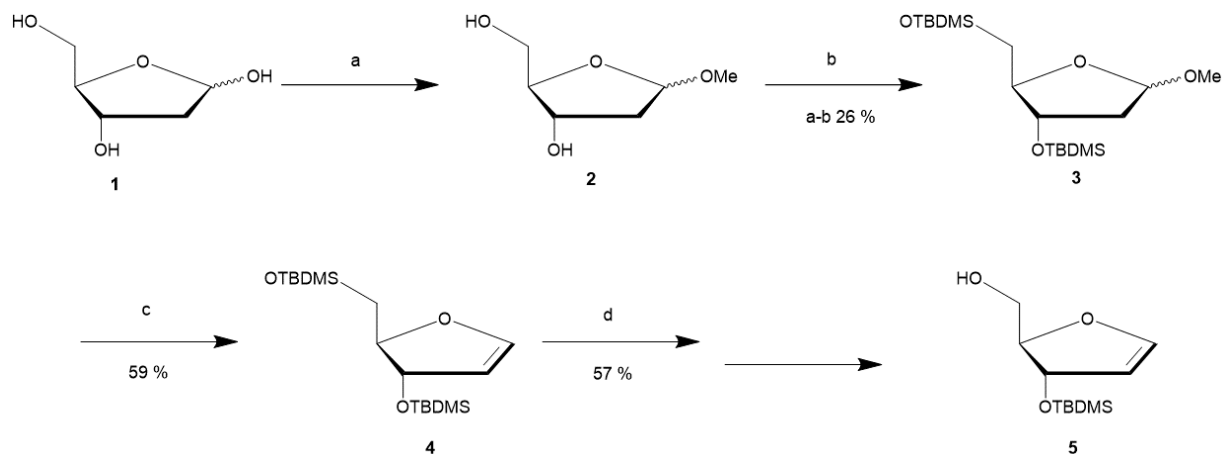
Fluori-leimana nukleotidianalogissa oli trifluorimetyyliryhmä C2-hiilessä (kuva 8). Trifluorimetyyliryhmä on vahvasti bentseenirenkaan elektronitiheyttä deaktivoiva ja elektrofiilisessa aromaattisessa substituutiossa *meta*-ohjaava. Keskenään kemiallisesti vastaavien fluoriatomien lisäys voimistaa ^{19}F -signaalia, verrattuna vain yhden fluoriatomin tuottamaan signaaliin. Paikanvaihdon myötä fluorileima sijoittui kaksoiskierteessä pienen uurteen sijasta isoon uurteeseen. Tutkimusryhmä tutki merkuroidun koettimen hybridisaatioita komplempentaarisiin juosteisiin siten, että vastinemäksenä nukleosidianalogille vaihtelivat kanoniset emäkset adeniini, tyymiini, guaniini ja sytosiini.



Kuva 11. A) 2-trifluorimetyyli-6-merkuraniliini B) 2-trifluorimetyyli-6-merkuraniliinin elohopeavälitteinen pariutuminen guaniinin kanssa.

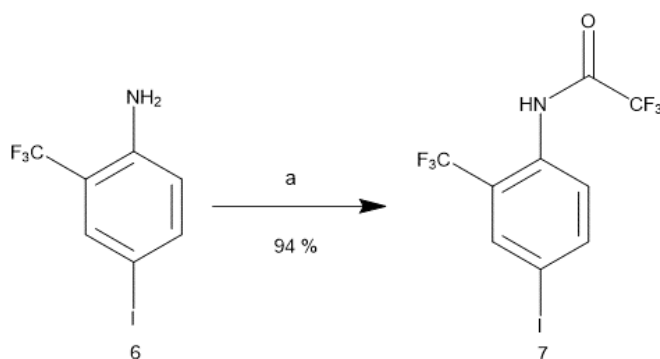
Fosforiamidiittirakenneyksikön **12** valmistus aloitettiin 2-deoksi- α,β -D-ribofuranosista (**1**), jossa anomeerinen hydroksyyliiryhmä korvattiin helpommin lähtevällä metoksiryhmällä.

Hydroksyyliiryhmät hiilissä C5' ja C3' suojattiin *tert*-butyylidimetyylisilylikloridilla (TBDMS-Cl). Metoksiryhmän eliminoinnin jälkeen glykaalin O5'-TBDMS-suojaus poistettiin ja saatiin 3-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-1,2-didehydro-1,2-dideoksi-D-ribofuranosia **5** 8,7 % saannolla lähtöaineeseen **1** nähden (Kaavio 1).



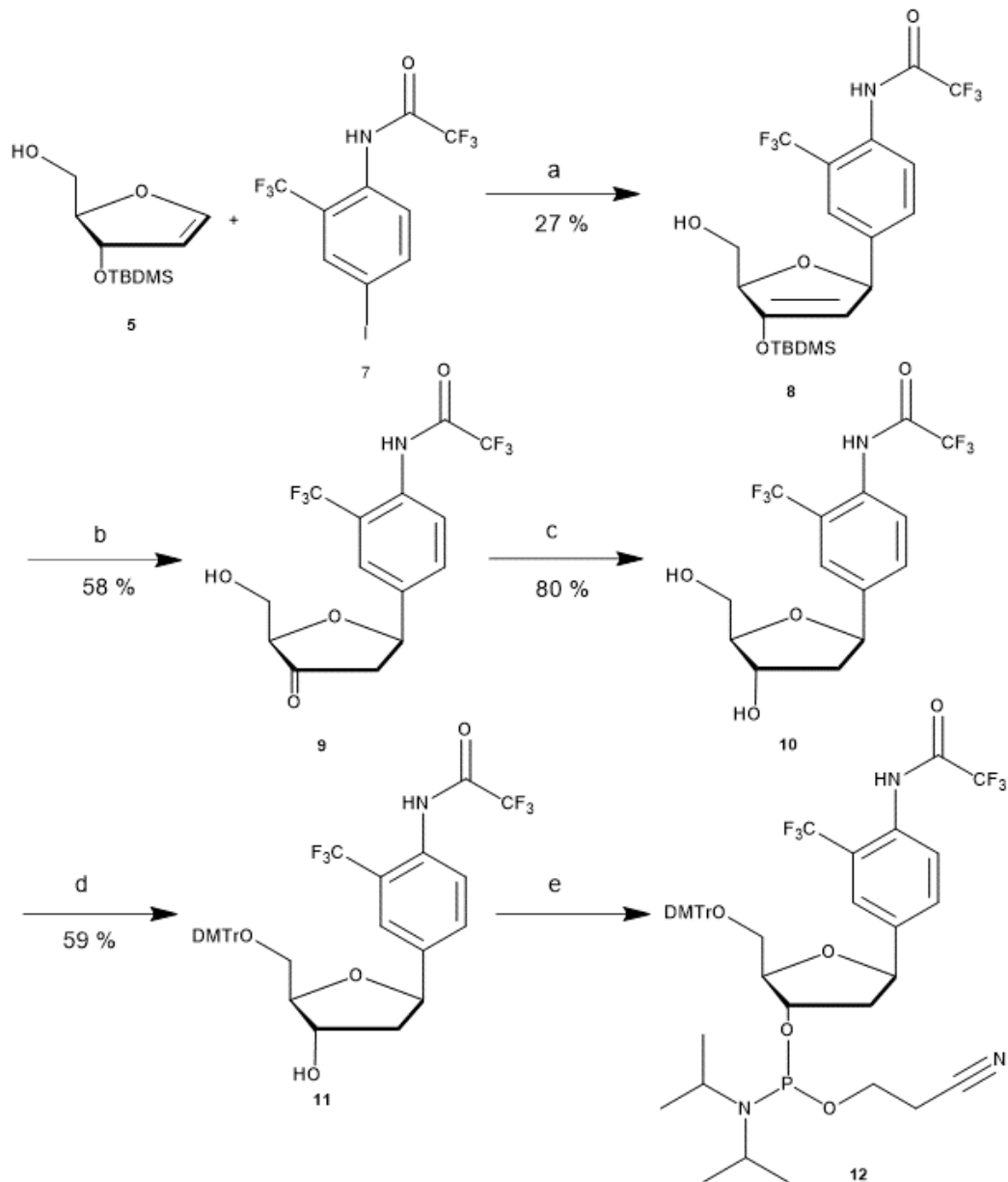
Kaavio 1. 3-O-(tert-butyylidimetyylisilyyli)-1,2-didehydro-1,2-dideoksi-D-ribofuraanosin (**5**) valmistaminen; reagenssit ja olosuhteet: a) AcCl, MeOH, 0 °C, 70 min; b) Imidatsoli, TBDMS-Cl, DCM, h.l.; c) 2–6-lutidiini, TMS-OTf, DCM, h.l. 10 min; d) TBAF, THF, 0 °C, 20 min.

4-jodi-2-(trifluorimetyyli)fenyyltrifluoriasetamidi (**7**) valmistettiin suojaamalla 2-trifluorimetyyli-4-jodianiliinin (**6**) aminoryhmä trifluoriasetyyliryhmällä 94 % saannolla (Kaavio 2).



Kaavio 2. 4-Jodi-2-(trifluorimetyyli)fenyyltrifluoriasetamidin valmistaminen; reagenssit ja olosuhteet: a) TFAA, DCM, 16 h, h.l.

C-glykolysaatio toteutettiin Mizoroki-Heckin reaktiolla 3-O-(tert-butyylidimetyylisilyyli)-1,2-didehydro-1,2-dideoksi-D-ribofuraanosin (**5**) ja 4-jodi-2-(trifluorimetyyli)fenyyltrifluoriasetamidin (**7**) välillä. Glykaalin **5** 3'-OH-ryhmän ollessa suojattuna palladiumkatalyytti reagoi glykaalin β-puolelta, ja tuotteena saadaan β-anomeeria. C-glykosidin **8** saanto oli 27 % (β-anomeeri). Yhdisteen **8** C3'-hiilen TBDMS-suojaus poistettiin, ketoni pelkistettiin hydroksiryhmäksi ja 5'-OH dimetoksitryloitiin. Fosforiamidiitirakenneyksikkö **12** saatiin syntetisoitua lähes kvantitatiivisesti käyttämällä 2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyylilloorifosforamidiittia fosfitylointireagenssina (Kaavio 3).



Kaavio 3. Fosforiamidiittirakenneyksikön (**12**) valmistaminen; reagenssit ja olosuhteet: a) $\text{Pd}((t\text{-Bu})_3\text{P})_2$, Cy_2NMe , 44 h, 70°C , Ar; b) $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$, THF, $0\text{--}25^\circ\text{C}$, 20 min. c) STAB, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{ACN}/\text{CH}_3\text{COOH}$, h.l., 10 min.; d) DMTrCl, Py, DCM, 5,5 h.; e) 2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyylikloorifosforamidiitti, Et_3N , DCM, 1 h, N_2 .

Modifioidut oligonukleotidikoettimet valmistettiin muokkaamalla sekvenssiä $5'\text{-C}^m\text{GAGC}^m\text{C}^m\text{C}^m\text{TGGC}^m\text{-3}'$ siten, että 5-metyylisyosiinit (C^m) korvattiin syntetisoidulla fosforamidiittirakenneyksiköllä **12** joko 5'-päästä, keskeltä tai 3'-päästä (Taulukko 2).

Taulukko 3. Pro Gradu -tutkimuksessa valmistetut sekvenssit. C^m merkitsee metyyliisyosiinia ja **X** valmistettua nukleotidianalogia.

$5'\text{-C}^m\text{GAGC}^m\text{XC}^m\text{TGGC}^m\text{-3}'$
$5'\text{-XC}^m\text{GAGC}^m\text{C}^m\text{C}^m\text{TGGC}^m\text{-3}'$
$5'\text{-C}^m\text{GAGC}^m\text{C}^m\text{C}^m\text{TGGX}\text{-3}'$

Oligonukleotidikoettimet valmistettiin automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla standardisoidulla fosforiamidiittikytkentäsykylillä. Fosforamidiitille **12** käytettiin 300 sekuntiin pidennettyä kytkentäaika, jolloin kytkentäsaanto oli hyvä. Modifioidut oligonukleotidikoettimet irrotettiin kantajista ja suojaryhmistä tavanomaisella ammonolyysillä, puhdistettiin RP-HPLC:llä ja karakterisoitiin massaspektrometrillä (ESI-TOF).

2.1.1 Yleiset menetelmät

Käytetyt liuottimet olivat reagenssilaatuisia ja tarvittaessa kuivattuja 3Å molekyylliseuloilla. HPLC:n eluointipuskureiden valmistukseen käytettiin tislattua trietyyliamiinia. Kaikki käytetyt kemikaalit olivat kaupallisesti saatavilla olevia ja ne käytettiin sellaisenaan. NMR-spektrit mitattiin Bruker Biospin 500 ja 600 MHz -spektrometreillä. Massaspektrit mitattiin Bruker Daltonics micrOTOF-Q ESI massaspektrometrillä.

2.1.2 Metyyli-2-deoksi- α,β -D-ribofuranosidi (**2**)

2 syntetisoitiin kirjallisuuden mukaisesti¹⁹³. Metanolia (90 ml) jäähdytettiin jäähauteessa 0 °C lämpötilaan. Asetyylikloridia (1,0 ml, 14,1 mmol, 0,4 ekv.) lisättiin ja seosta sekoitettiin magneettisekoittimella 5 min. 2-Deoksiriboosia (**1**) (5,0 g, 37,3 mmol, 1 ekv.) lisättiin liuokseen ja liuosta sekoitettiin magneettisekoittimella 70 min. Reaktioseos neutralointiin natriumvetykarbonaatilla. NaHCO₃ suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin oranssi geeli. Geeli liuotettiin etyyliasetattiin (90 ml), jolloin liuos muuttui sameaksi ja vaalean keltaiseksi. Liuos suodatettiin ja suodos haihdutettiin kuiviin. Haihduttamisen jälkeen ribosidi **2** oli kirkas kellertävä öljy. Öljyä ei puhdistettu. TLC (dikloorimetaani/metanoli, 9/1, v/v), $R_f = 0,3$.

2.1.3 Metyyli-3,5-bis-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2-deoksi- α,β -D-ribofuranosidi (**3**)

3 syntetisoitiin kirjallisuuden mukaisesti.¹⁹³ Metyyli-2'-deoksiribofuranosidi **2** (5,0 g, 37,3 mmol, 1 ekv.) liuotettiin 90 ml:aan kuivaa dikloorimetaania. Imidatsoli (6,9 g, 101,7 mmol, 2,7 ekv.) lisättiin liuokseen ja liuos jäähdytettiin jäähauteessa 0 °C lämpötilaan. *Tert*-butyylidimetyylisilylikloridia (14,1 g, 93,6 mmol, 2,5 ekv.) lisättiin liuokseen. Liuoksesta tuli valkoinen ja samea. Liuos oli viisi päivää magneettisekoituksessa huoneenlämmössä. Liuos suodatettiin Celiten läpi ja sitä pestiin kaksi kertaa vedellä (2 x 90 ml) ja kylläisellä natriumkloridin vesiliuoksella (90 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla. Uuton ja suodatuksen jälkeen liuos oli täysin läpinäkyvä ja väritön. Ohutlevykromatografian perusteella reaktio ei ollut tapahtunut loppuun saakka, joten liuokseen lisättiin imidatsolia (3,4 g, 50,0 mmol, 1,3 ekv.) ja se jäähdytettiin jäähauteessa 0 °C lämpötilaan. TBDMSCI-lisäyksen (7,1 g, 47,1 mmol, 1,3 ekv.) jälkeen reaktioseos oli kolme päivää

magneettisekoituksessa huoneenlämmössä. Liuos suodatettiin Celitellä ja suodos pestiin vedellä (2 x 90 ml) ja kylläisellä NaCl (aq.)-liuoksella (90 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Tuote **3** puhdistettiin kahteen kertaan silikageelipylväskromatografisesti (petrolieetteri/dietyylieetteri, 95/5 ja 97/3, v/v). Tuote jätettiin kuivumaan vakuumiyksikaattoriin fosforipentoksidin päälle kolmeksi päiväksi. Tuotetta **3** saatiin 3,68 g (9,77 mmol, saanto yhdisteestä **1** laskien 26 %). TLC (petrolieetteri/dietyylieetteri, 95/5, v/v), $R_f = 0,6$.

2.1.4 3,5-Bis-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-1,2-didehydro-1,2-dideoksi-D-ribofuranooosi (**4**)

4 syntetisoitiin kirjallisuuden mukaisesti.¹⁹³ Glykosidi **3** (3,7 g, 10,4 mmol, 1 ekv.) liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (30 ml) ja liuos jäähdytettiin jäähähteessä 0 °C lämpötilaan. Liuokseen lisättiin 2,6-lutidiinia (7,5 ml, 64,6 mmol, 6,2 ekv.) ja heti tämän jälkeen TMSOTf (5,8 ml, 32,3 mmol, 3,1 ekv.). Liuos sekoittui magneettisekoittimella huoneenlämmössä 10 min. Koko reaktio suoritettiin typpikaasussa. Liuos oli kirkkaan keltainen. Raakatuote laimennettiin dikloorimetaanilla (50 ml) ja liuosta pestiin kaksi kertaa vedellä (30 ml) ja kerran kylläisellä natriumkloridin vesiliuoksella (30 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Haihduttamisen jälkeen raakatuote oli keltainen öljy, jonka sekaan oli muodostunut oranssia kiinteää sakkaa. Tuote puhdistettiin kahteen kertaan silikageelipylväskromatografisesti (petrolieetteri/dietyylieetteri 80/20 sekä 99/1). Tuotetta **4** saatiin 1,97 g (5,72 mmol, 59 %). TLC (petrolieetteri/dietyylieetteri, 1/1, v/v), $R_f = 0,6$. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ ppm 6,50 (dd, $J = 2,6, 0,9$ Hz, 1H, H1), 5,04 (t, $J = 2,6$ Hz, 1H, H2), 4,89 (dt, $J = 2,7, 1,0$ Hz, 1H, H3), 4,31 (ddd, $J = 6,3, 5,8, 2,8$ Hz, 1H, H4), 3,72 (dd, $J = 10,7, 5,7$ Hz, 1H, H5), 3,54 (dd, $J = 10,7, 6,3$ Hz, 1H, H5), 0,92 (s, 9H, OTBDMS, Si-C-CH₃), 0,92 (s, 9H, OTBDMS, Si-C-CH₃); 0,03 (s, 12H, OTBDMS, Si-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 148,67 (C1), 104,28 (C2), 89,31 (C3) 75,78 (C4), 63,07 (C5), 25,82 (OTBDMS, Si-C-CH₃), 18,05 (OTBDMS, Si-C), -4,31 (OTBDMS, Si-CH₃).

2.1.5 3-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-1,2-didehydro-1,2-dideoksi-D-ribofuranooosi (**5**)

5 syntetisoitiin kirjallisuuden mukaisesti.¹⁹³ Glykaali **4** (300 mg, 0,88 mmol, 1 ekv.) liuotettiin kuivaan tetrahydrofuraaniin (8 ml) ja liuos jäähdytettiin jäähähteessä 0 °C lämpötilaan. Tetra-*n*-butyyliammoniumfluoridia (TBAF, 1 M THF-liuos, 0,70 ml, 0,70 mmol, 0,8 ekv.) lisättiin liuokseen ja reaktioseoksen annettiin sekoittua magneettisekoittimella 0 °C lämpötilassa 20 min. Liuos muuttui lisäämisen jälkeen hieman kellertäväksi ja kirkkaaksi. Reaktio pysäytettiin lisäämällä vettä (10 ml). Reaktioseokseen lisättiin heti veden lisäyksen jälkeen dikloorimetaania (5 ml). Liuos muuttui valkoiseksi ja sameaksi. Liuos laimennettiin 45 ml:lla dikloorimetaania ja sitä pestiin vedellä (2 x 50 ml) ja kylläisellä NaCl (aq.)-liuoksella (25 ml). Orgaaninen faasi kuivatettiin natriumsulfaatilla ja

haihdutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (petrolieetteri/dietyylieetteri, 70/30, v/v). Tuotetta **5** saatiin 0,75 g (3,26 mmol, 57 %). TLC (petrolieetteri/dietyylieetteri, 1/1, v/v), $R_f = 0,5$. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ ppm 6,46 (dd, $J = 2,7, 0,9$ Hz, 1H, H1), 5,01 (t, $J = 2,6$ Hz, 1H, H2), 4,78 (m, H3), 4,30 (ddd, $J = 6,8, 3,9, 3,3$ Hz, 1H, H4), 3,63 (ddd, $J = 11,7, 6,8, 4,2$ Hz, 1H, H5), 3,55 (ddd, $J = 12,0, 6,3, 5,7$ Hz, 1H, H5), 2,78 (t, $J = 6,2$ Hz, OH), 0,86 (s, 9H, OTBDMS, Si-C-CH₃), 0,061 (s, 6H, OTBDMS, Si-CH₃), 0,058 (s, 6H, OTBDMS, Si-CH₃).

2.1.6 4-Jodi-2-(trifluorimetyyli)fenyyli-trifluoriasetamidi (**7**)

4-Jodi-2-(trifluorimetyyli)fenyyli-trifluoriasetamidi (**7**) syntetisoitiin kuten kirjallisuudessa. 2-Trifluorimetyyli-4-jodianiliini (**6**, 1,28 g, 4,46 mmol, 1 ekv.) liuotettiin kuivaan dikloori-metaaniin (16 ml) ja liuoksen annettiin sekoittua magneettisekoittimella hetki. Trifluorietikka-happoanhydriidiä (TFAA, 1,3 ml, 9,20 mmol, 2 ekv.) lisättiin liuokseen. Reaktioliuos oli läpinäkyvä ja haalean vaaleanpunainen. Reaktiota seurattiin TLC:llä, joka värjättiin ninhydriinillä. 1,5 h kuluttua reaktion käynnistämisestä lähtöainetta ei ollut enää jäljellä reaktioseoksessa. Reaktioseos jätettiin yön yli huoneen lämpöön sekoittumaan magneettisekoittimella. Raakatuote pestiin kaksi kertaa kylläisellä natriumvetykarbonaatin vesiliuoksella (10 ml). Pesun aikana vapautui voimakkaasti kaasua ja reaktioliuoksen väri muuttui vaaleanpunaisesta värittömäksi. Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaattilla ja haihdutettiin kuiviin. Haihduttamisen jälkeen tuote oli valkoista, huokoista ja tahmeaa vaahtoa. Tuotetta **7** saatiin 1,60 g (4,18 mmol, 94 %). TLC (heksaani/etyyli-asetaatti, 60/40, v/v), R_f (**6**) = 0,5, R_f (**7**) = 0,7. HRMS (ESI-TOF) m/z laskettu $\text{C}_9\text{H}_4\text{F}_6\text{NOI}$ $[\text{M-H}]^-$ 381,9169 havaittu 381,9155. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ ppm 8,17 (s, 1H, NH), 8,01 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, H3), 7,97 (dd, $J = 8,7, 1,2$ Hz, 1H, H5), 7,92 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H6); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ ppm 155,09 (q, $J = 38,2$ Hz, C=O), 142,30 (C5), 135,38 (q, $J = 5,3$ Hz, C3), 132,06 (C1), 126,06 (C6), 123,01 (q, $J = 30,8$ Hz, C2), 122,43 (q, $J = 273,7$ Hz, C2-CF₃), 115,44 (q, $J = 288,6$ Hz, O=C-CF₃), 90,25 (C4); $^{19}\text{F-NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): δ ppm -60,74 (C2-CF₃), -76,08 (O=C-CF₃).

2.1.7 {4-[3-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2-deoksi-2,3-didehydro- β -D-erythro-pentofuranosyyli]-2-trifluorimetyylifenyyli}trifluoriasetamidi (**8**)

Glykaali **5** (0,819 g, 3,56 mmol, 1 ekv.) ja aniliini **7** (1,36 g, 3,56 mmol, 1 ekv.) liuotettiin kuivaan 1,4-dioksaaniin (12 ml). Liuosta kuplitettiin argonkaasulla 1 h. Bis(tri-*tert*-butyylifosfiini)palladium(0) punnittiin argonilmakehässä (0,24 g, 0,47 mmol, 0,1 ekv.). Bis(tri-*tert*-butyylifosfiini)palladium(0) lisättiin reaktioseokseen, ja tämän jälkeen välittömästi Cy_2NMe (0,84 ml, 4,06 mmol, 1,1 ekv.). Reaktioseos oli pikimusta ja tervamainen. Reaktioseos sekoittui

magneettisekoittimella argonilmakehässä 70 °C lämpötilassa 44 h. Reaktioseos puhdistettiin kahteen kertaan silikageelipylväskromatografisesti (etyyliasetatti/heksaani, 25/75, v/v ja etyyliasetatti/heksaani, 15–30 % etyyliasetatti, v/v). Tuotetta **8** saatiin puhtaana β-anomeerina 0,464 g (0,95 mmol, 27 %). TLC (etyyli-asetatti/heksaani, 15/85, v/v), $R_f = 0,1$. HRMS (ESI-TOF) m/z laskettu $C_{20}H_{25}F_6NO_4Si [M+Na]^+$ 508,1355; havaittu 508,1338. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 8,23 (s, 1H, NH), 8,13 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H6), 7,80 (d, $J = 1,7$ Hz, H3), 7,70 (dd, $J = 8,4, 1,7$ Hz, 1H, H5), 5,79 (dd, $J = 3,9, 1,4$ Hz, 1H, H1'), 4,85 (t, $J = 1,6$ Hz, 1H, H2'), 4,67 (ddd, $J = 6,8, 3,7, 2,0$ Hz, 1H, H4'), 3,82 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H, H5'), 3,78 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H, H5'), 1,68 (t, $J = 5,3$ Hz, OH), 0,98 (s, 9H, OTBDMS, Si-C-CH₃), 0,27 (s, 6H, OTBDMS, Si-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 155,20 (q, $J = 38,1$ Hz, C=O), 152,28 (C3'), 141,74 (C4), 131,86 (C5), 131,62 (C1), 125,54 (q, $J = 5,1$ Hz, C3), 124,93 (C6), 123,52 (q, $J = 273,2$ Hz, C2-CF₃), 121,79 (q, $J = 30,3$ Hz, C2), 115,57 (q, $J = 288,4$ Hz, O=C-CF₃), 100,68 (C2'), 83,66 (C1'), 83,54 (C4'), 62,96 (C5'), 25,48 (OTBDMS, Si-C-CH₃), 18,08 (OTBDMS, Si-C), -4,95 (OTBDMS, Si-CH₃), -5,00 (OTBDMS, Si-CH₃). ^{19}F -NMR (470 MHz, $CDCl_3$): δ ppm -60,59 (C2-CF₃), -76,09 (O=C-CF₃).

2.1.8 2-trifluori-N-(4-((2R,5R)-5-(hydroksimetyyli)-4-oxotetrahydrofuran-2-yyli)-2-(trifluorometyyli)fenyyli)asetamidi (**9**)

0,464 g (0,956 mmol, 1 ekv.) yhdistettä **8** liuotettiin kuivaan tetrahydrofuraaniin 0 °C lämpötilassa. Trietyyliamiinitrihydrofluoria ($Et_3N \cdot 3HF$) lisättiin 0,8 ml (4,789 mmol, 5,01 ekv.) ja seoksen annettiin sekoittua 20 min huoneenlämmössä. Liuos suodatettiin lyhyen silikageelipylvään läpi (etyyliasetatti/heksaani, 90/10, v/v) ja puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (etyyliasetatti/heksaani, 70/30, v/v). Tuotetta **9** saatiin 0,205 g (0,552 mmol, 58 %). HRMS (ESI-TOF) m/z laskettu $C_{14}H_{11}F_6NO_4 [M+Na]^+$ 394,0490; havaittu 394,0461. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 8,24 (s, 1H, NH), 8,21 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H5), 7,82 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, H3), 7,74 (dd, $J = 8,5, 1,6$ Hz, 1H, H6), 5,30 (dd, $J = 10,9, 6,0$ Hz, 1H, H1'), 4,11 (t, $J = 3,4$ Hz, 1H, H4'), 4,01 (m, 2H, H5' ja H5''), 2,97 (dd, $J = 17,9, 6,0$ Hz, 1H, H2'), 2,50 (dd, $J = 17,9, 10,9$ Hz, 1H, H2''), ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 212,40 (C3'), 155,25 (q, $J = 38,1$ Hz, C=O-CF₃), 139,06 (C4), 132,18 (C1), 130,89 (C6), 125,10 (C5), 124,36 (q, $J = 5,1$ Hz, C3), 123,38 (q, $J = 273,4$ Hz, C2-CF₃), 121,99 (q, $J = 30,3$ Hz, C2), 115,52 (q, $J = 288,5$ Hz, O=C-CF₃), 82,42 (C4'), 76,34 (C1'), 61,52 (C5'), 45,15 (C2').

2.1.9 2-trifluori-N-(4-((2R,4S,5R)-4-hydroksi-5-(hydroksimetyyli)tetrahydrofuran-2-yyli)-2-(trifluorimetyyli)fenyyli)asetamidi (**10**)

0,205 g (0,552 mmol, 1 ekv.) yhdistettä **9** liuotettiin asetonitriiliin ja etikkahapon seokseen (4 ml, asetonitriili/etikkahappo, 1/1, v/v). Liuokseen lisättiin 0,372 g (1,754 mmol, 3 ekv.) natriumtriasetoksiboorihydriä (NaBH(OAc)₃, STAB). Reaktioseoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä magneettisekoittimella 10 min. Reaktio etenemistä seurattiin TLC:llä. Reaktio lopetettiin lisäämällä reaktioseokseen veden ja etanolin seosta (2 ml, vesi/etanol, 1/1, v/v). Tuote puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (metanoli/dikloorimetaani, 10/90, v/v). Tuotetta **10** saatiin 0,165 g (0,442 mmol, 80 %). TLC (metanoli/dikloorimetaani, 10/90, v/v), $R_f = 0,2$. HRMS (ESI-TOF) m/z laskettu C₁₄H₁₁F₆NO₄ [M+Na]⁺ 396,0646; havaittu 396,0631. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ ppm 7,85 (d, $J = 0,1$ Hz, 1H, H3), 7,74 (d, $J = 8,2$, 1H, H5), 7,53 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H6), 5,21 (dd, $J = 10,4, 5,6$ Hz, 1H, H1'), 4,32 (dt, $J = 5,3, 1,7$ Hz, 1H, H3'), 3,95 (td, $J = 4,9, 2,3$, 1H, H4'), 3,65 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H, H5' ja H5''), 2,28 (ddd, $J = 13,0, 5,6, 1,5$ Hz, 1H, H2'), 1,89 (ddd, $J = 13,0, 10,4, 5,8$ Hz, 1H, H2''); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 156,66 (q, $J = 37,6$ Hz, O=C-CF₃), 144,05 (C3), 130,80 (C5), 130,71 (d, $J = 2,0$ Hz, C1), 129,85 (C6), 126,29 (q, $J = 30,4$ Hz, C2), 124,44 (q, $J = 4,7$ Hz, C3), 123,42 (q, $J = 272,7$ Hz, C2-CF₃), 116,01 (q, $J = 287,4$ Hz, O=C-CF₃), 88,13 (C4'), 78,74 (C1'), 73,06 (C3'), 62,75 (C5'), 43,69 (C2'); ¹⁹F-NMR (470 MHz, CDCl₃): δ ppm -61,37 (C2-CF₃), -76,41 (O=C-CF₃).

2.1.10 N-(4-((2R,4S,5R)-5-((bis(4-metoksifenyyli)fenyyli)metoksi)metyyli)-4-hydroksitetrahydrofuran-2-yyli)-2-(trifluorimetyyli)fenyyli)-2,2,2-trifluoriasetamidi (**11**)

0,165 g (0,442 mmol, 1 ekv.) lähtöainetta **10** liuotettiin kuivaan pyridiiniin (10 ml) ja liuos haihdutettiin kuiviin. Tämä toistettiin kahteen kertaan. Tuote liuotettiin lopuksi kuivaan pyridiiniin (10 ml) ja reaktioseokseen lisättiin 4,4'-dimetoksitrietyylikloridia (DMTrCl) 0,1638 g (0,486 mmol, 1,1 ekv.). Reaktioseos jätettiin sekoittumaan magneettisekoittimella huoneenlämpöön 5,5 tunniksi. Reaktioseosta väkevöitiin haihduttamalla ja väkevöity reaktioseos laimennettiin dikloorimetaanilla (80 ml). Orgaaninen liuos pestiin kylläisellä natriumvetykarbonaatin vesiliuoksella (100 ml), kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Tuote **11** puhdistettiin silikageelipylväskromatografisesti (trietyyliamiini/etyyliasetatti/heksaani, 1/49/50, v/v; trietyyliamiini/etyyliasetatti 1/99, v/v; trietyyliamiini/metanoli/etyyliasetatti, 1/10/89, v/v). Tuotetta **11** saatiin 0,177 g (0,262 mmol, 59 %). HRMS (ESI-TOF) m/z laskettu C₃₅H₃₁F₆NO₆ [M+Na]⁺ 698,1953; havaittu 698,1986. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ ppm 8,48 (s, NH), 7,91 (d, $J = 8,4$, 1H, H5), 7,79 (s, 1H, H3), 7,62 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, H6), 7,48 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, Ph-H2 ja -H6), 7,37 (d, $J = 7,2$ Hz, 4H, MeOPh-H2 ja -H6), 7,29 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, Ph-H3 ja -H5), 7,22 (t, $J =$

7,1, 1H, Ph-H4), 6,84 (d, $J = 8,7$ Hz, 4H, MeOPh-H3 ja -H5), 5,24 (dd, $J = 10,1, 5,4$ Hz, 1H, H1'), 4,44 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, H3'), 4,15 (br, H4'), 3,78 (s, 6H, CH₃-OPh), 3,34 (d, $J = 4,2$ Hz, 2H, H5' ja H5''), 2,30 (dd, $J = 12,9, 5,2$ Hz, H2'), 2,01 (m, H2''); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 158,54 (MeOPh-C4), 155,63 (q, $J = 37,8$ Hz, C=O-CF₃), 144,81 (Ph-C1), 141,98 (C4), 135,98 (MeOPh-C1), 135,95 (MeOPh-C1), 131,02 (C1), 130,64 (C6), 130,08 (MeOPh-C2 ja -C6), 128,15 (Ph-C2 ja -C6), 127,86 (MeOPh-C3 ja -C5), 126,01 (C5), 124,06 (q, $J = 4,9$ Hz, C3), 123,50 (q, $J = 273,3$ Hz, C2-CF₃), 122,94 (q, $J = 30,3$ Hz, C2), 115,70 (q, $J = 288,3$ Hz, O=C-CF₃), 113,17 (CH₃-OPh), 86,85 (C4'), 86,30 (Ar₃C), 78,88 (C1'), 74,19 (C3'), 64,27 (C5'), 55,19 (CH₃-OPh), 44,06 (C2'); ¹⁹F-NMR (470 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm -59,79 (C2-CF₃), -74,21 (O=C-CF₃).

2.1.11 (2R,3S,5R)-2-((bis(4-metoksifenylyli)(fenylyli)metoksi)metyyli)-5-(4-(2,2,2-trifluoriasetamidi)-3-(trifluorimetyyli)fenylyli)tetrahydrofuran-3-yl(2-syanoetyyli)diisopropylylfosforiamidiitti (**12**)

0,177 g (0,262 mmol, 1 ekv.) yhdistettä **11** liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (1,3 ml). Reaktioseokseen lisättiin kuivaa ja tislattua trietyyliamiinia (184 µl, 1,310 mmol, 5 ekv.) sekä 2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylylikloorifosforiamidiittiä (64 µl, 0,288 mmol, 1,1 ekv.). Reaktioliuoksen annettiin sekoittua magneettisekoittimella huoneenlämmössä 1 h. Yllä mainittu suoritus tehtiin typpi-ilmakehässä. Reaktioseos neutraloitiin lisäämällä kylläistä natriumvetykarbonaatin vesiliuosta (50 ml) jonka jälkeen reaktioseos laimennettiin dikloorimetaanilla (50 ml). Orgaaninen faasi pestiin kylläisellä natriumvetykarbonaatin vesiliuksella, kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote oli valkoista vaahtoa. Raakatuotetta **12** saatiin 229 mg. Tuotetta ei puhdistettu. HRMS (ESI-TOF) *m/z* laskettu C₄₄H₄₈F₆N₃O₇P [M+Na]⁺ 898,3032; havaittu 898,3054. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, vallitseva diastereomeeri): δ ppm 8,28 (s, 1H, NH), 8,06 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H5), 7,84 (s, 1H, H3), 7,68 (d, $J = 8,57$ Hz, 1H, H6), 7,48 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, Ph-H2 ja -H6), 7,37 (m, 4H, MeOPh-H2 ja -H6), 7,30 (m, 2H, Ph-H3 ja H5), 7,24 (m, 1H, Ph-H3), 6,85 (d, $J = 8,7$ Hz, 4H, MeOPh-H3 ja H5), 5,25 (dd, $J = 10,3, 5,0$ Hz, 1H, H1'), 4,57 (m, H3'), 4,32 (m, H4'), 3,93-3,80 (m, 1H, PO-CH₂), 3,81 (s, 6H, PhO-CH₃), 3,73 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, PO-CH₂), 3,64 (m, 2H, iPr-CH), 3,45-3,23 (m, 2H, H5' ja H5''), 2,64 (t, $J = 7,0$ Hz, CH₂-CN), 2,53 (dd, $J = 13,0, 5,0$ Hz, 1H, H2'), 2,04 (dd, $J = 12,7, 5,9$ Hz, 1H, H2''), 1,31-1,17 (m, 12H, iPr-CH₃); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, vähäisempi diastereomeeri): δ ppm 8,28 (s, 1H, NH), 8,06 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H5), 7,79 (s, 1H, H3), 7,68 (d, $J = 8,57$ Hz, 1H, H6), 7,48 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, Ph-H2 ja -H6), 7,37 (m, 4H, MeOPh-H2 ja -H6), 7,30 (m, 2H, Ph-H3 ja H5), 7,24 (m, 1H, Ph-H3), 6,84 (d, $J = 8,7$ Hz, 4H, MeOPh-H3 ja H5), 5,26 (dd, $J = 10,2, 5,0$ Hz, 1H, H1'), 4,57 (m, 1H, H3'), 4,29 (m, 1H, H4'), 3,93-3,80 (m, 1H, PO-CH₂), 3,82 (s, 6H, PhO-CH₃), 3,73 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, PO-CH₂), 3,64 (m, 2H, iPr-CH), 3,45-3,23 (m,

2H, H5' ja H5''), 2,48 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H, CH₂-CN), 2,42 (dd, $J = 12,8, 5,0$ Hz, 1H, H2'), 2,08 (dd, $J = 12,6, 5,8$ Hz, 1H, H2''), 1,31-1,17 (m, 12H, iPr-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, vallitseva diastereomeeri): δ ppm 158,54 (Ph-C4), 155,32 (q, $J = 38,0$ Hz, O=C), 144,74 (Ph-C1), 141,39 (C4), 135,93 (MeOPh-C1), 131,21 (C1), 130,74 (C6), 130,10 (MeOPh-C2 ja -C6, 2C), 128,23 (Ph-C2 ja -C6), 127,82 (Ph-C3 ja -C5), 127,06 (Ph-C4), 125,20 (s, C5), 124,10 (m, C3), 123,59 (q, $J = 274,0$ Hz, C2-CF₃), 122,12 (q, $J = 30$ Hz, C2), 117,46 (CN), 115,64 (q, $J = 289$ Hz, O=C-CF₃), 113,13 (MeOPh-C3 ja C5), 86,27 (Ar₃C), 86,44 (d, $J = 6,0$ Hz, C4'), 79,19 (C1'), 75,69 (d, $J = 16,0$ Hz, C3'), 63,96 (C5'), 58,33 (d, $J = 19,0$ Hz, PO-CH₂), 55,20 (PhO-CH₃), 43,38 (t, $J = 5,0$ Hz, C2'), 43,19 (d, $J = 7,0$ Hz, iPr-CH), 24,62 (iPr-CH₃), 20,40 (d, $J = 7,0$ Hz, NC-CH₂); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, vähäisempi diastereomeeri): δ ppm 158,54 (Ph-C4), 155,30 (q, $J = 38,0$ Hz, O=C), 144,76 (Ph-C1), 141,41 (C4), 135,93 (MeOPh-C1), 131,21 (C1), 130,73 (C6), 130,10 (MeOPh-C2 ja -C6, 2C), 128,18 (Ph-C2 ja -C6), 127,82 (Ph-C3 ja -C5), 127,06 (Ph-C4), 125,15 (C5), 124,10 (C3), 123,57 (q, $J = 274,0$ Hz, C2-CF₃), 122,07 (q, $J = 30,0$ Hz, C2), 117,57 (CN), 115,64 (q, $J = 289,0$ Hz, O=C-CF₃), 113,13 (MeOPh-C3 ja C5), 86,28 (Ar₃C), 86,12 (d, $J = 4,0$ Hz, C4'), 79,12 (C1'), 75,69 (d, $J = 16,0$ Hz, C3'), 63,90 (C5'), 58,33 (d, $J = 19,0$ Hz, PO-CH₂), 55,21 (s, PhO-CH₃), 43,29 (t, $J = 6,0$ Hz, C2'), 43,29 (d, $J = 7,0$ Hz, iPr-CH), 24,44-24,69 (iPr-CH₃), 20,22 (d, $J = 7,0$ Hz, NC-CH₂); ¹⁹F-NMR (470 MHz, CDCl₃, vallitseva diastereomeeri): δ ppm -60,40 (C2-CF₃), -76,01 (O=C-CF₃); ¹⁹F-NMR (470 MHz, CDCl₃, vähäisempi diastereomeeri), -60,42 (C2-CF₃), -76,01 (O=C-CF₃); ³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, vallitseva diastereomeeri): δ ppm 148,21; ³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, vähäisempi diastereomeeri): δ ppm 148,31.

2.1.12 Oligonukleotidikoettimen valmistus

Modifioidut oligonukleotidit **ON1**, **ON2** ja **ON3** valmistettiin automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla nukleosidifosforiamidiitista **12** ja kaupallisesti saatavista fosforiamidiiteista. Kantajana käytettiin kiinteää yleiskantajaa (Glen Unysupport). Suojaryhmien poisto ja oligonukleotidien irroitus kiinteästä kantajasta toteutettiin tavanomaisella ammonolyysillä. Oligonukleotidien annettiin seistä ammoniakiliuoksessa yön yli (16 h, 55 °C). Modifioidut oligonukleotidit puhdistettiin semipreparatiivisella RP HPLC:llä, Clarity Oligo-RP C18 kolonnilla (250 x 10 mm, 10 μ m). Kolonnilla eluotettiin lineaarisella gradientilla (5–35 % 30 min aikana) asetonitriliä 0,1-molaarisessa trietyyliammoniumasetaatissa vesiliuoksessa. Puhdistuksessa käytettiin 3,0 ml min⁻¹ virtausnopeutta ja detektiossa 260 nm aallonpituutta. Oligonukleotidit haihdutettiin kuiviin kylmäkuivauksella. Puhdistetut oligonukleotidit karakterisoitiin massaspektrometrisesti ja kvantitoitiin UV-spektrofotometrisesti ($\lambda = 260$ nm). Molaarisen absorptiviteetin oletettiin olevan sama kuin oligonukleotidisekvenssien **ON1**, **ON2**, ja **ON3** ilman monomeeria **12**. Oligonukleotidiä

ON1 saatiin 8,56 nmol, **ON2** 5,96 nmol ja **ON3** 7,88 nmol. MS (ESI-) m/z laskettu $C_{112}H_{140}F_3N_{40}O_{63}P_{10} [M-3H]^{-3}$ 1139,9; havaittu 1139,9 (**ON1**), 1139,9 (**ON2**) ja 1139,9 (**ON3**).

2.2 Johtopäätökset

Nukleotidianalogin synteesi sujui kokonaisuudessaan hyvin. Glykaalia **5** saatiin valitusta lähtöaineesta 8,7 %:n saannolla, joka oli harmittavan vähän. Yhdisteen **6** aminoryhmä suojattiin trifluoriasetyyliryhmällä 94 %:n saannolla (Kaavio 2). Trifluoriasetyyliryhmä irtosi merkittävässä määrin yhdisteen **11** dimetoksitryloinnissa (Kaavio 3, osareaktio d). Yhdistettä **11** ilman aminoryhmän suojausta saatiin merkittävä määrä, 22 %:n saannolla. Glykaalin **5** ja aniliinin **7** yhdistäminen stereoselektiivisesti Heckin kytkennällä antoi 27 %:n saannon β -anomeeria (Kaavio 3). Palladiumin poistaminen reaktioseoksesta oli haastavaa ja siinä todennäköisesti menetettiin osa yhdisteen **11** saannosta.

Modifioitujen oligonukleotidien synteesi automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla onnistui. Rakenneyksikkö **12** toimi hyvin osana synteesiä. Rakenneyksikölle **12** käytettiin 300 sekuntiin pidennettyä kytkentäaika, mutta muuten valmistelut toteutettiin kuten kaupallisille fosforiamidiittirakenneyksiköille. Modifioitujen oligonukleotidin merkuroinnissa ongelmana oli vähäinen saanto ja merkuroitujen oligonukleotidin puhdistaminen.

Turun yliopiston bio-orgaaninen tutkimusryhmä ratkaisi merkurointiongelman ja puhdistusongelmat rajoittamalla merkurointiin käytettävää reaktioaika ja lisäämällä reaktioliuokseen EDTA-liuosta. Reaktioliuoksessa EDTA muodostaa kompleksiyhdisteen vapaiden elohopeaionien kanssa, vähentäen ylimäärin olevien elohopeaionien määrää. EDTA-liuoksen lisäys helpotti myös kromatografista puhdistusta RP-HPLC:llä ja merkuroitu oligonukleotidi saatiin puhdistettua.⁹¹

2-trifluorimetyylaniliinin merkurointi osoittautui hitaaksi.⁹¹ Todennäköisesti aminoryhmän aktivoiva vaikutus ei riittänyt kompensoimaan trifluorimetyylin deaktivoivaa vaikutusta elektrofiilisessä aromaattisessa substituutiossa elohopeaionin kanssa. Trifluorimetyyliryhmä vaikutti myös merkittävästi metallivälitteisen hybridisaation entalpian ja entropian arvoihin, jotka olivat negatiivisemmat kuin merkuroimattoman analogin.⁹¹ Tulos on poikkeava, sillä elohopeavälitteisen hybridisaation on aiemmin havaittu tuottavan positiivisempia entalpian ja entropian arvoja. Entalpian arvon nousun on ajateltu johtuvan vähäisemmästä määrästä muodostuneita sidoksia verrattuna Watson-Crick-emäspariutumiseen. Emäsparin muodostuessa, elohopean hydraattikuoren vapautumisella liuokseen on ajateltu johtuvan entropian positiivisemmasta arvosta.^{88,90,125,152}

Mahdollisia selityksiä negatiivisimmille arvoille on trifluorimetyyli-ryhmän ja viereisen aminoryhmän välille muodostunut vetysidos C–F···H–N, joka on harvinainen mutta mahdollinen¹⁹⁴ (vaikutus entalpiaan) sekä erityisesti pyrimidiinien kohdalla tilaa vievän trifluorimetyyli-ryhmän rotaation estyminen tiiviimmän emäspinoitumisen vaikutuksesta (vaikutus entropiaan). Mikäli viitteitä F–H–N-sidoksesta saataisiin, olisi se tieteellisesti merkittävä, sillä F–H–N-sidoksen olemassaolosta käydään edelleen keskustelua.^{195–199} Lisävarmuutta antaisi röntgenkristallografinen tutkimus, jossa kovalenttisesti sitoutunut elohopeaioni on erinomainen anomaaliseen sirontaan kykenevä ydin.

2-trifluorimetyyli-6-merkuri-2-mercurianiliinin metallivälitteisen pariutumisen sulamislämpötilat T_m vastasivat suuruusjärjestykseltään (A<C<G<T) lähes vastaavan rakenteen, 3-fluoro-2-mercuri-6-metyyli-2-mercurianiliinin, metallivälitteistä pariutumista, mutta olivat järjestäen hieman alempia.^{90,91} Pariutumisen järjestys A<C<G<T on selitettävissä elohopeaionin mieltymyksellä anionisiin ligandeihin ja pyrimidiinien parempaan istuvuuteen kaksoiskierteessä.⁵¹ Tymiinin sulamislämpötilan lasku oli merkittävin, mikä johti vain 3 celsiusasteen eroon tyymiinin ja guaniinin välillä, vähentäen erotuskykyä tyymiinin ja guaniinin välillä. ¹⁹F NMR-spektroskopiolla onnistuttiin erottamaan vastinemäksistä tyymiini, guaniini ja sytosiini toisistaan, mutta adeniinin kohdalla ¹⁹F NMR-spektri oli liian epäselvä. Sulamislämpötiloista ¹⁹F NMR-spektroskopiolla onnistuttiin saamaan tarkat arvot vain tyymiinin ja sytosiinin kohdalla. Guaniinin kohdalla kaksoiskiirteen ja nukleotidianalogin sisältävän juosteen päällekkäiset signaalit estivät sulamislämpötilan tulkinnan.⁹¹

Merkuroidulla keinotekoisella yhdentoista nukleotidin pituisella nukleiinihapolla havaittiin olevan taipumusta poimuttumiseen, kun se oli yksijuosteisessa muodossa. Metallivälitteinen pariutuminen ei vaikuttanut CD-spektroskopisen analyysin perusteella kaksoiskiirteen sekundaarirakenteeseen vaan merkuroidut kaksoiskierteet säilyttivät DNA:lle ominaisen B-muodon. Fluorileimana toimineella trifluorimetyyli-ryhmällä kyettiin todentamaan metallivälitteisen emäsparin muutoksia mikromolaarisilla konsentraatioilla. ¹⁹F NMR-signaalien pinta-aloista lasketut sulamislämpötilat vastasivat melko hyvin UV-sulamislämpötilojen arvoja.⁹¹

Verrattuna tutkimusryhmän vastaaviin elohopeaionivälitteisiin nukleotidianalogeihin, erityisesti 3-fluori-2-mercuri-6-metyyli-2-mercurianiliiniin, 2-trifluorimetyyli-6-merkuri-2-mercurianiliini ei valitettavasti tuonut lisäarvoa biologisesti merkittävien sekvenssien tunnistamiseen tarkoitettuna hybridisaatiokoettimena, ainakaan kanonisten emästen kohdalla. 2-trifluorimetyyli-2-mercurianiliinia sisältävän nukleiinihapon merkurointi oli haastavampaa ja se oli vaikeammin puhdistettavissa. 2-trifluorimetyyli-6-merkuri-2-mercurianiliinikoetimuksella kyettiin erottamaan kanonisten emäksien pyrimidiinit puriineista, mutta erotuskyky ei riittänyt kaikkien neljän kanonisen emäksen luotettavaan

erottamiseen toisistaan. Trifluorimetyyliryhmä osoittautui herkäksi leimaksi ^{19}F NMR spektroskopiassa, mutta vahvasti deaktivoivana aromaattisen renkaan substituenttina se hidasti nukleotidianalogin merkuraatiota. Sulamislämpötilojen tutkimista ^{19}F NMR:n avulla vaikeuttivat epämääräiset signaalit merkuroidun nukleotidianalogin pariutuessa adeniinin kanssa sekä valitettavat signaalin päällekkäisyydet guaniinin kohdalla.

Lähteet

- (1) Oligo. **2019**. <https://doi.org/doi:10.1351/goldbook.O04282>.
- (2) Li, Y.; Breaker, R. R. Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2 γ -Hydroxyl Group. *Journal of the American Chemical Society*; **1999**, *121* (23), 5364–5372. <https://doi.org/10.1021/ja990592p>.
- (3) Soukup, G. A.; Breaker, R. R. Relationship between Internucleotide Linkage Geometry and the Stability of RNA. *Rna*; **1999**, *5* (10), 1308–1325. <https://doi.org/10.1017/S1355838299990891>.
- (4) Auffinger, P.; Westhof, E. Rules Governing the Orientation of the 2'-Hydroxyl Group in RNA. *Journal of Molecular Biology*; **1997**, *274* (1), 54-63. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1370>.
- (5) Neidle, S.; Sanderson, M. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Elsevier, 2021. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-00340-8>.
- (6) Benner, S. A. Understanding Nucleic Acids Using Synthetic Chemistry. *Accounts of Chemical Research*; **2004**, *37* (10), 784–797. <https://doi.org/10.1021/ar040004z>.
- (7) Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press, 1953.
- (8) Lutz, M. J.; Horlacher, J.; Benner, S. A. Recognition of 2'-Deoxyisoguanosine Triphosphate by HIV-1 Reverse Transcriptase and Mammalian Cellular DNA Polymerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **1998**, *8* (5), 499-504. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00057-2).
- (9) Benner, S. A.; Hurter, D. Phosphates, DNA, and the Search for Nonterrean Life: A Second Generation Model for Genetic Molecules. *Bioorganic Chemistry*; **2002**, *30* (1), 62-80. <https://doi.org/10.1006/bioo.2001.1232>.
- (10) Gangamani, B. P.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. Spermine Conjugated Peptide Nucleic Acids (SpPNA): UV and Fluorescence Studies of PNA-DNA Hybrids with Improved Stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; **1997**, *240* (3), 778-782. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7745>.
- (11) Yakovchuk, P.; Protozanova, E.; Frank-Kamenetskii, M. D. Base-Stacking and Base-Pairing Contributions into Thermal Stability of the DNA Double Helix. *Nucleic Acids Research*; **2006**, *34* (2), 564-574. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj454>.
- (12) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid (Reprinted from Nature, April 25, 1953). *Nature*; **1969**, *224* (5218), 470-471. <https://doi.org/10.1038/224470a0>.
- (13) Steiner, T. The Hydrogen Bond in the Solid State. *Angewandte Chemie - International Edition*; **2002**, *41* (1), 48-76. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020104\)41:1<48::AID-ANIE48>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020104)41:1<48::AID-ANIE48>3.0.CO;2-U).
- (14) Desiraju, G. R. A Bond by Any Other Name. *Angewandte Chemie - International Edition*; **2011**, *50* (1), 52-59. <https://doi.org/10.1002/anie.201002960>.
- (15) Von Hippel, P. H.; Johnson, N. P.; Marcus, A. H. Fifty Years of DNA “Breathing”: Reflections on Old and New Approaches. *Biopolymers*; **2013**, *99* (12), 923-954. <https://doi.org/10.1002/bip.22347>.

- (16) Seeman, N. C.; Rosenberg, J. M.; Suddath, F. L.; Kim, J. J. P.; Rich, A. RNA Double-Helical Fragments at Atomic Resolution: I. The Crystal and Molecular Structure of Sodium Adenylyl-3',5'-Uridine Hexahydrate. *Journal of Molecular Biology*; **1976**, *104* (1), 109-144. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90005-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90005-X).
- (17) Travers, A.; Muskhelishvili, G. DNA Structure and Function. *FEBS Journal*; **2015**, *282* (12), 2279-2295. <https://doi.org/10.1111/febs.13307>.
- (18) Rosenberg, J. M.; Seeman, N. C.; Day, R. O.; Rich, A. RNA Double-Helical Fragments at Atomic Resolution: II. The Crystal Structure of Sodium Guanylyl-3',5'-Cytidine Nonahydrate; **1976**, *104* (1), 145-167. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90006-1).
- (19) Marky, L. A.; Lee, H.; Garcia, A. Watson-Crick Base Pairs and Nucleic Acids Stability. *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003126.pub2>.
- (20) Rajski, S. R.; Jackson, B. A.; Barton, J. K. DNA Repair: Models for Damage and Mismatch Recognition. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; **2000**, *447* (1), 49-72. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00195-5).
- (21) Jaciuk, M.; Nowak, E.; Skowronek, K.; Tańska, A.; Nowotny, M. Structure of UvrA Nucleotide Excision Repair Protein in Complex with Modified DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*; **2011**, *18* (2), 191-197. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1973>.
- (22) Jain, V.; Hilton, B.; Lin, B.; Patnaik, S.; Liang, F.; Darian, E.; Zou, Y.; MacKerell, A. D.; Cho, B. P. Unusual Sequence Effects on Nucleotide Excision Repair of Arylamine Lesions: DNA Bending/Distortion as a Primary Recognition Factor. *Nucleic Acids Research*; **2013**, *41* (2), 869-880. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1077>.
- (23) Roos, W. P.; Kaina, B. DNA Damage-Induced Cell Death by Apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*; **2006**, *12* (9), 440-450. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.007>.
- (24) Norbury, C. J.; Zhivotovsky, B. DNA Damage-Induced Apoptosis. *Oncogene*; **2004**, *23* (16), 2797-2808. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207532>.
- (25) Leontis, N. B.; Stombaugh, J.; Westhof, E. The Non-Watson-Crick Base Pairs and Their Associated Isostericity Matrices. *Nucleic Acids Research*; **2002**, *30* (16), 3497-3531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf481>.
- (26) Nikolova, E. N.; Kim, E.; Wise, A. A.; O'Brien, P. J.; Andricioaei, I.; Al-Hashimi, H. M. Transient Hoogsteen Base Pairs in Canonical Duplex DNA. *Nature*; **2011**, *470* (7335), 498-502. <https://doi.org/10.1038/nature09775>.
- (27) Varani, G.; McClain, W. H. The G·U Wobble Base Pair. *EMBO Reports*; **2000**, *1* (1), 18-23. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd001>.
- (28) Šponer, J. E.; Špačková, N. D. A.; Leszczynski, J.; Šponer, J. Principles of RNA Base Pairing: Structures and Energies of the Trans Watson-Crick/ Sugar Edge Base Pairs. *Journal of Physical Chemistry B*; **2005**, *109* (22), 11399-11410. <https://doi.org/10.1021/jp051126r>.
- (29) Varshney, D.; Spiegel, J.; Zyner, K.; Tannahill, D.; Balasubramanian, S. The Regulation and Functions of DNA and RNA G-Quadruplexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; **2020**, *21* (8), 459-474. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0236-x>.

- (30) Balasubramanian, S.; Neidle, S. G-Quadruplex Nucleic Acids as Therapeutic Targets. *Current Opinion in Chemical Biology*; **2009**, *13* (3), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.637>.
- (31) Nikolova, E. N.; Zhou, H.; Gottardo, F. L.; Alvey, H. S.; Kimsey, I. J.; Al-Hashimi, H. M. A Historical Account of Hoogsteen Base-Pairs in Duplex DNA. *Biopolymers*; **2013**, *99* (12), 955-968. <https://doi.org/10.1002/bip.22334>.
- (32) Takahashi, S.; Sugimoto, N. Watson-Crick versus Hoogsteen Base Pairs: Chemical Strategy to Encode and Express Genetic Information in Life. *Accounts of Chemical Research*; **2021**, *54* (9), 2110-2120. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00734>.
- (33) Zhou, W.; Saran, R.; Liu, J. Metal Sensing by DNA. *Chemical Reviews*; **2017**, *117* (12), 8272-8325. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00063>.
- (34) Sigel, H. Interactions of Metal Ions with Nucleotides and Nucleic Acids and Their Constituents. *Chemical Society Reviews*; **1993**, *22* (4), 255-267. <https://doi.org/10.1039/CS9932200255>.
- (35) Müller, J. Functional Metal Ions in Nucleic Acids. *Metallomics*; **2010**, *2* (5), 318-327. <https://doi.org/10.1039/c000429d>.
- (36) Hadjiliadis, N.; Sletten, E. *Metal Complex-DNA Interactions*; John Wiley & Sons, 2009. <https://doi.org/10.1002/9781444312089>.
- (37) Naskar, S.; Guha, R.; Müller, J. Metal-Modified Nucleic Acids: Metal-Mediated Base Pairs, Triples, and Tetrads. *Angewandte Chemie - International Edition*; **2020**, *59* (4), 1397–1406. <https://doi.org/10.1002/anie.201905913>.
- (38) Jash, B.; Müller, J. Metal-Mediated Base Pairs: From Characterization to Application. *Chemistry - A European Journal*; **2017**, *23* (68), 17166–17178. <https://doi.org/10.1002/chem.201703518>.
- (39) Müller, J.; Lippert, B. *Modern Avenues in Metal-Nucleic Acid Chemistry*; CRC Press, 2023. <https://doi.org/10.1201/9781003270201>.
- (40) Lobinski, R.; Becker, J. S.; Haraguchi, H.; Sarkar, B. Metallomics: Guidelines for Terminology and Critical Evaluation of Analytical Chemistry Approaches (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*; **2010**, *82* (2), 493-504. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-09-03-04>.
- (41) Ono, A.; Torigoe, H.; Tanaka, Y.; Okamoto, I. Binding of Metal Ions by Pyrimidine Base Pairs in DNA Duplexes. *Chemical Society Reviews*; **2011**, *40* (12), 5855-5866. <https://doi.org/10.1039/c1cs15149e>.
- (42) Kazakov, S. A.; Hecht, S. M. Nucleic Acid–Metal Ion Interactions. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, 2005. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0152>.
- (43) Martin, R. B. Nucleoside Sites for Transition Metal Ion Binding. *Accounts of Chemical Research*; **1985**, *18* (2), 32-28. <https://doi.org/10.1021/ar00110a001>.
- (44) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society*; **1963**, *85* (22), 3533-3539. <https://doi.org/10.1021/ja00905a001>.
- (45) Jensen, W. B. The Lewis Acid-Base Definitions: A Status Report. *Chemical Reviews*; **1978**, *78* (1), 1-22. <https://doi.org/10.1021/cr60311a002>.
- (46) Crabtree, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*; John Wiley & Sons, 2009.

- (47) Haaland, A. Covalent versus Dative Bonds to Main Group Metals, a Useful Distinction. *Angewandte Chemie International Edition in English*; **1989**, 28 (8), 992-1007. <https://doi.org/10.1002/anie.198909921>.
- (48) Nimmermark, A.; Öhrström, L.; Reedijk, J. Metal-Ligand Bond Lengths and Strengths: Are They Correlated? A Detailed CSD Analysis. *Zeitschrift für Kristallographie*; **2013**, 228, 311-317. <https://doi.org/10.1524/zkri.2013.1605>.
- (49) Ghosh, S.; Defrancq, E. Metal-Complex/DNA Conjugates: A Versatile Building Block for DNA Nanoarrays. *Chemistry - A European Journal*; **2010**, 16 (43), 12780-12787. <https://doi.org/10.1002/chem.201001590>.
- (50) Rodgers, M. T.; Armentrout, P. B. Noncovalent Metal-Ligand Bond Energies AS Studied by Threshold Collision-Induced Dissociation. *Mass Spectrometry Reviews*; **2000**, 19 (4), 215-247. [https://doi.org/10.1002/1098-2787\(200007\)19:4<215::AID-MAS2>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1098-2787(200007)19:4<215::AID-MAS2>3.0.CO;2-X).
- (51) Kotammagari, T. K.; Saleh, L. Y.; Lönnberg, T. Organometallic Modification Confers Oligonucleotides New Functionalities. *Chemical Communications*; **2024**, 60 (23), 3118-3128. <https://doi.org/10.1039/d4cc00305e>.
- (52) Kim, S. H.; Martin, R. B. Binding Sites and Stabilities of Transition Metal Ions with Nucleosides and Related Ligands. *Inorganica Chimica Acta*; **1984**, 91 (1), 19-24. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)84213-9](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)84213-9).
- (53) Takezawa, Y.; Shionoya, M. Metal-Mediated DNA Base Pairing: Alternatives to Hydrogen-Bonded Watson-Crick Base Pairs. *Accounts of Chemical Research*; **2012**, 45 (12), 2066-2076. <https://doi.org/10.1021/ar200313h>.
- (54) Taherpour, S.; Golubev, O.; Lönnberg, T. Inorganica Chimica Acta On the Feasibility of Recognition of Nucleic Acid Sequences by Metal-Ion-Carrying Oligonucleotides. *Inorganica Chimica Acta*; **2016**, 452, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.01.025>.
- (55) He, C.; Yue, H.; Xu, L.; Liu, Y.; Song, Y.; Tang, C.; Yin, C. SiRNA Release Kinetics from Polymeric Nanoparticles Correlate with RNAi Efficiency and Inflammation Therapy via Oral Delivery. *Acta Biomaterialia*; **2020**, 103, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.005>.
- (56) Larcher, L. M.; Pitout, I. L.; Keegan, N. P.; Veedu, R. N.; Fletcher, S. DNazymes: Expanding the Potential of Nucleic Acid Therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics*; **2023**, 33(3), 178-192. <https://doi.org/10.1089/nat.2022.0066>.
- (57) Behlke, M. A. Progress towards in Vivo Use of SiRNAs. *Molecular Therapy*; **2006**, 13(4), 644-670. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.01.001>.
- (58) Yang, E.; van Nimwegen, E.; Zavolan, M.; Rajewsky, N.; Schroeder, M.; Magnasco, M.; Darnell, J. E. Decay Rates of Human MRNAs: Correlation with Functional Characteristics and Sequence Attributes. *Genome Research*; **2003**, 13 (8), 1863-1872. <https://doi.org/10.1101/gr.1272403>.
- (59) Bäckström, E.; Bonetti, A.; Johnsson, P.; Öhlin, S.; Dahlén, A.; Andersson, P.; Andersson, S.; Gennemark, P. Tissue Pharmacokinetics of Antisense Oligonucleotides. *Molecular Therapy Nucleic Acids*; **2024**, 35 (1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102133>.
- (60) Bost, J. P.; Barriga, H.; Holme, M. N.; Gallud, A.; Maugeri, M.; Gupta, D.; Lehto, T.; Valadi, H.; Esbjörner, E. K.; Stevens, M. M.; El-Andaloussi, S. Delivery of Oligonucleotide Therapeutics: Chemical Modifications,

- Lipid Nanoparticles, and Extracellular Vesicles. *ACS Nano*; **2021**, *15* (9), 13993-14021.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05099>.
- (61) Gagliardi, M.; Ashizawa, A. T. The Challenges and Strategies of Antisense Oligonucleotide Drug Delivery. *Biomedicines*; **2021**, *9* (4), 433. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040433>.
- (62) Guo, P.; Coban, O.; Snead, N. M.; Trebley, J.; Hoeplich, S.; Guo, S.; Shu, Y. Engineering Rna for Targeted Sirna Delivery and Medical Application. *Advanced Drug Delivery Reviews*; **2010**, *62* (6), 650-666.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.008>.
- (63) Miteva, M.; Kirkbride, K. C.; Kilchrist, K. V.; Werfel, T. A.; Li, H.; Nelson, C. E.; Gupta, M. K.; Giorgio, T. D.; Duvall, C. L. Tuning PEGylation of Mixed Micelles to Overcome Intracellular and Systemic SiRNA Delivery Barriers. *Biomaterials*; **2015**, *38*, 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.036>.
- (64) Switzer, C.; Shin, D. A Pyrimidine-like Nickel(II) DNA Base Pair. *Chemical Communications*; **2005**, *10*, 1342-1344. <https://doi.org/10.1039/b415426f>.
- (65) Heuberger, B. D.; Shin, D.; Switzer, C. Two Watson-Crick-like Metallo Base-Pairs. *Organic Letters*; **2008**, *10* (6), 1091-1094. <https://doi.org/10.1021/ol703029d>.
- (66) Meggers, E.; Holland, P. L.; Tolman, W. B.; Romesberg, F. E.; Schultz, P. G. A Novel Copper-Mediated DNA Base Pair [6]. *Journal of the American Chemical Society*; **2000**, *122* (43), 10714-10715.
<https://doi.org/10.1021/ja0025806>.
- (67) Tanaka, K.; Tengeiji, A.; Kato, T.; Toyama, N.; Shiro, M.; Shionoya, M. Efficient Incorporation of a Copper Hydroxypyridone Base Pair in DNA. *Journal of the American Chemical Society*; **2002**, *124* (42), 12494-12498. <https://doi.org/10.1021/ja027175o>.
- (68) Richters, T.; Krug, O.; Kösters, J.; Hepp, A.; Müller, J. A Family of “Click” Nucleosides for Metal-Mediated Base Pairing: Unravelling the Principles of Highly Stabilizing Metal-Mediated Base Pairs. *Chemistry - A European Journal*; **2014**, *20* (25), 7811-7818. <https://doi.org/10.1002/chem.201402221>.
- (69) Richters, T.; Müller, J. A Metal-Mediated Base Pair with a [2+1] Coordination Environment. *European Journal of Inorganic Chemistry*; **2014**, *2014* (3), 437-441. <https://doi.org/10.1002/ejic.201301491>.
- (70) Hensel, S.; Megger, N.; Schweizer, K.; Müller, J. Second Generation Silver(I)-Mediated Imidazole Base Pairs. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*; **2014**, *10* (1), 2139-2144. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.221>.
- (71) Mehrotra, R. C. *Organometallic Chemistry*; New Age International, 2007.
- (72) Bhatt, V. *Essentials of Coordination Chemistry: A Simplified Approach with 3D Visuals*; Academic Press, 2015.
- (73) Clever, G. H.; Carell, T. Controlled Stacking of 10 Transition-Metal Ions inside a DNA Duplex. *Angewandte Chemie - International Edition*; **2007**, *46* (1-2), 250-253. <https://doi.org/10.1002/anie.200603099>.
- (74) Kondo, J.; Tada, Y.; Dairaku, T.; Hattori, Y.; Saneyoshi, H.; Ono, A.; Tanaka, Y. A Metallo-DNA Nanowire with Uninterrupted One-Dimensional Silver Array. *Nature Chemistry*; **2017**, *9* (10), 956-960.
<https://doi.org/10.1038/nchem.2808>.
- (75) Ono, A.; Kanazawa, H.; Ito, H.; Goto, M.; Nakamura, K.; Saneyoshi, H.; Kondo, J. A Novel DNA Helical Wire Containing HgII-Mediated T:T and T:G Pairs. *Angewandte Chemie - International Edition*; **2019**, *58* (47), 16991-16994. <https://doi.org/10.1002/anie.201910029>.

- (76) Liu, Y.; Liu, G.; Hnatowich, D. J. A Brief Review of Chelators for Radiolabeling Oligomers. *Materials*; **2010**, *3* (5), 3204-3217. <https://doi.org/10.3390/ma3053204>.
- (77) Lesnikowski, Z. DNA as Platform for New Biomaterials. Metal-Containing Nucleic Acids. *Current Organic Chemistry*; **2007**, *11* (4), 355-381. <https://doi.org/10.2174/138527207780059358>.
- (78) Zhou, W.; Liu, J. Multi-Metal-Dependent Nucleic Acid Enzymes. *Metallomics*; **2018**, *10* (1), 30-48. <https://doi.org/10.1039/c7mt00268h>.
- (79) Ukale, D.; Maity, S.; Hande, M.; Lönnberg, T. Synthesis and Hybridization Properties of Covalently Mercurred and Palladated Oligonucleotides. *Synlett*; **2019**, *30* (15), 1733-1737. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1611821>.
- (80) Duprey, J. H. A.; Tucker, J. H. R. ChemInform Abstract: Metal—Carbon Bonds in Biopolymer Conjugates: Bioorganometallic Nucleic Acid Chemistry. *ChemInform*; **2014**, *45* (24), 157-163. <https://doi.org/10.1002/chin.201424282>.
- (81) Collado, A.; Gómez-Gallego, M.; Sierra, M. A. Nucleobases Having M—C Bonds: An Emerging Bio-Organometallic Field. *European Journal of Organic Chemistry*; **2018**, *2018* (14), 1617-1623. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201800135>.
- (82) Kowalski, K. Organometallic Nucleosides—Synthesis, Transformations, and Applications. *Coordination Chemistry Reviews*; **2021**, *432*, 213705. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213705>.
- (83) Lönnberg, T. Metals in Genotyping. *Modern Avenues in Metal-Nucleic Acid Chemistry*; **2023**. <https://doi.org/10.1201/9781003270201-9>.
- (84) Mucic, R. C.; Herrlein, M. K.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. Synthesis and Characterization of DNA with Ferrocenyl Groups Attached to Their 5'-Termini: Electrochemical Characterization of a Redox-Active Nucleotide Monolayer. *Chemical Communications*; **1996**, *4*, 555-557. <https://doi.org/10.1039/CC9960000555>.
- (85) Zatsepin, T. S.; Andreev, S. Y.; Hianik, T.; Oretskaya, T. S. Ferrocene-Containing Nucleic Acids. Synthesis and Electrochemical Properties. *Russian Chemical Reviews*; **2003**, *72* (6), 537-554. <https://doi.org/10.1070/rc2003v072n06abeh000807>.
- (86) Dougan, H.; Hobbs, J. B.; Weitz, J. I.; Lyster, D. M. Synthesis and Radioiodination of a Stannyl Oligodeoxyribonucleotide. *Nucleic Acids Research*; **1997**, *25* (14), 2897-2901. <https://doi.org/10.1093/nar/25.14.2897>.
- (87) Dale, R. M. K.; Martin, E.; Livingston, D. C.; Ward, D. C. Direct Covalent Mercuration of Nucleotides and Polynucleotides. *Biochemistry*; **1975**, *14* (11), 2447-2457. <https://doi.org/10.1021/bi00682a027>.
- (88) Ukale, D.; Shinde, V. S.; Lönnberg, T. 5-Mercuricytosine : An Organometallic Janus Nucleobase. *Chemistry-A European Journal*; **2016**, *22* (23) 7917–7923. <https://doi.org/10.1002/chem.201600851>.
- (89) Ukale, D.; Lönnberg, T. Organomercury Nucleic Acids: Past, Present and Future. *ChemBioChem*; **2021**, *22* (10), 1733-1739. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000821>.
- (90) Aro-Heinilä, A.; Lönnberg, T.; Virta, P. 3-Fluoro-2-Mercuri-6-Methylaniline Nucleotide as a High-Affinity Nucleobase-Specific Hybridization Probe. *Bioconjugate Chemistry*; **2019**, *30* (8), 2183–2190. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00405>.

- (91) Aro-Heinilä, A.; Lepistö, A.; Äärelä, A.; Lönnberg, T. A.; Virta, P. 2-Trifluoromethyl-6-Mercurianiline Nucleotide, a Sensitive ¹⁹F NMR Probe for Hg(II)-Mediated Base Pairing. *Journal of Organic Chemistry*; **2022**, *87* (1), 137-146. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c02056>.
- (92) Martín-Ortiz, M.; Gómez-Gallego, M.; Ramírez De Arellano, C.; Sierra, M. A. The Selective Synthesis of Metallanucleosides and Metallanucleotides: A New Tool for the Functionalization of Nucleic Acids. *Chemistry - A European Journal*; **2012**, *18* (40), 12603-12608. <https://doi.org/10.1002/chem.201202327>.
- (93) Maity, S. K.; Lönnberg, T. Oligonucleotides Incorporating Palladacyclic Nucleobase Surrogates. *Chemistry - A European Journal* **2018**, *24* (6), 1274-1277. <https://doi.org/10.1002/chem.201705797>.
- (94) Cope, A. C.; Siekman, R. W. Formation of Covalent Bonds from Platinum or Palladium to Carbon by Direct Substitution. *Journal of The American Chemical Society*; **1965**, *87* (14), 3272-3273. <https://doi.org/10.1021/ja01092a063>.
- (95) Ukale, D. U.; Lönnberg, T. 2,6-Dimercuriphenol as a Bifacial Dinuclear Organometallic Nucleobase. *Angewandte Chemie - International Edition* **2018**, *57* (49), 16171-16175. <https://doi.org/10.1002/anie.201809398>.
- (96) Aro-Heinilä, A.; Lönnberg, T.; Virta, P. Covalently Mercurated Molecular Beacon for Discriminating the Canonical Nucleobases. *ChemBioChem* **2021**, *22* (2), 354-358. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000575>.
- (97) Kotammagari, T. K.; Tähtinen, P.; Lönnberg, T. Oligonucleotides Featuring a Covalently Mercurated 6-Phenylcarbazole Residue as High-Affinity Hybridization Probes for Thiopyrimidine-Containing Sequences. *Chemistry - A European Journal* **2022**, *28* (69), e202202530. <https://doi.org/10.1002/chem.202202530>.
- (98) Ukale, D. U.; Tähtinen, P.; Lönnberg, T. 1,8-Dimercuri-6-Phenyl-1H-Carbazole as a Monofacial Dinuclear Organometallic Nucleobase. *Chemistry - A European Journal* **2020**, *26* (10), 2164-2168. <https://doi.org/10.1002/chem.201905434>.
- (99) Moreau, J.; Dendane, N.; Schöllhorn, B.; Spinelli, N.; Fave, C.; Defrancq, E. Synthesis and Characterization of Oligonucleotide Conjugates Bearing Electroactive Labels. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **2013**, *23* (4), 955-958. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.057>.
- (100) Maity, S. K.; Lönnberg, T. A. Synthesis of Organometallic Oligonucleotides through Oximation with Metalated Benzaldehydes. *ACS Omega* **2019**, *4* (20), 18803-18808. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02804>.
- (101) Ge, D.; Levicky, R. A Comparison of Five Bioconjugatable Ferrocenes for Labeling of Biomolecules. *Chemical Communications* **2010**, *46* (38), 7190-7192. <https://doi.org/10.1039/c0cc02044c>.
- (102) Ferapontova, E. E.; Olsen, E. M.; Gothelf, K. V. An RNA Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Detection of Theophylline in Serum. *Journal of the American Chemical Society*; **2008**, *130* (13), 4256-4258. <https://doi.org/10.1021/ja711326b>.
- (103) Anne, A.; Bouchardon, A.; Moiroux, J. 3'-Ferrocene-Labeled Oligonucleotide Chains End-Tethered to Gold Electrode Surfaces: Novel Model Systems for Exploring Flexibility of Short DNA Using Cyclic Voltammetry. *Journal of the American Chemical Society*; **2003**, *125* (5), 1112-1113. <https://doi.org/10.1021/ja028640k>.

- (104) Anne, A.; Demaille, C. Dynamics of Electron Transport by Elastic Bending of Short DNA Duplexes. Experimental Study and Quantitative Modeling of the Cyclic Voltammetric Behavior of 3'-Ferrocenyl DNA End-Grafted on Gold. *Journal of the American Chemical Society*; **2006**, *128* (2), 542-557. <https://doi.org/10.1021/ja055112a>.
- (105) Hillier, S. C.; Frost, C. G.; Jenkins, A. T. A.; Braven, H. T.; Keay, R. W.; Flower, S. E.; Clarkson, J. M. An Electrochemical Study of Enzymatic Oligonucleotide Digestion. *Bioelectrochemistry*; 2004; *63* (1-2), 307-310. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2003.10.028>.
- (106) Takenaka, S.; Uto, Y.; Kondo, H.; Ihara, T.; Takagi, M. Electrochemically Active DNA Probes: Detection of Target DNA Sequences at Femtomole Level by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*; **1994**, *218* (2), 436-443. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1203>.
- (107) Olejniczak, A. B.; Plešek, J.; Kříž, O.; Lesnikowski, Z. J. A Nucleoside Conjugate Containing a Metallacarborane Group and Its Incorporation into a DNA Oligonucleotide. *Angewandte Chemie - International Edition* **2003**, *42* (46), 5918-5921. <https://doi.org/10.1002/anie.200352505>.
- (108) Olejniczak, A. B.; Kierzek, R.; Wickstrom, E.; Lesnikowski, Z. J. Synthesis, Physicochemical and Biochemical Studies of Anti-IRS-1 Oligonucleotides Containing Carborane and/or Metallacarborane Modification. *Journal of Organometallic Chemistry*; **2013**, *747*, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2013.05.022>.
- (109) Hunger, M.; Mutti, E.; Rieder, A.; Enders, B.; Nexo, E.; Kräutler, B. Organometallic B12-DNA Conjugate: Synthesis, Structure Analysis, and Studies of Binding to Human B12-Transporter Proteins. *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20* (41), 13103-13107. <https://doi.org/10.1002/chem.201404359>.
- (110) Mutti, E.; Hunger, M.; Fedosov, S.; Nexo, E.; Kräutler, B. Organometallic DNA-B12 Conjugates as Potential Oligonucleotide Vectors: Synthesis and Structural and Binding Studies with Human Cobalamin-Transport Proteins. *ChemBioChem* **2017**, *18* (22), 2280-2291. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700472>.
- (111) Boisten, F.; Maisuls, I.; Schäfer, T.; Strassert, C. A.; Müller, J. Site-Specific Covalent Metalation of DNA Oligonucleotides with Phosphorescent Platinum(II) Complexes. *Chemical Science*; **2023**, *14* (9), 2399-2404. <https://doi.org/10.1039/d2sc05916a>.
- (112) Ortiz, M.; Debela, A. M.; Svobodova, M.; Thorimbert, S.; Lesage, D.; Cole, R. B.; Hasenknopf, B.; O'Sullivan, C. K. PCR Incorporation of Polyoxometalate Modified Deoxynucleotide Triphosphates and Their Application in Molecular Electrochemical Sensing of Yersinia Pestis. *Chemistry - A European Journal* **2017**, *23* (44), 10597-10603. <https://doi.org/10.1002/chem.201701295>.
- (113) Debela, A. M.; Ortiz, M.; Beni, V.; Thorimbert, S.; Lesage, D.; Cole, R. B.; O'Sullivan, C. K.; Hasenknopf, B. Biofunctionalization of Polyoxometalates with DNA Primers, Their Use in the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Electrochemical Detection of PCR Products. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21* (49), 17721-17727. <https://doi.org/10.1002/chem.201502247>.
- (114) Müller, J.; Freisinger, E.; Lax, P.; Megger, D. A.; Polonius, F. A. Interaction of Pt(II) and Pd(II) Complexes of Terpyridine with 1-Methylazoles: A Combined Experimental and Density Functional Study. *Inorganica Chimica Acta*; **2007**, *360* (1), 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.07.031>.

- (115) Toiviala, M.; Kleemola, V.; Maity, S.; Lönnberg, T. Still Elusive – Pd(II)-Mediated Base Pairing by an Acetophenone Oxime Palladacycle within 15N-Labelled Double-Helical Oligonucleotides. *European Journal of Organic Chemistry*; **2023**, 26 (10), e202201443. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202201443>.
- (116) Räisälä, H.; Lönnberg, T. Covalently Palladated Oligonucleotides Through Oxidative Addition of Pd 0. *Chemistry - A European Journal* **2019**, 25 (18), 4751-4756. <https://doi.org/10.1002/chem.201806022>.
- (117) Hande, M.; Maity, S.; Lönnberg, T. Sequence Dependence of Pd(II)-Mediated Base Pairing by Palladacyclic Nucleobase Surrogates. *Journal of Inorganic Biochemistry*; **2021**, 222, 111506. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111506>.
- (118) Golubev, O.; Turc, G.; Lönnberg, T. Pd²⁺-Mediated Base Pairing in Oligonucleotides. *Journal of Inorganic Biochemistry*; **2016**, 155, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.11.008>.
- (119) Taherpour, S.; Lönnberg, H.; Lönnberg, T. 2,6-Bis(Functionalized) Purines as Metal-Ion-Binding Surrogate Nucleobases That Enhance Hybridization with Unmodified 2'-O-Methyl Oligoribonucleotides. *Organic & Biomolecular Chemistry*; **2013**, 11 (6), 991-1000. <https://doi.org/10.1039/c2ob26885j>.
- (120) Miyake, Y.; Togashi, H.; Tashiro, M.; Yamaguchi, H.; Oda, S.; Kudo, M.; Tanaka, Y.; Kondo, Y.; Sawa, R.; Fujimoto, T.; Machinami, T.; Ono, A. Mercury(II)-Mediated Formation of Thymine-Hg(II)-Thymine Base Pairs in DNA Duplexes. *Journal of the American Chemical Society*; **2006**, 128 (7), 2172-2173. <https://doi.org/10.1021/ja056354d>.
- (121) Katz, S. The Reversible Reaction of Hg (II) and Double-Stranded Polynucleotides a Step-Function Theory and Its Significance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects*; **1963**, 68, 240-253. [https://doi.org/10.1016/0926-6550\(63\)90435-3](https://doi.org/10.1016/0926-6550(63)90435-3).
- (122) Tanaka, Y.; Oda, S.; Yamaguchi, H.; Kondo, Y.; Kojima, C.; Ono, A. 15N-15N J-Coupling across Hg(II): Direct Observation of Hg(II)-Mediated T-T Base Pairs in a DNA Duplex. *Journal of the American Chemical Society*; **2007**, 129 (2), 244-245. <https://doi.org/10.1021/ja065552h>.
- (123) Šebera, J.; Burda, J.; Straka, M.; Ono, A.; Kojima, C.; Tanaka, Y.; Sychrovský, V. Formation of a Thymine-Hg(II)-Thymine Metal-Mediated DNA Base Pair: Proposal and Theoretical Calculation of the Reaction Pathway. *Chemistry - A European Journal* **2013**, 19 (30), 9884-9894. <https://doi.org/10.1002/chem.201300460>.
- (124) Kondo, J.; Yamada, T.; Hirose, C.; Okamoto, I.; Tanaka, Y.; Ono, A. Crystal Structure of Metallo DNA Duplex Containing Consecutive Watson-Crick-like T-Hg(II)-T Base Pairs. *Angewandte Chemie - International Edition* **2014**, 53 (9), 2385-2388. <https://doi.org/10.1002/anie.201309066>.
- (125) Yamaguchi, H.; Šebera, J.; Kondo, J.; Oda, S.; Komuro, T.; Kawamura, T.; Dairaku, T.; Kondo, Y.; Okamoto, I.; Ono, A.; Burda, J. V.; Kojima, C.; Sychrovský, V.; Tanaka, Y. The Structure of Metallo-DNA with Consecutive Thymine-Hg(II)-Thymine Base Pairs Explains Positive Entropy for the Metallo Base Pair Formation. *Nucleic Acids Research*; **2014**, 42 (6), 4094-4099. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1344>.
- (126) Nicotra, F. Synthesis of C-Glycosides of Biological Interest. *Synthesis of Substrate Analogs and Mimetics*; **1997**, 55-83. <https://doi.org/10.1007/bfb0119253>.
- (127) Tyagi, S.; Kramer, F. R. Molecular Beacons: Probes That Fluoresce Upon Hybridization. *Nature biotechnology*; **1996**, 14 (3), 303-308. <https://doi.org/10.1038/nbt0396-303>.

- (128) Zheng, C.; Black, K. A.; Dos Santos, P. C. Diverse Mechanisms of Sulfur Decoration in Bacterial Trna and Their Cellular Functions. *Biomolecules*. **2017**, *7* (1), 33. <https://doi.org/10.3390/biom7010033>.
- (129) Shigi, N. Biosynthesis and Functions of Sulfur Modifications in TRNA. *Frontiers in Genetics*. **2014**, *5*, 81975. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00067>.
- (130) McKenney, K. M.; Alfonzo, J. D. From Prebiotics to Probiotics: The Evolution and Functions of TRNA Modifications. *Life*. **2016**, *6* (1), 13. <https://doi.org/10.3390/life6010013>.
- (131) Jäger, G.; Leipuviene, R.; Pollard, M. G.; Qian, Q.; Björk, G. R. The Conserved Cys-X1-X2-Cys Motif Present in the TtcA Protein Is Required for the Thiolation of Cytidine in Position 32 of TRNA from *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology*; **2004**, *186* (3), 750-757. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.750-757.2004>.
- (132) Agris, P. F. Wobble Position Modified Nucleosides Evolved to Select Transfer RNA Codon Recognition: A Modified-Wobble Hypothesis. *Biochimie*; **1991**, *73* (11), 1345-1349. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(91\)90163-U](https://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90163-U).
- (133) Urbonavičius, J.; Qian, Q.; Durand, J. M. B.; Hagervall, T. G.; Björk, G. R. Improvement of Reading Frame Maintenance Is a Common Function for Several TRNA Modifications. *EMBO Journal*; **2001**, *20* (17), 4863-4873. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4863>.
- (134) Ikeuchi, Y.; Shigi, N.; Kato, J. I.; Nishimura, A.; Suzuki, T. Mechanistic Insights into Sulfur Relay by Multiple Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at TRNA Wobble Positions. *Molecular cell*; **2006**, *21* (1), 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.001>.
- (135) Ogle, J. M.; Brodersen, D. E.; Clemons, J.; Tarry, M. J.; Carter, A. P.; Ramakrishnan, V. Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30S Ribosomal Subunit. *Science*; (1979) **201**, *292* (5518), 897-902. <https://doi.org/10.1126/science.1060612>.
- (136) Yarian, C.; Townsend, H.; Czestkowski, W.; Sochacka, E.; Malkiewicz, A. J.; Guenther, R.; Miskiewicz, A.; Agris, P. F. Accurate Translation of the Genetic Code Depends on TRNA Modified Nucleosides. *Journal of Biological Chemistry*; **2002**, *277* (19), 16391-16395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200253200>.
- (137) Wei, F. Y.; Zhou, B.; Suzuki, T.; Miyata, K.; Ujihara, Y.; Horiguchi, H.; Takahashi, N.; Xie, P.; Michiue, H.; Fujimura, A.; Kaitsuka, T.; Matsui, H.; Koga, Y.; Mohri, S.; Suzuki, T.; Oike, Y.; Tomizawa, K. Cdk5rap1-Mediated 2-Methylthio Modification of Mitochondrial TRNAs Governs Protein Translation and Contributes to Myopathy in Mice and Humans. *Cell metabolism*; **2015**, *21* (3), 428-442. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.019>.
- (138) Wei, F. Y.; Suzuki, T.; Watanabe, S.; Kimura, S.; Kaitsuka, T.; Fujimura, A.; Matsui, H.; Atta, M.; Michiue, H.; Fontecave, M.; Yamagata, K.; Suzuki, T.; Tomizawa, K. Deficit of TRNALys Modification by Cdk11 Causes the Development of Type 2 Diabetes in Mice. *Journal of Clinical Investigation*; **2011**, *121* (9), 3598-3608. <https://doi.org/10.1172/JCI58056>.
- (139) Torres, A. G.; Batlle, E.; Ribas de Pouplana, L. Role of TRNA Modifications in Human Diseases. *Trends in Molecular Medicine*. **2014**, *20* (6), 306-314. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.008>.

- (140) Yasukawa, T.; Kirino, Y.; Ishii, N.; Holt, I. J.; Jacobs, H. T.; Makifuchi, T.; Fukuhara, N.; Ohta, S.; Suzuki, T.; Watanabe, K. Wobble Modification Deficiency in Mutant TRNAs in Patients with Mitochondrial Diseases. *FEBS Letters* **2005**, *579* (13). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.038>.
- (141) Yasukawa, T.; Suzuki, T.; Ishii, N.; Ohta, S.; Watanabe, K. Wobble Modification Defect in TRNA Disturbs Codon-Anticodon Interaction in a Mitochondrial Disease. *EMBO Journal*; **2001**, *20* (17), 2948-2952. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4794>.
- (142) Kirino, Y.; Suzuki, T. Human Mitochondrial Diseases Associated with TRNA Wobble Modification Deficiency. *RNA Biology*. **2005**, *2* (2), 41-44. <https://doi.org/10.4161/rna.2.2.1610>.
- (143) Kirino, Y.; Yasukawa, T.; Ohta, S.; Akira, S.; Ishihara, K.; Watanabe, K.; Suzuki, T. Codon-Specific Translational Defect Caused by a Wobble Modification Deficiency in Mutant TRNA from a Human Mitochondrial Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; **2004**, *101* (42), 15070-15075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405173101>.
- (144) Guan, M. X.; Yan, Q.; Li, X.; Bykhovskaya, Y.; Gallo-Teran, J.; Hajek, P.; Umeda, N.; Zhao, H.; Garrido, G.; Mengesha, E.; Suzuki, T.; Del Castillo, I.; Peters, J. L.; Li, R.; Qian, Y.; Wang, X.; Ballana, E.; Shohat, M.; Lu, J.; Estivill, X.; Watanabe, K.; Fischel-Ghodsian, N. Mutation in TRMU Related to Transfer RNA Modification Modulates the Phenotypic Expression of the Deafness-Associated Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Mutations. *The American Journal of Human Genetics*; **2006**, *79* (2), 291-302. <https://doi.org/10.1086/506389>.
- (145) Mikulecky, P. J.; Feig, A. L. Heat Capacity Changes Associated with Nucleic Acid Folding. *Biopolymers*; **2006**, *81* (1), 38-58. <https://doi.org/10.1002/bip.20457>.
- (146) Schroeder, S. J.; Turner, D. H. Optical Melting Measurements of Nucleic Acid Thermodynamics. *Methods Enzymology*; **2009**, *468*, 371-387. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(09\)68017-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(09)68017-4).
- (147) Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčiuk, D.; Vorlíčková, M. Circular Dichroism and Conformational Polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*. **2009**, *37* (6), 1713-1725. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp026>.
- (148) Gray, D. M.; Ratliff, R. L.; Vaughan, M. R. [19] Circular dichroism spectroscopy of DNA. *Circular Dichroism Spectroscopy of DNA*; **1992**, *211*, 389-406. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)11021-A](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)11021-A).
- (149) Marky, L. A.; Breslauer, K. J. Calculating Thermodynamic Data for Transitions of Any Molecularity from Equilibrium Melting Curves. *Biopolymers*; **1987**, *26* (9), 1601-1620. <https://doi.org/10.1002/bip.360260911>.
- (150) Puglisi, J. D.; Tinoco, I. Absorbance Melting Curves of RNA. *Methods in Enzymology*; **1989**, *180*, 304-325. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(89\)80108-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(89)80108-9).
- (151) Mergny, J.-L.; Lacroix, L. *Analysis of Thermal Melting Curves*; **2003**, *13* (6), 515-537. <https://doi.org/10.1089/154545703322860825>.
- (152) Privalov, P. L.; Crane-Robinson, C. Forces Maintaining the DNA Double Helix. *European Biophysics Journal* **2020**, *49* (5), 315-321. <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01437-w>.
- (153) Lane, A. N.; Jenkins, T. C. Thermodynamics of Nucleic Acids and Their Interactions with Ligands. *Quarterly Reviews of Biophysics*; **2000**, *33* (3), 255-306. <https://doi.org/10.1017/S0033583500003632>.

- (154) Morrison, L. E.; Stols, L. M. Sensitive Fluorescence-Based Thermodynamic and Kinetic Measurements of DNA Hybridization in Solution. *Biochemistry*; **1993**, *32* (12), 3095–3104. <https://doi.org/10.1021/bi00063a022>.
- (155) Applequist, J.; Damle, V. Thermodynamics of the Helix-Coil Equilibrium in Oligoadenylic Acid from Hypochromicity Studies. *Journal of The American Chemical Society*; **1965**, *87* (7), 1450-1458. <https://doi.org/10.1021/ja01085a007>.
- (156) Ikeya, T.; Ban, D.; Lee, D.; Ito, Y.; Kato, K.; Griesinger, C. Solution NMR Views of Dynamical Ordering of Biomacromolecules. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*; **2018**, *1862* (2), 287-306. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.020>.
- (157) Gimenez, D.; Phelan, A.; Murphy, C. D.; Cobb, S. L. 19F NMR as a Tool in Chemical Biology. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*; **2021**, *17* (1), 293–318. <https://doi.org/10.3762/BJOC.17.28>.
- (158) Chen, H.; Viel, S.; Ziarelli, F.; Peng, L. F NMR: A Valuable Tool for Studying Biological Events. *Chemical Society Reviews*; **2013**, *42* (20), 7971–7982. <https://doi.org/10.1039/c3cs60129c>.
- (159) Marsh, E. N. G.; Suzuki, Y. Using 19F NMR to Probe Biological Interactions of Proteins and Peptides. *ACS Chemical Biology*; **2014**, *9* (6), 1242–1250. <https://doi.org/10.1021/cb500111u>.
- (160) Håkon Hope. Cryocrystallography of Biological Macromolecules: A Generally Applicable Method. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*; **1988**, *44* (1), 22-26. <https://doi.org/10.1107/S0108768187008632>
- (161) Hendrickson, W. A.; Ogata, C. M. [28] Phase Determination from Multiwavelength Anomalous Diffraction Measurements. *Methods in Enzymology*; **1997**, *276*, 494-523. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)76074-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)76074-9).
- (162) Correli, C. C.; Freeborn, B.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. Use of Chemically Modified Nucleotides to Determine a 62-Nucleotide Rna Crystal Structure: A Survey of Phosphorothioates, Br, Pt and Hg. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*; **1997**, *15* (2), 165–172. <https://doi.org/10.1080/07391102.1997.10508183>.
- (163) Yang, W.; Steitz, T. A. Crystal Structure of the Site-Specific Recombinase Resolvase Complexed with a 34 Bp Cleavage Site. *Cell*; **1995**, *82* (2), 193-207. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90307-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90307-0).
- (164) Brändén, G.; Neutze, R. Advances and Challenges in Time-Resolved Macromolecular Crystallography. *Science*. 2021. <https://doi.org/10.1126/science.aba0954>.
- (165) Gräwert, T. W.; Svergun, D. I. Structural Modeling Using Solution Small-Angle X-Ray Scattering (SAXS). *Journal of Molecular Biology*; **2020**, *432* (9), eaba0954. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.030>.
- (166) Da Vela, S.; Svergun, D. I. Methods, Development and Applications of Small-Angle X-Ray Scattering to Characterize Biological Macromolecules in Solution. *Current Research in Structural Biology*; **2020**, *2*, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.08.004>.
- (167) Bai, X. chen; Gonen, T.; Gronenborn, A. M.; Perrakis, A.; Thorn, A.; Yang, J. Challenges and Opportunities in Macromolecular Structure Determination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; **2024**, *25* (1), 7-12. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00659-y>.

- (168) Kirsch, P. *Modern Fluoroorganic Chemistry: Synthesis, Reactivity, Applications*; John Wiley & Sons, 2013. <https://doi.org/10.1002/9783527651351>.
- (169) Suzuki, Y.; Brender, J. R.; Soper, M. T.; Krishnamoorthy, J.; Zhou, Y.; Ruotolo, B. T.; Kotov, N. A.; Ramamoorthy, A.; Marsh, E. N. G. Resolution of Oligomeric Species during the Aggregation of A β 1-40 Using ¹⁹F NMR. *Biochemistry*; **2013**, *52* (11), 1903-1912. <https://doi.org/10.1021/bi400027y>.
- (170) O'Hagan, D.; Deng, H. Enzymatic Fluorination and Biotechnological Developments of the Fluorinase. *Chemical Reviews*; **2015**, *115* (2), 634-649. <https://doi.org/10.1021/cr500209t>.
- (171) Tredwell, M.; Gouverneur, V. *Comprehensive Chirality*; Elsevier Ltd, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095167-6.00106-3>.
- (172) Harris, R. K.; Becker, E. D.; Cabral De Menezes, S. M.; Goodfellow, R.; Granger, P. NMR Nomenclature. Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*; **2001**, *73* (11), 1795-1818. <https://doi.org/10.1351/pac200173111795>.
- (173) Granqvist, L. *Novel ¹⁹F Nmr Sensors for the Characterization of Higher-Order Secondary Structures of Dna and Rna*; V \ddot{a} it \ddot{o} skirja, 2018. ISBN 978-951-29-7253-1.
- (174) Granqvist, L.; Virta, P. 4'-C-[4-Trifluoromethyl-1 H -1,2,3-Triazol-1-Yl]Methyl]Thymidine as a Sensitive ¹⁹F NMR Sensor for the Detection of Oligonucleotide Secondary Structures. *The Journal of Organic Chemistry*; **2014**, *79* (8), 3529-3536. <https://doi.org/10.1021/jo500326j>.
- (175) Granqvist, L.; Virta, P. Sensor for the Detection of RNA Secondary Structures. *The Journal of Organic Chemistry*; **2015**, *80* (16), 2-11. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b00973>.
- (176) Xiao, G.; Parsons, J. F.; Tesh, K.; Armstrong, R. N.; Gilliland, G. L. Conformational Changes in the Crystal Structure of Rat Glutathione Transferase M1-1 with Global Substitution of 3-Fluorotyrosine for Tyrosine. *Journal of Molecular Biology*; **1998**, *281* (2), 323-339. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1935>.
- (177) Labroo, V. M.; Hebel, D.; Kirk, K. L.; Cohen, L. A.; Lemieux, C.; Schiller, P. W. Direct Electrophilic Fluorination of Tyrosine in Dermorphin Analogues and Its Effect on Biological Activity, Receptor Affinity and Selectivity. *International Journal of Peptide and Protein Research*; **1991**, *37* (5), 430-439. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1991.tb00758.x>.
- (178) Sanders Sevall, J. Factor V Leiden Genotyping Using Real-Time Fluorescent Polymerase Chain Reaction. *Molecular and Cellular Probes*; **2000**, *14* (4), 249-253. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2000.0313>.
- (179) Farzan, V. M.; Markelov, M. L.; Skoblov, A. Y.; Shipulin, G. A.; Zatsepin, T. S. Specificity of SNP Detection with Molecular Beacons Is Improved by Stem and Loop Separation with Spacers. *Analyst*; **2017**, *142* (6), 945-950. <https://doi.org/10.1039/c6an02441f>.
- (180) Kim, S.; Misra, A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*; **2007**, *9*, 289-320. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037>.
- (181) Davis, P. B. Cystic Fibrosis since 1938. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; **2006**, *173* (5), 475-482. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-840OE>.
- (182) Sachidanandam, R.; Weissman, D.; Schmidt, S. C.; Kakol, J. M.; Stein, L. D.; Marth, G.; Sherry, S.; Mullikin, J. C.; Mortimore, B. J.; Willey, D. L.; Hunt, S. E.; Cole, C. G.; Coggill, P. C.; Rice, C. M.; Ning, Z.; Rogers, J.; Bentley, D. R.; Kwok, P. Y.; Mardis, E. R.; Yeh, R. T.; Schultz, B.; Cook, L.; Davenport, R.;

- Dante, M.; Fulton, L.; Hillier, L.; Waterston, R. H.; McPherson, J. D.; Gilman, B.; Schaffner, S.; Van Etten, W. J.; Reich, D.; Higgins, J.; Daly, M. J.; Blumenstiel, B.; Baldwin, J.; Stange-Thomann, N.; Zody, M. C.; Linton, L.; Lander, E. S.; Altshuler, D. A Map of Human Genome Sequence Variation Containing 1.42 Million Single Nucleotide Polymorphisms. *Nature*; **2001**, *409* (6822), 928-933.
<https://doi.org/10.1038/35057149>.
- (183) Wang, D. G.; Fan, J. B.; Siao, C. J.; Berno, A.; Young, P.; Sapolsky, R.; Ghandour, G.; Perkins, N.; Winchester, E.; Spencer, J.; Kruglyak, L.; Stein, L.; Hsie, L.; Topaloglou, T.; Hubbell, E.; Robinson, E.; Mittmann, M.; Morris, M. S.; Shen, N.; Kilburn, D.; Rioux, J.; Nusbaum, C.; Rozen, S.; Hudson, T. J.; Lipshutz, R.; Chee, M.; Lander, E. S. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*; **1998**, *280* (5366), 1077-1082.
<https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1077>.
- (184) Brookes, A. J. The Essence of SNPs. *Gene*; **1999**, *234* (2), 177-186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X).
- (185) Guzey, C.; Spigset, O. Genotyping as a Tool to Predict Adverse Drug Reactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*; **2005**, *4* (13), 1409-1419. <https://doi.org/10.2174/1568026043387791>.
- (186) Clever, G. H.; Shionoya, M. Metal-Base Pairing in DNA. *Coordination Chemical Reviews*; **2010**, *254* (19-20), 2391-2402. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.014>.
- (187) Takezawa, Y.; Müller, J.; Shionoya, M. Artificial DNA Base Pairing Mediated by Diverse Metal Ions. *Chemistry Letters*; **2017**, *46* (5), 622-633. <https://doi.org/10.1246/cl.160985>.
- (188) Jash, B.; Scharf, P.; Sandmann, N.; Fonseca Guerra, C.; Megger, D. A.; Müller, J. A Metal-Mediated Base Pair That Discriminates between the Canonical Pyrimidine Nucleobases. *Chemical Science*; **2017**, *8* (2), 1337-1343. <https://doi.org/10.1039/c6sc03482a>.
- (189) Hashino, K.; Ito, M.; Ikawa, K.; Hosoya, C.; Nishioka, T.; Matsumoto, K. Application of a Lanthanide Fluorescent Chelate Label for Detection of Single-Nucleotide Mutations with Peptide Nucleic Acid Probes. *Analytical Biochemistry*; **2006**, *355* (2), 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.06.003>.
- (190) Matsumoto, K. Recent Developments in Lanthanide Chelates as Luminescent Labels for Biomedical Analyses. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*; Elsevier, 2020.
<https://doi.org/10.1016/bs.hpre.2020.07.002>.
- (191) Paleček, E. Fifty Years of Nucleic Acid Electrochemistry. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*; **2009**, *21* (3-5), 239-251.
<https://doi.org/10.1002/elan.200804416>.
- (192) Paleček, E.; Bartošík, M. Electrochemistry of Nucleic Acids. *Chemical Reviews*; **2012**, *112* (6), 3427-3481.
<https://doi.org/10.1021/cr200303p>.
- (193) Minuth, M.; Richert, C. A Nucleobase Analogue That Pairs Strongly with Adenine. *Angewandte Chemie*; **2013**, *125* (41), 11074-11077. <https://doi.org/10.1002/ange.201305555>.
- (194) Zhang, D.-W.; Li, Z.-T. Intramolecular N-H...X (X = F, Cl, Br, I, and S) Hydrogen Bonding in Aromatic Amide Derivatives - The X-Ray Crystallographic Investigation. *Current Trends in X-Ray Crystallography*; InTechOpen, 2011. <https://doi.org/10.5772/28876>.

- (195) Chopra, D. Is Organic Fluorine Really “Not” Polarizable? *Crystal Growth and Design*; **2012**, *12* (2), 541-546. <https://doi.org/10.1021/cg201498u>.
- (196) Dunitz, J. D.; Taylor, R. Organic Fluorine Hardly Ever Accepts Hydrogen Bonds. *Chemistry - A European Journal*; **1997**, *3* (1), 89-98. <https://doi.org/10.1002/chem.19970030115>.
- (197) Dunitz, J. D. Organic Fluorine: Odd Man Out. *ChemBioChem*; **2004**, *5* (5), 614-621. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300801>.
- (198) Howard, J. A. K.; Hoy, V. J.; O’Hagan, D.; Smith, G. T. How Good Is Fluorine as a Hydrogen Bond Acceptor? *Tetrahedron*; **1996**, *52* (38), 12613–12622. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00749-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00749-1).
- (199) Chaudhari, S. R.; Mogurampelly, S.; Suryaprakash, N. Engagement of CF₃ Group in N-H···F-C Hydrogen Bond in the Solution State: NMR Spectroscopy and MD Simulation Studies. *Journal of Physical Chemistry B*; **2013**, *117* (4), 1123-1129. <https://doi.org/10.1021/jp310798d>.

Liitteet

Liite 1. Lisämateriaali

Pro gradu

Tarkentavat tiedot

2-trifluorometyylianiiniinukleotidi metallivälitteisenä ^{19}F NMR-koettimena

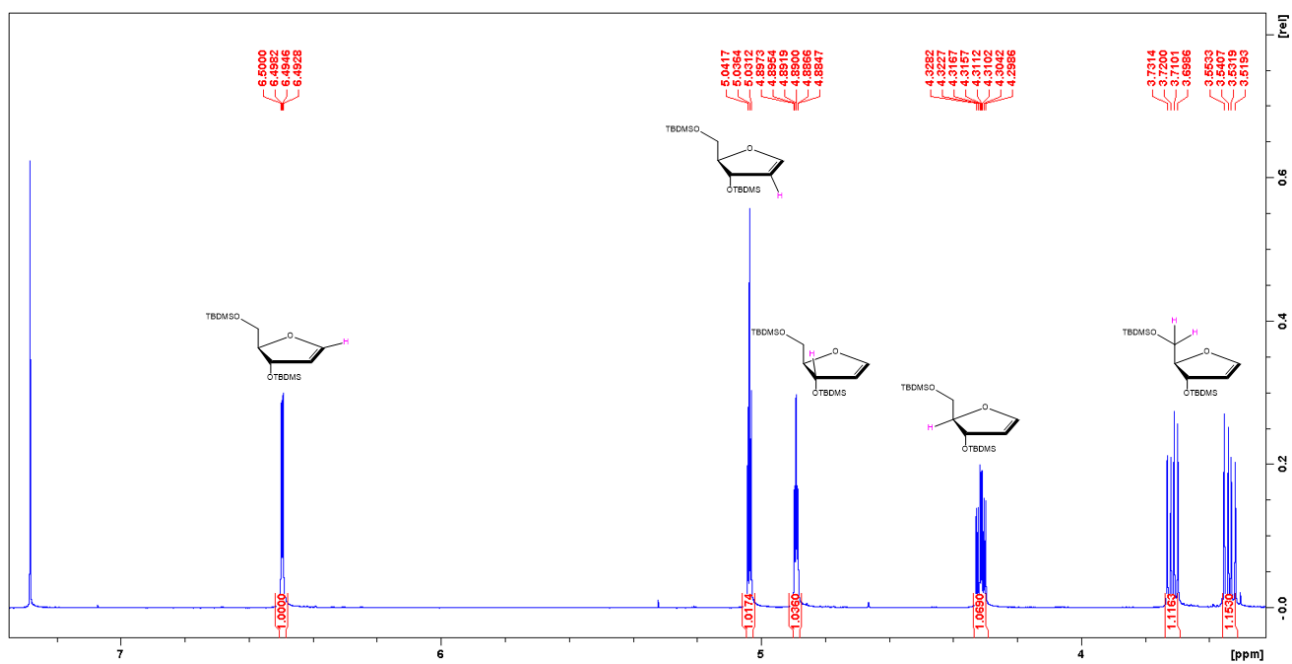
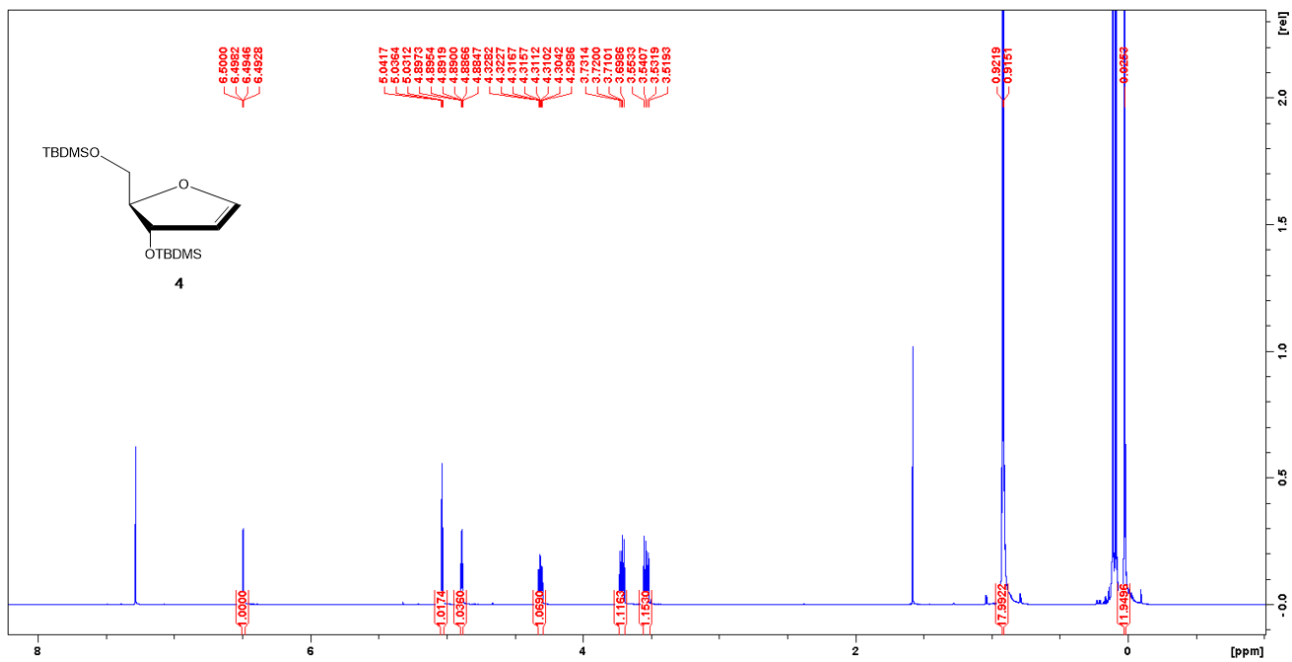
Assi Lepistö

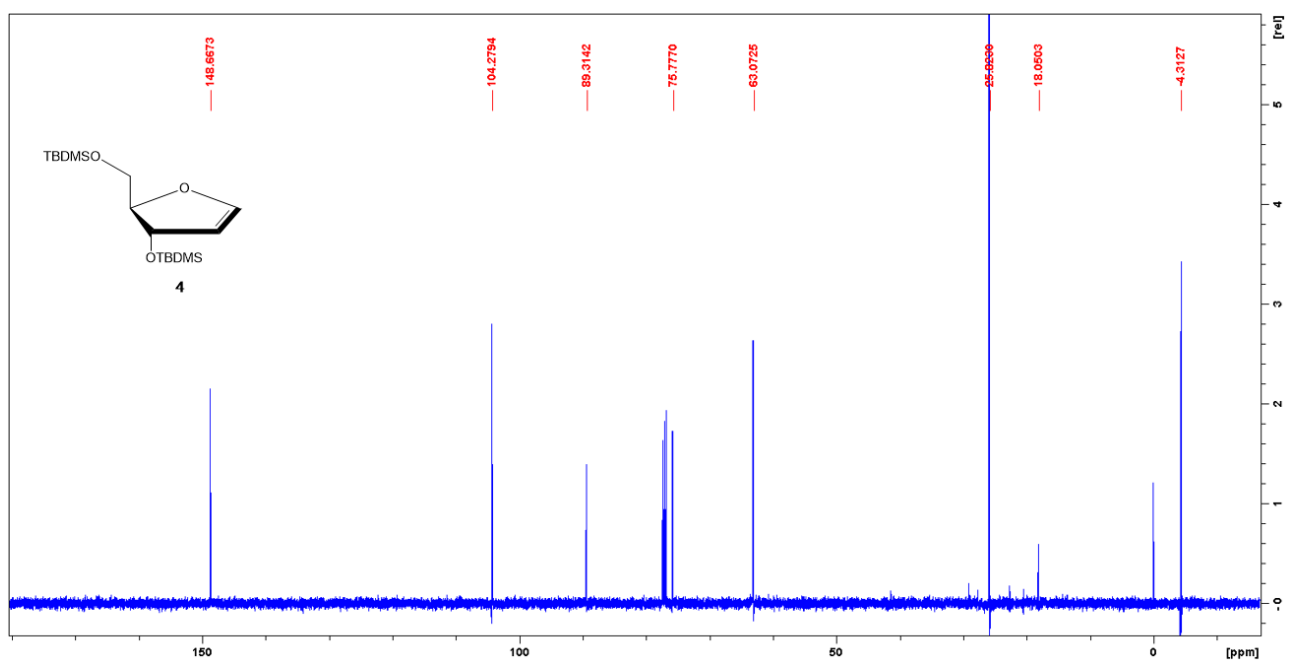
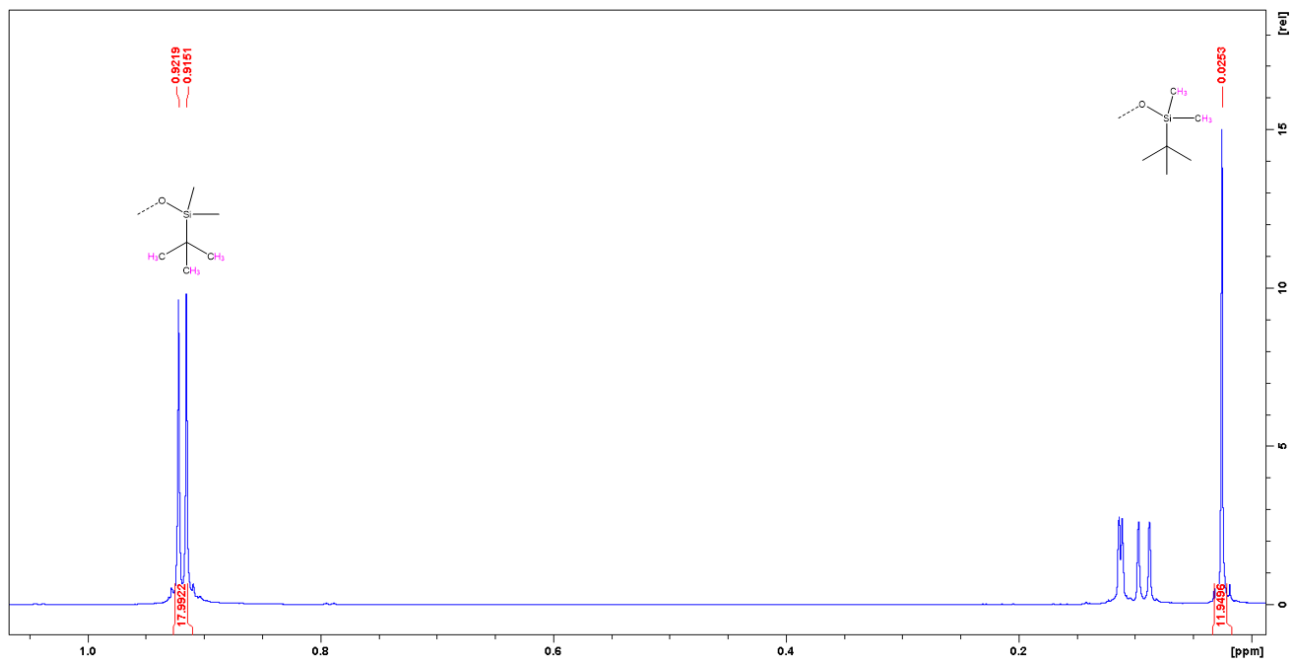
Tuomas Lönnberg, Pasi Virta

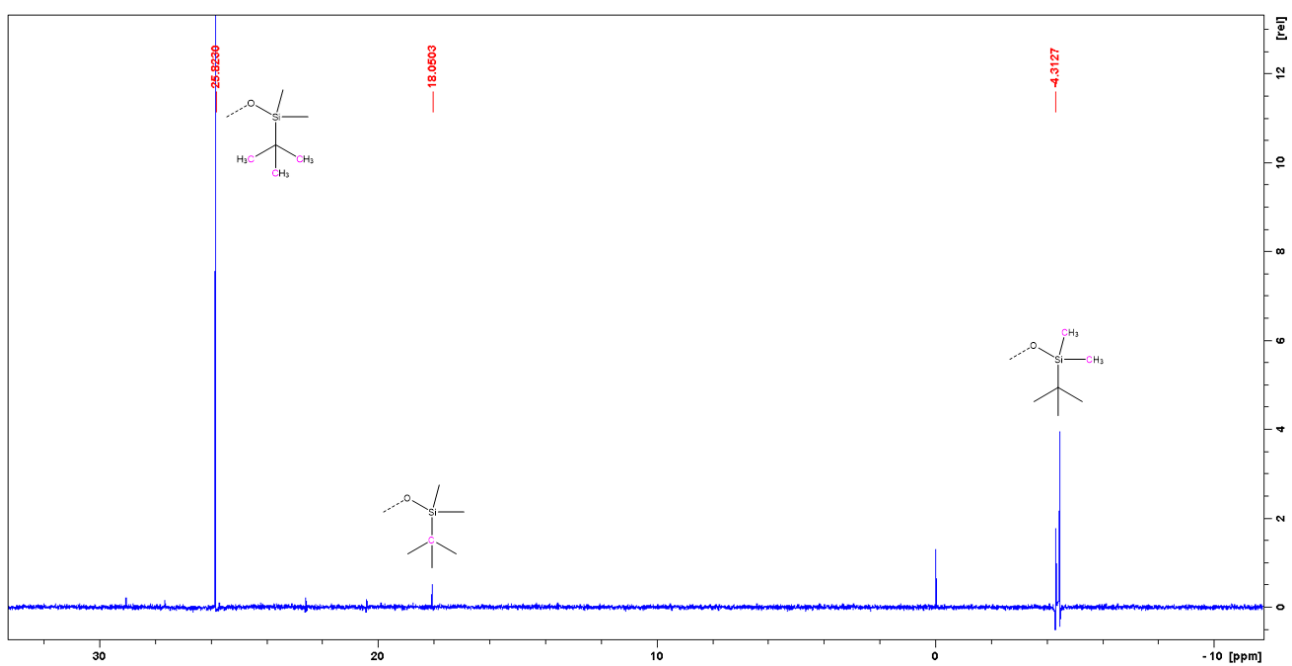
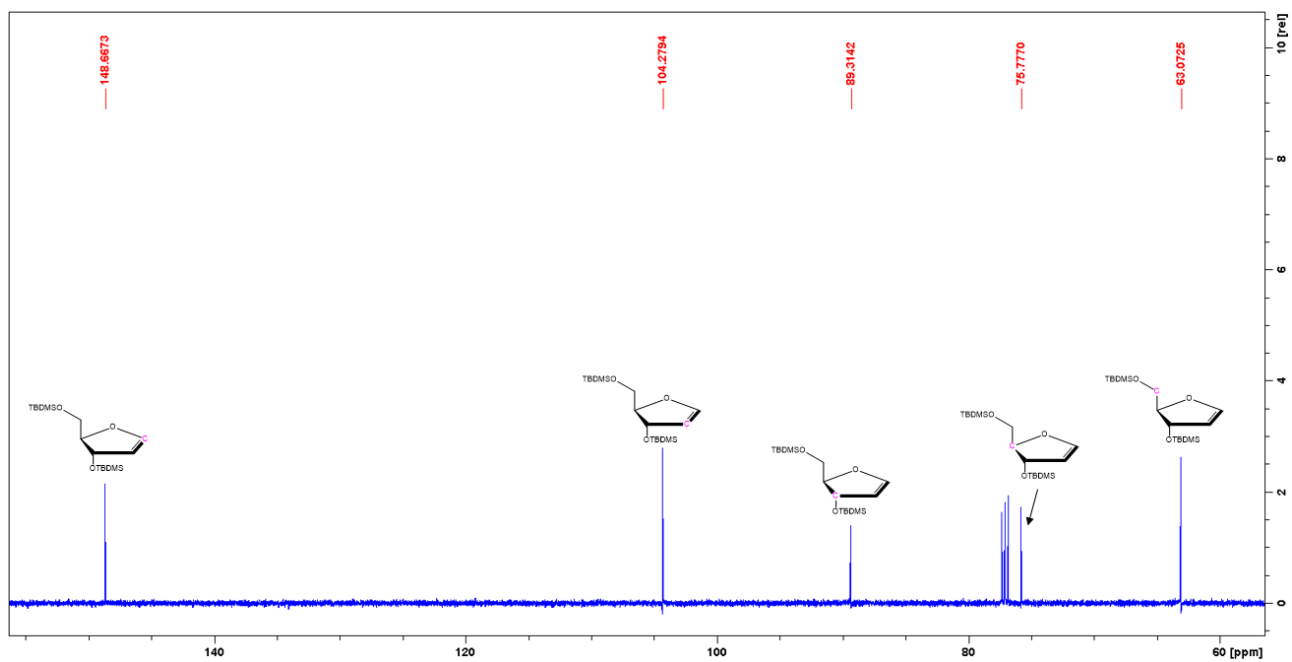
Sisältö

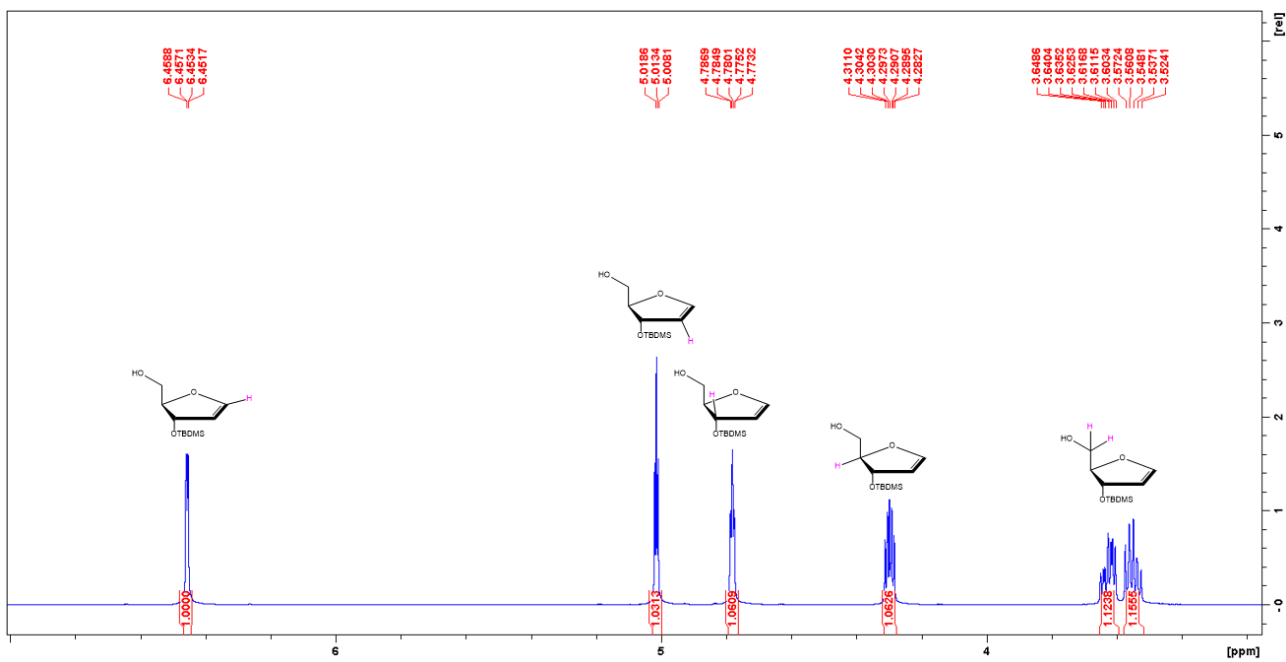
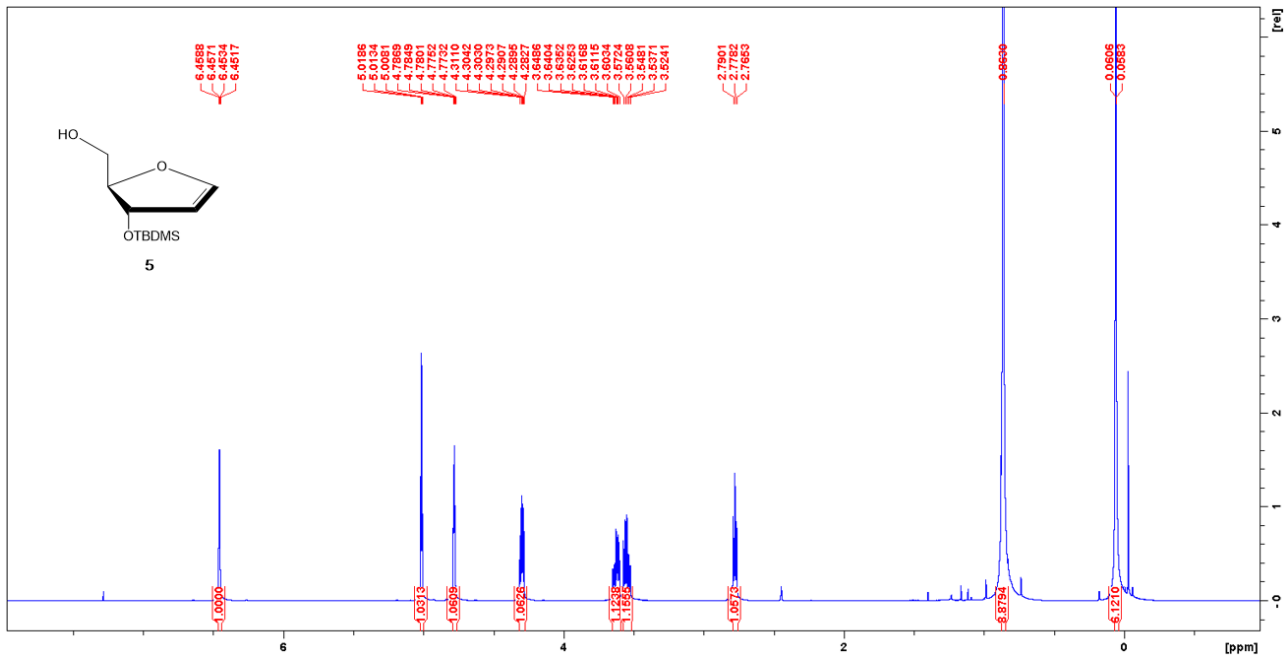
¹ H-NMR -spektri yhdisteestä 4	1
¹³ C-NMR -spektri yhdisteestä 4	2
¹ H-NMR -spektri yhdisteestä 5	4
¹ H-NMR -spektri yhdisteestä 7	5
¹³ C-NMR -spektri yhdisteestä 7	6
¹⁹ F-NMR -spektri yhdisteestä 7	8
¹ H-NMR -spektri yhdisteestä 8	8
¹³ C-NMR -spektri yhdisteestä 8	10
¹⁹ F-NMR -spektri yhdisteestä 8	12
(¹ H, ¹ H)-COSY -spektri yhdisteestä 8	13
(¹ H, ¹³ C)-HSQC -spektri yhdisteestä 8	13
(¹ H, ¹³ C) -HMBC -spektri yhdisteestä 8	14
¹ H-NMR -spektri yhdisteestä 9	14
¹³ C-NMR -spektri yhdisteestä 9	16
(¹ H, ¹ H)-COSY -spektri yhdisteestä 9	18
(¹ H, ¹³ C)-HSQC -spektri yhdisteestä 9	18
¹ H-NMR -spektri yhdisteestä 10	19
¹³ C-NMR -spektri yhdisteestä 10	20
¹⁹ F-NMR -spektri yhdisteestä 10	22
(¹ H, ¹ H)-COSY -spektri yhdisteestä 10	23
(¹ H, ¹³ C)-HSQC -spektri yhdisteestä 10	23
¹ H-NMR -spektri yhdisteestä 11	24
¹³ C-NMR -spektri yhdisteestä 11	25
¹⁹ F-NMR -spektri yhdisteestä 11	28
(¹ H, ¹ H)-COSY -spektri yhdisteestä 11	28
(¹ H, ¹³ C)-HSQC -spektri yhdisteestä 11	29
(¹ H, ¹³ C) -HMBC -spektri yhdisteestä 11	29
¹ H-NMR -spektri yhdisteestä 12	30
¹³ C-NMR -spektri yhdisteestä 12	32
¹⁹ F-NMR -spektri yhdisteestä 12	36
³¹ P-NMR -spektri yhdisteestä 12	36
(¹ H, ¹ H)-COSY -spektri yhdisteestä 12	37
(¹ H, ¹³ C)-HSQC -spektri yhdisteestä 12	38
(¹ H, ¹³ C) -HMBC -spektri yhdisteestä 11	38
¹⁹ F-NMR -spektri oligonukleotidille ON1	39
¹⁹ F-NMR -spektri oligonukleotidille ON2	38
¹⁹ F-NMR -spektri oligonukleotidille ON3	40
Kuva 1. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 7	41
Kuva 2. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 8	42
Kuva 3. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 9	43

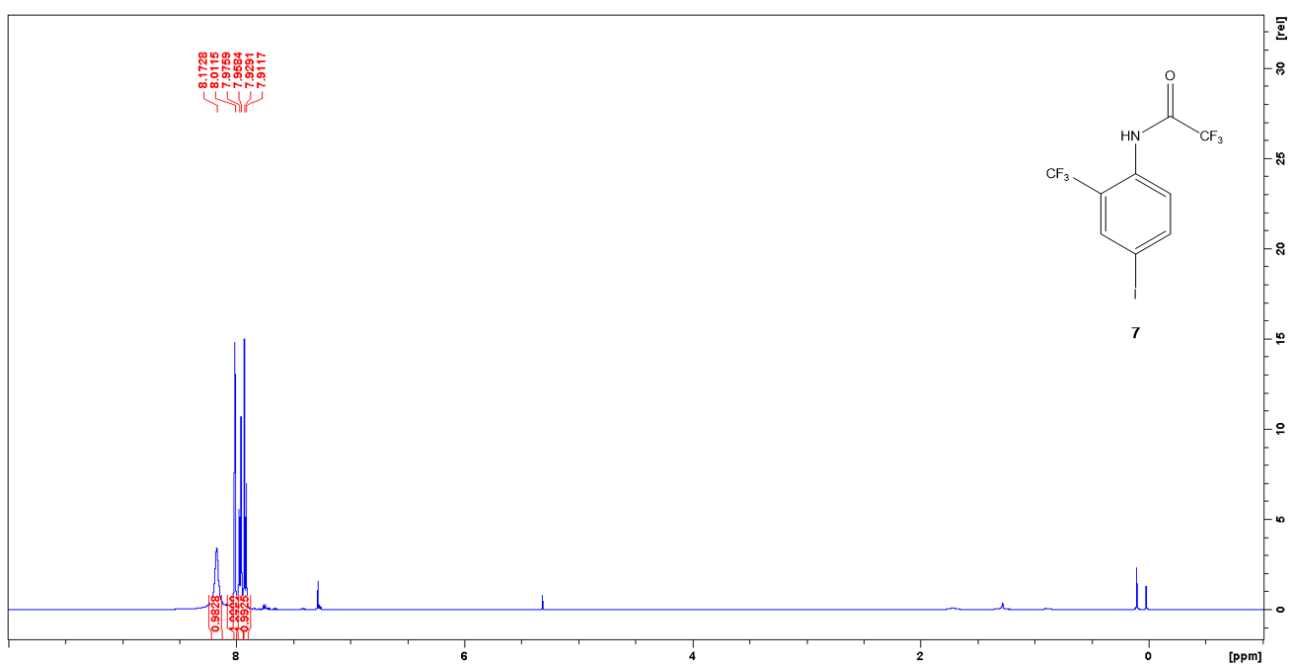
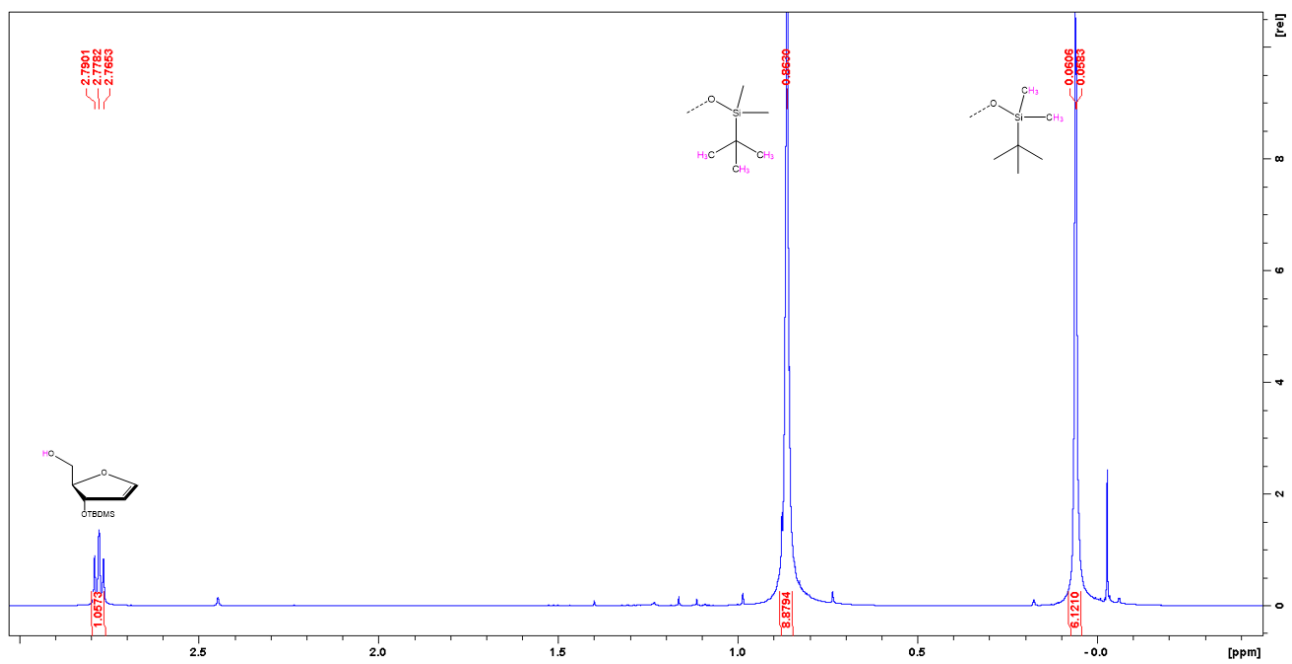
Kuva 4. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 10	44
Kuva 5. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 11	45
Kuva 6. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 12	46
Kuva 7. RP-HPLC kromatogrammi oligonukleotidista ON1	47
Kuva 8. ESI massa spektri oligonukleotidille ON1	48
Kuva 9. RP-HPLC kromatogrammi oligonukleotidista ON2	49
Kuva 10. ESI massa spektri oligonukleotidille ON2	50
Kuva 11. RP-HPLC kromatogrammi oligonukleotidista ON3	51
Kuva 12. ESI massa spektri oligonukleotidille ON3	52

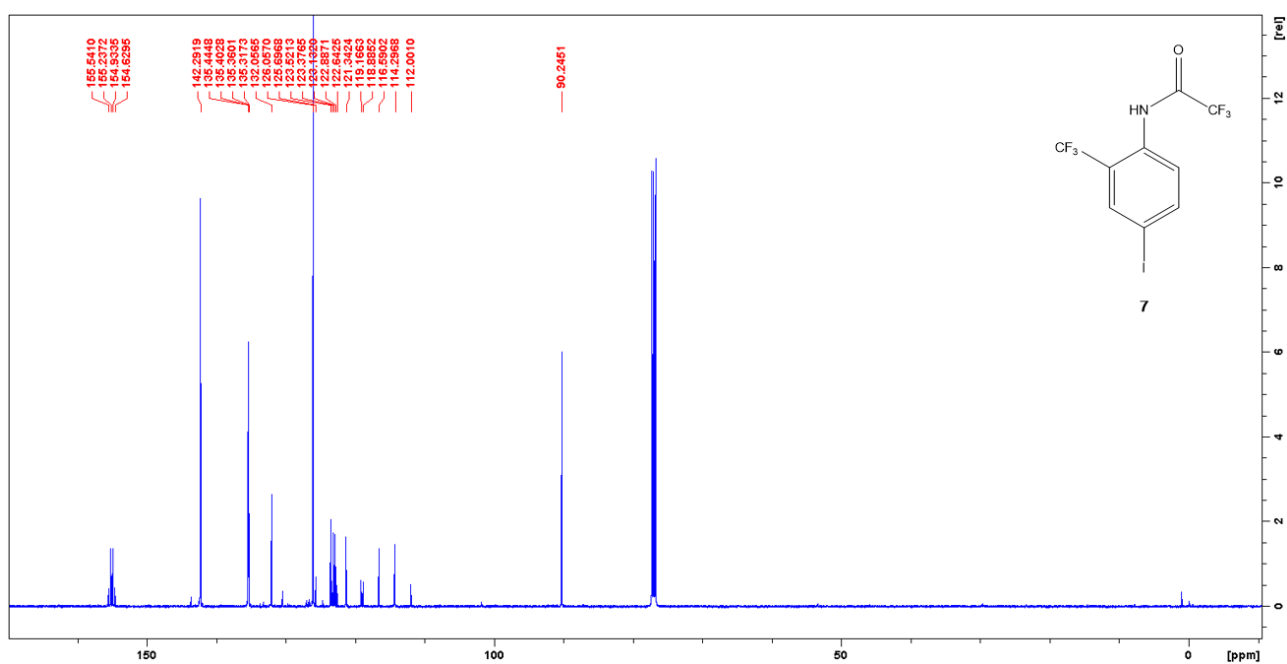
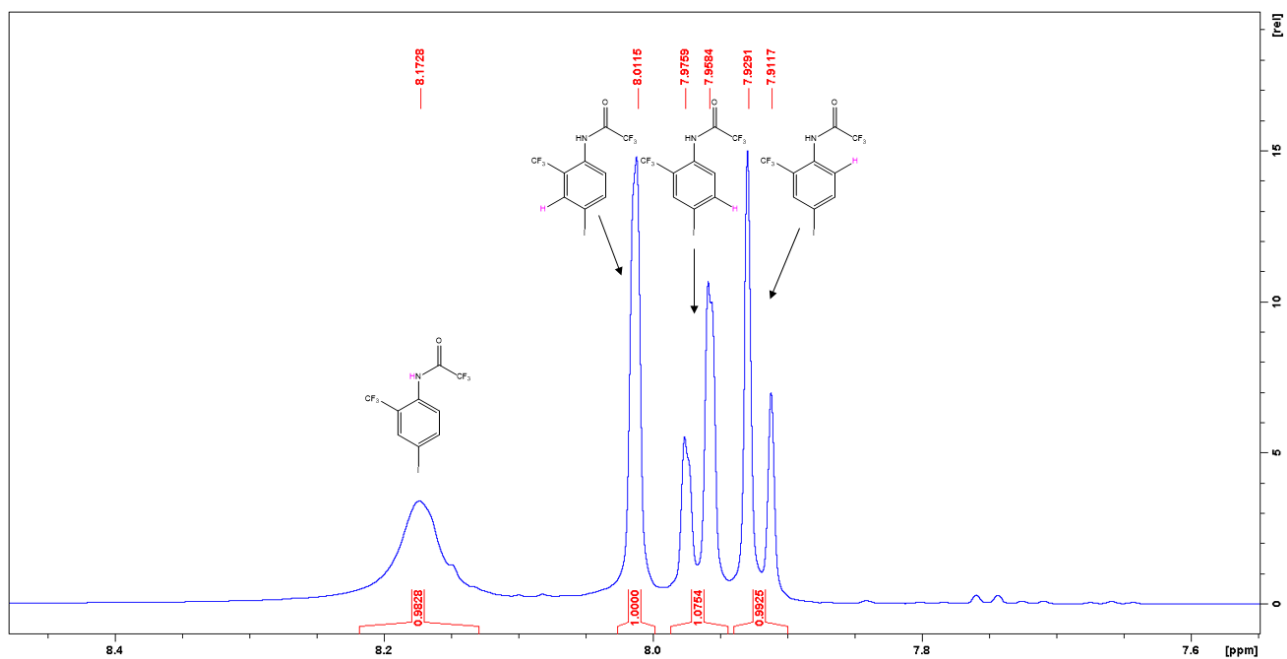


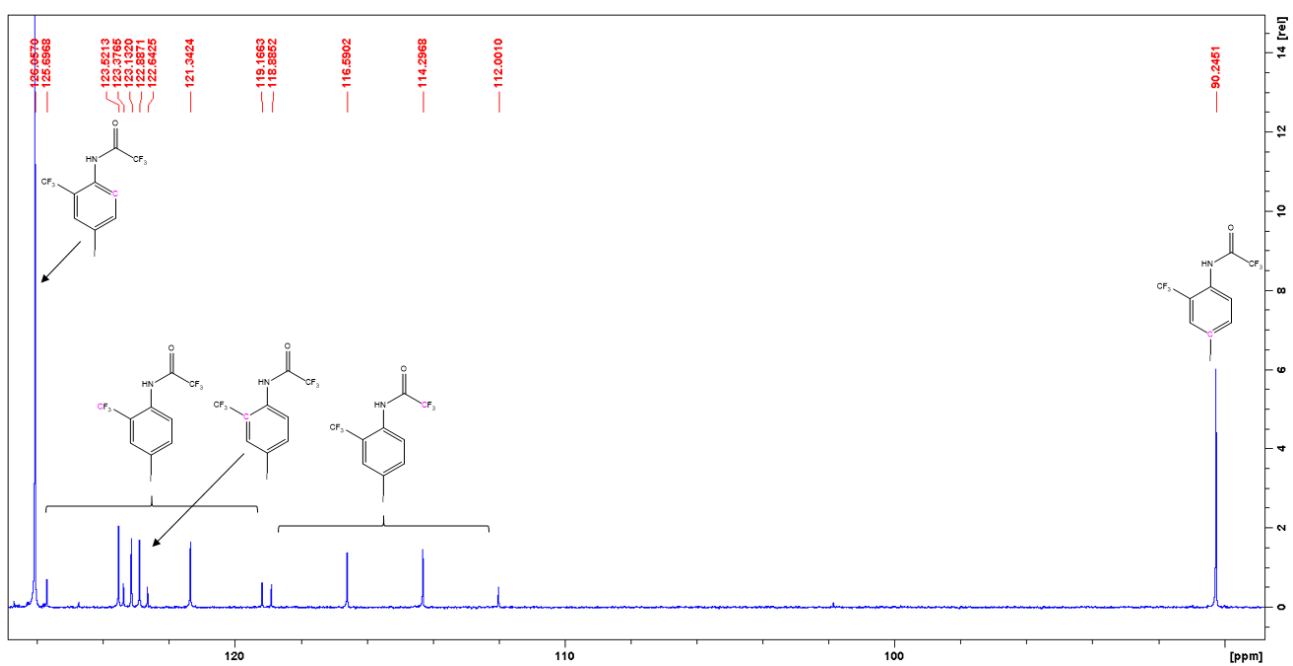
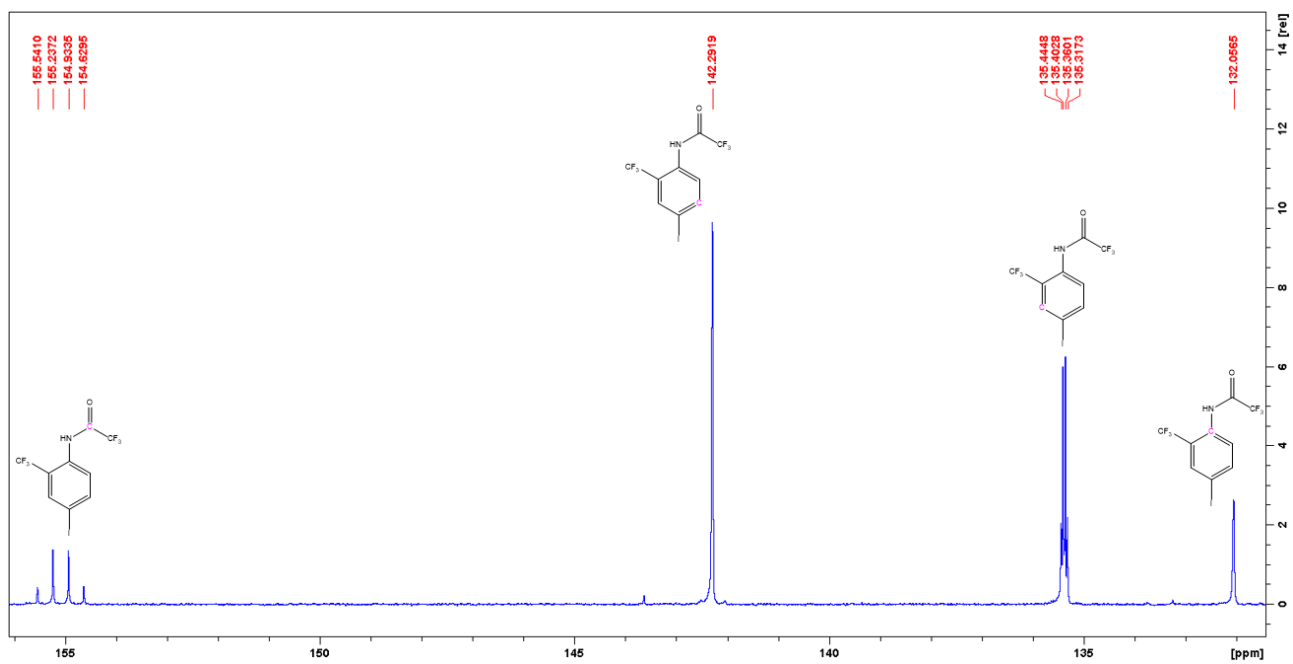


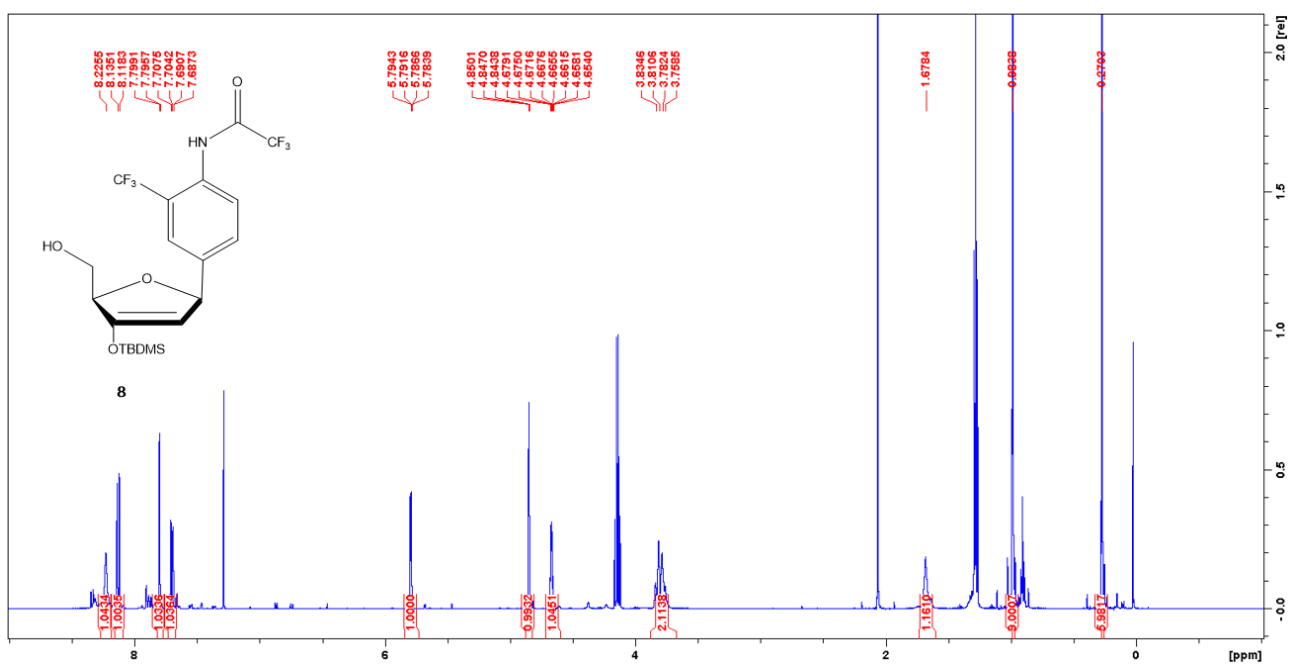
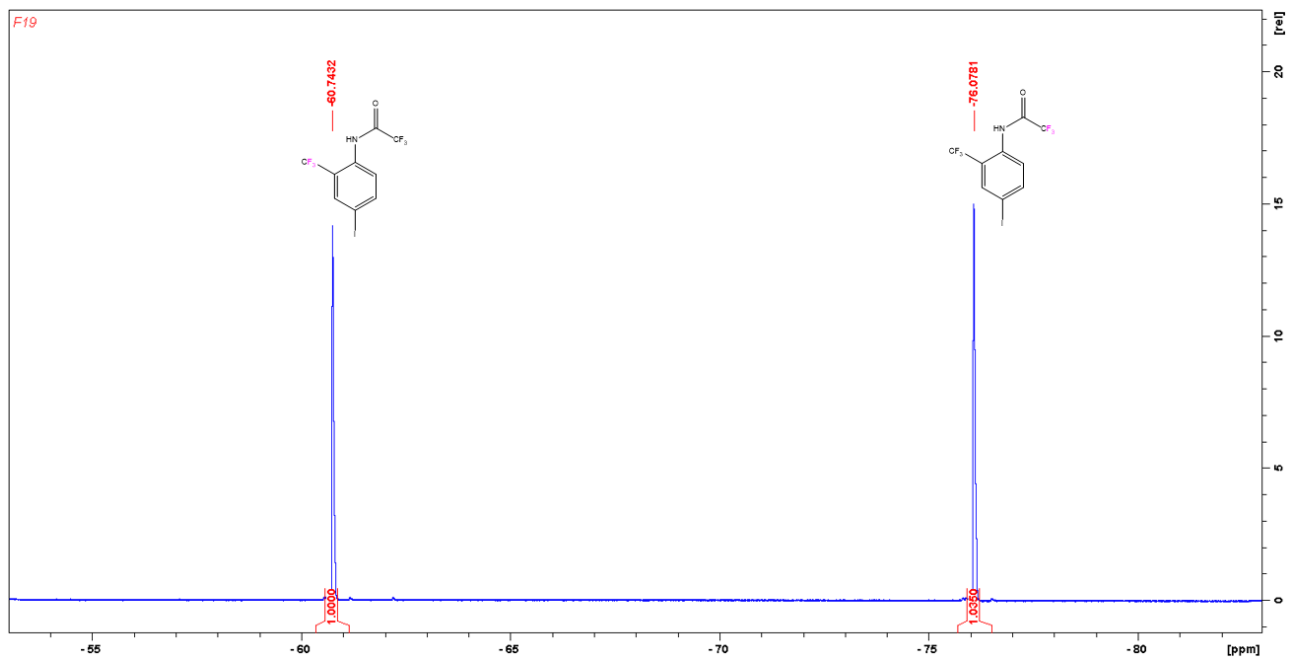


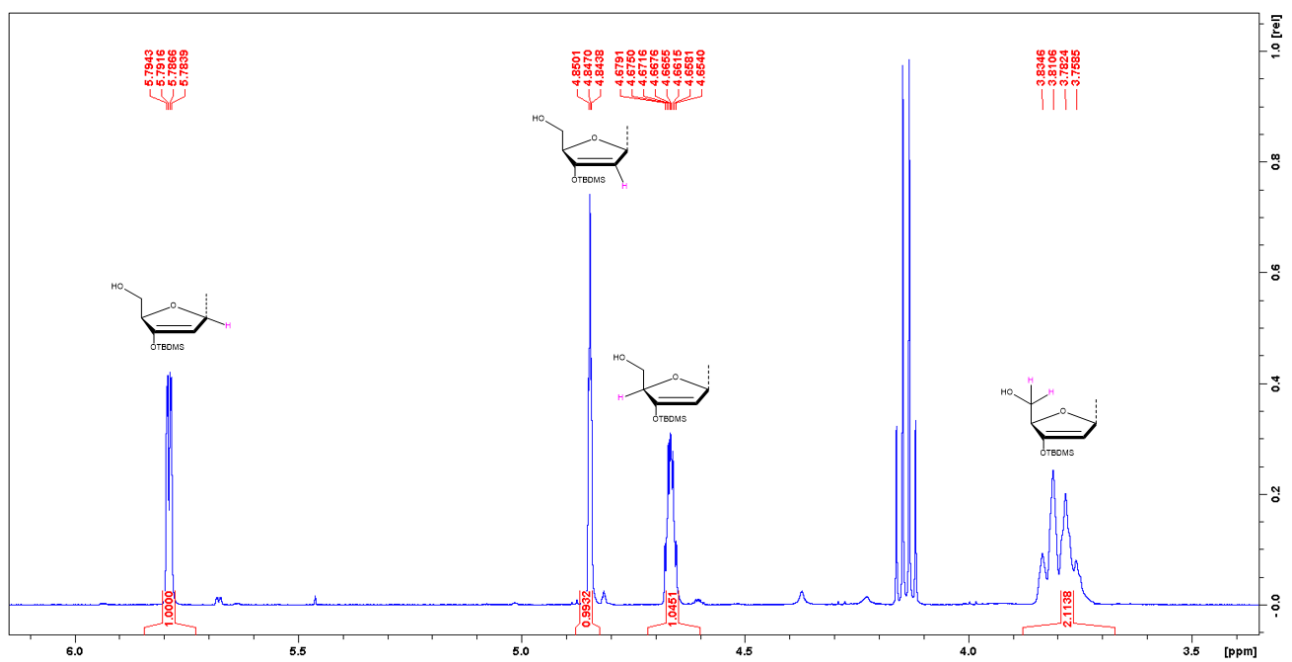
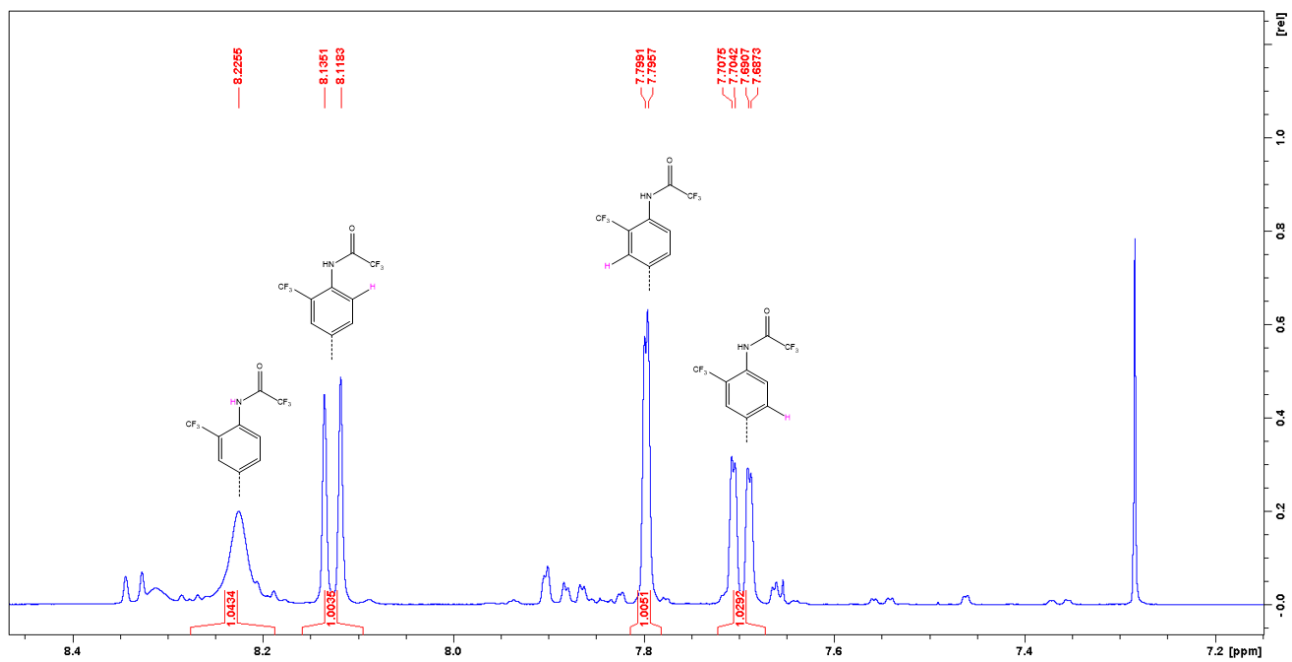


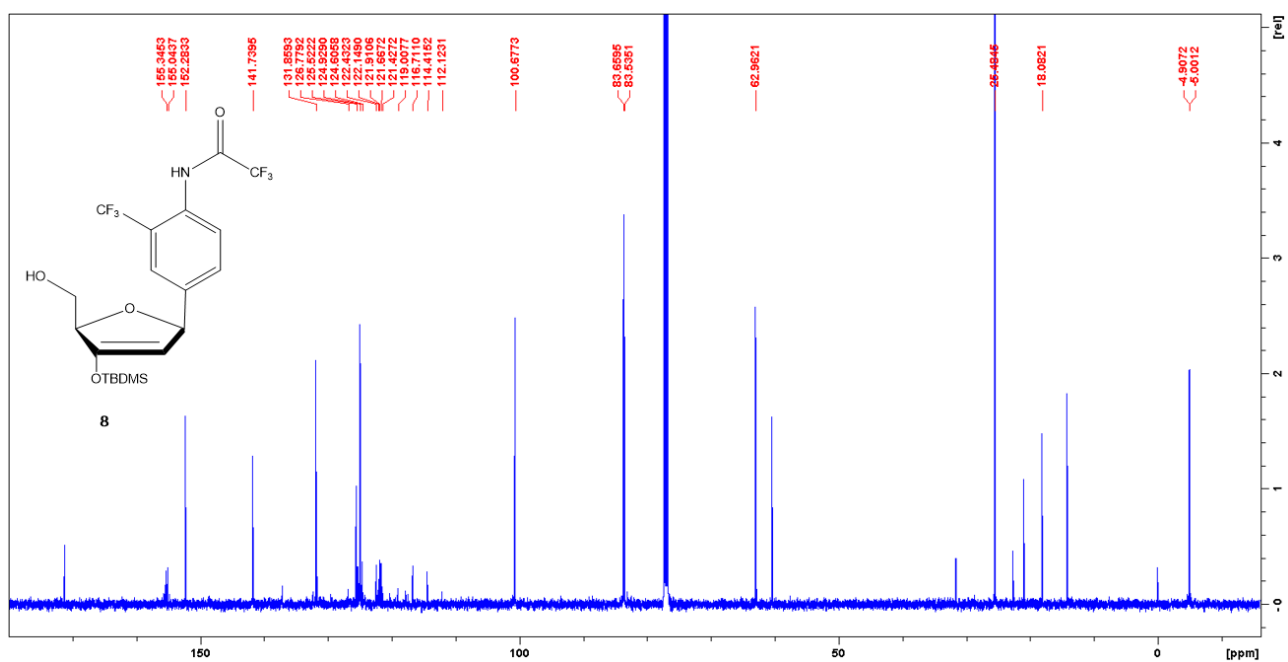
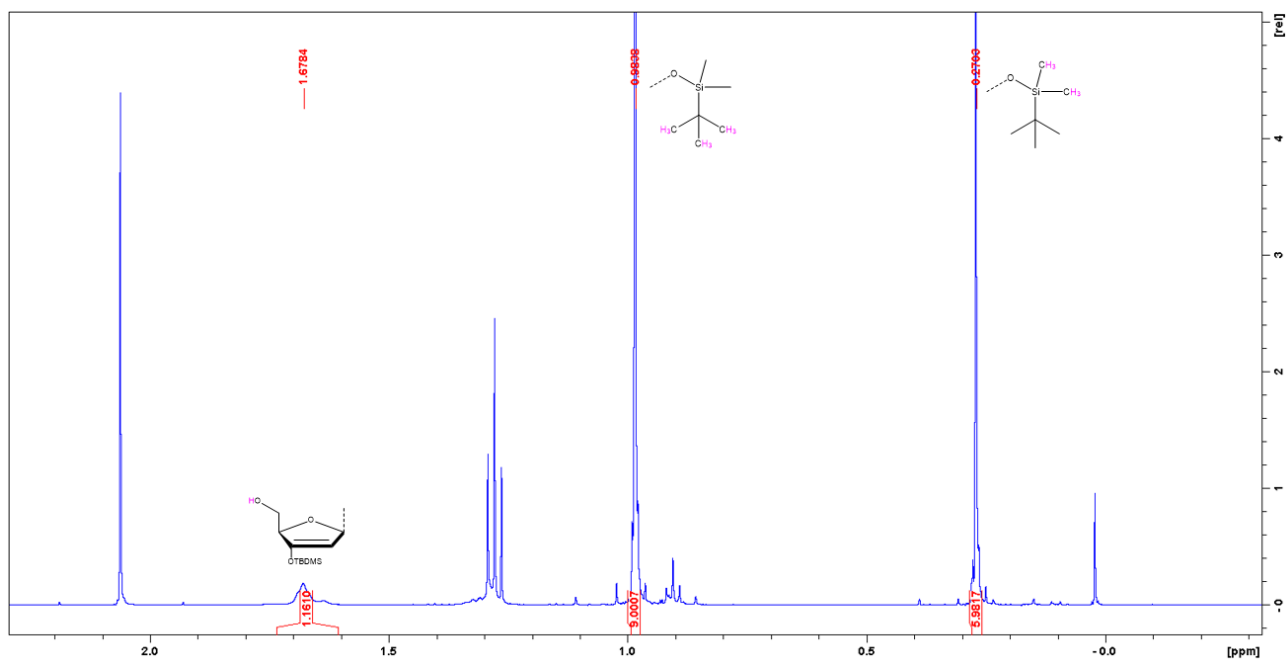


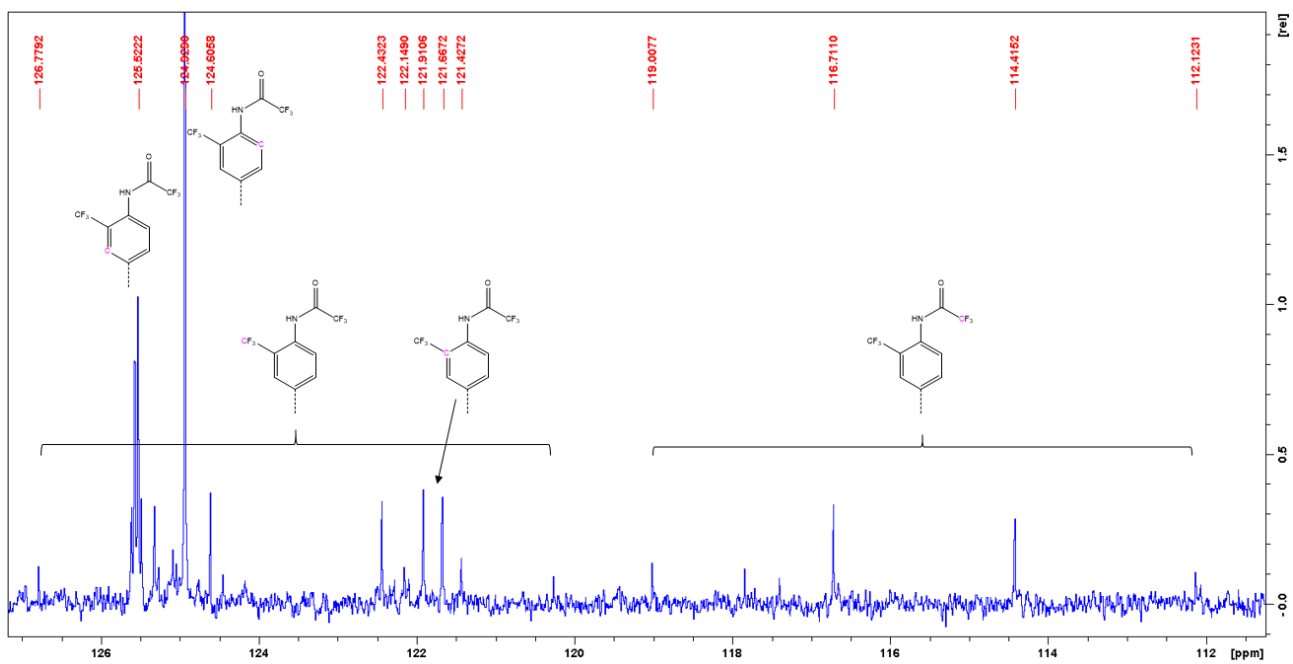
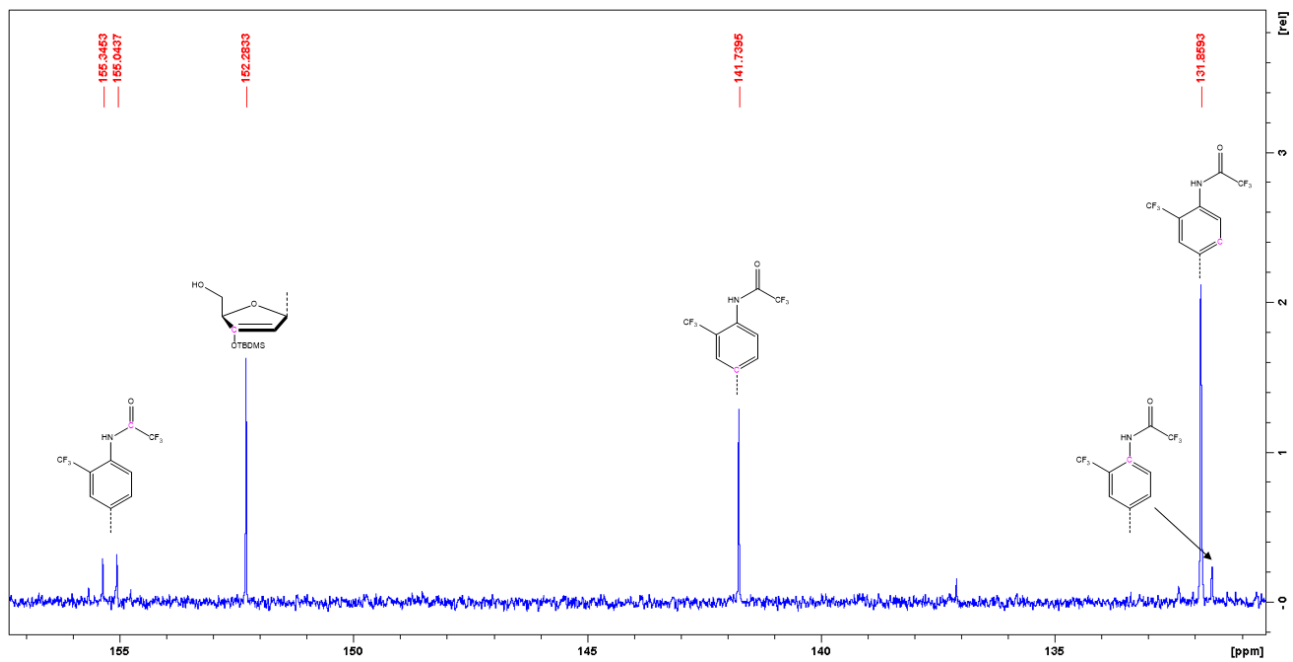


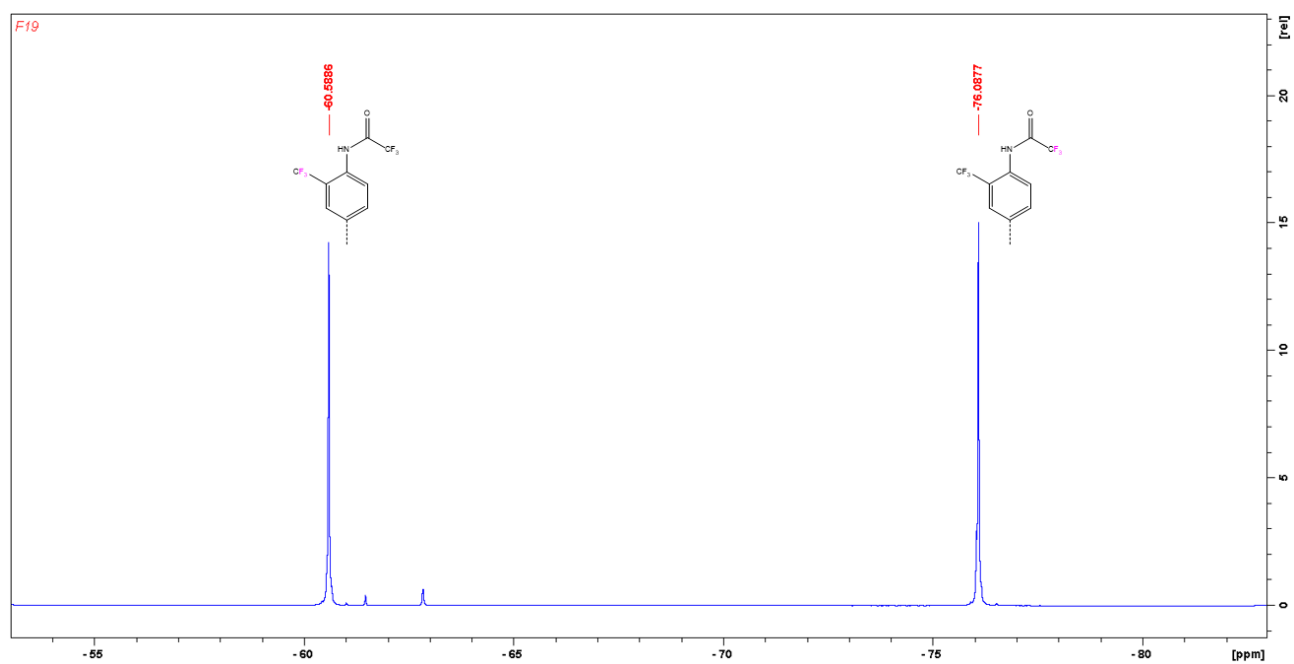
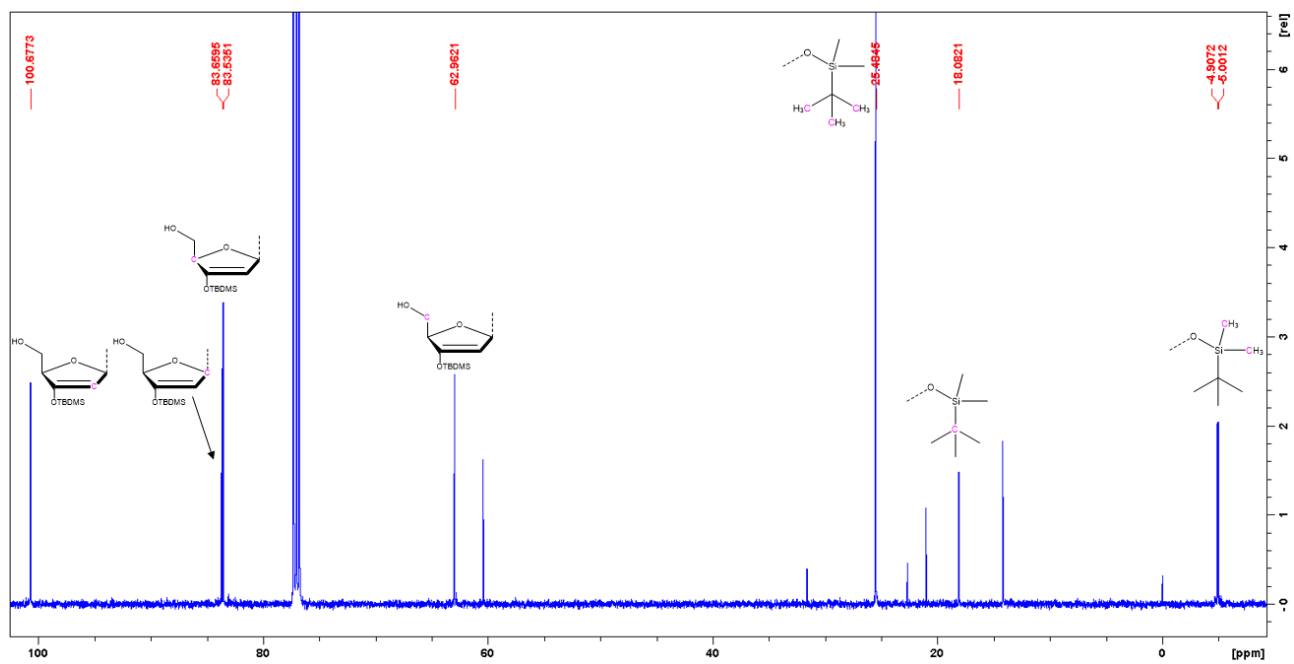


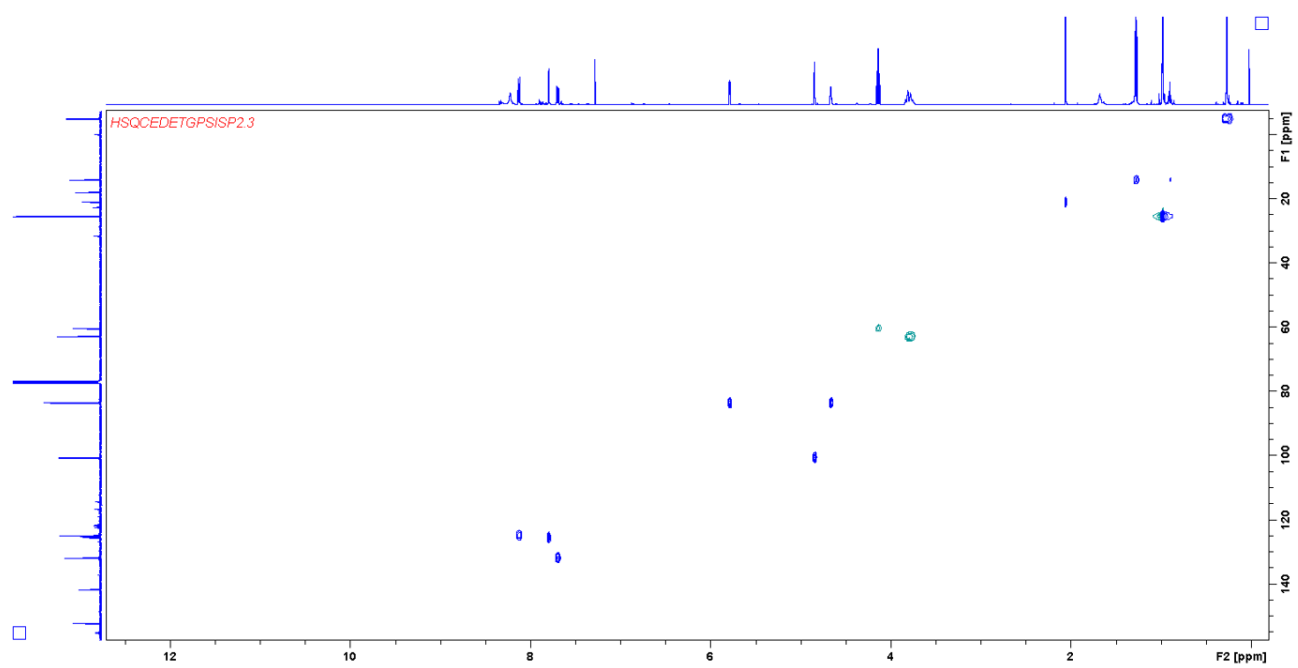
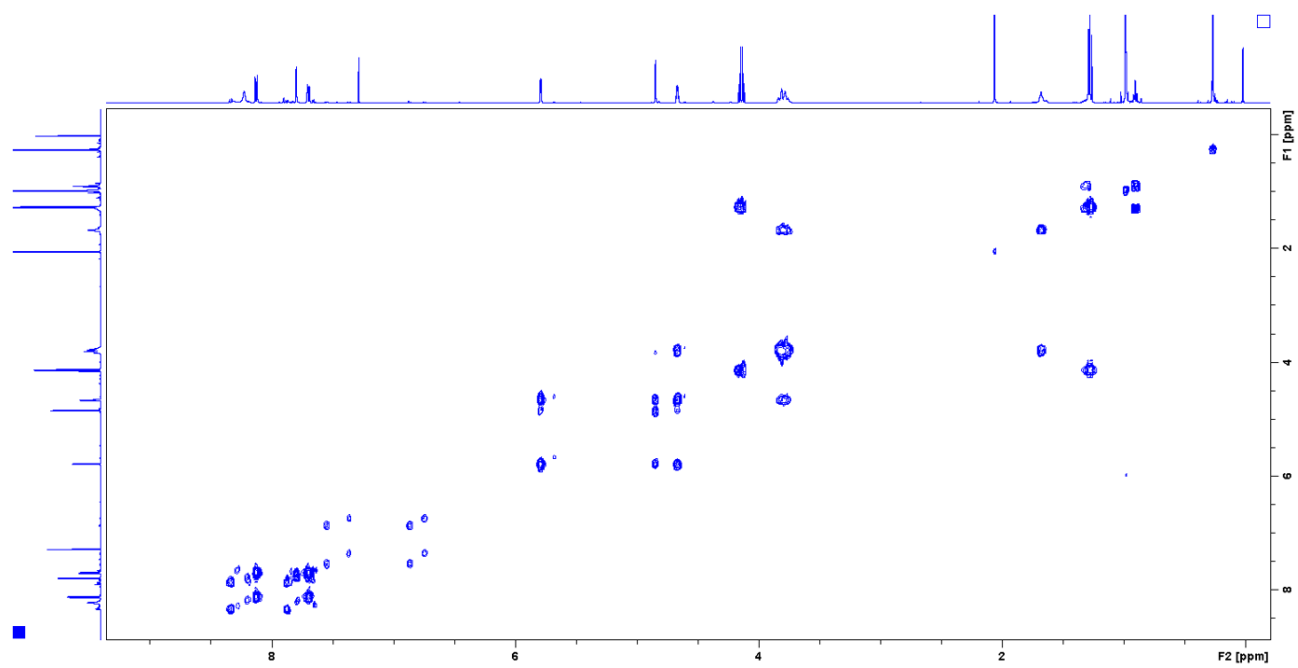


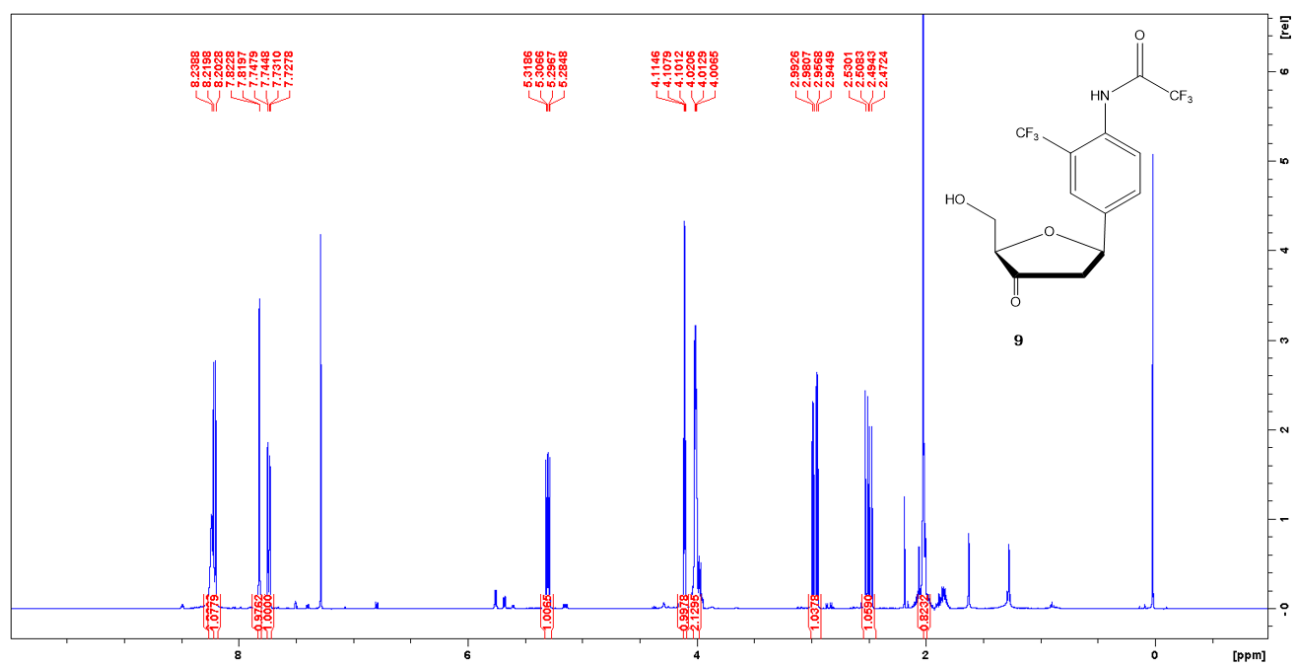
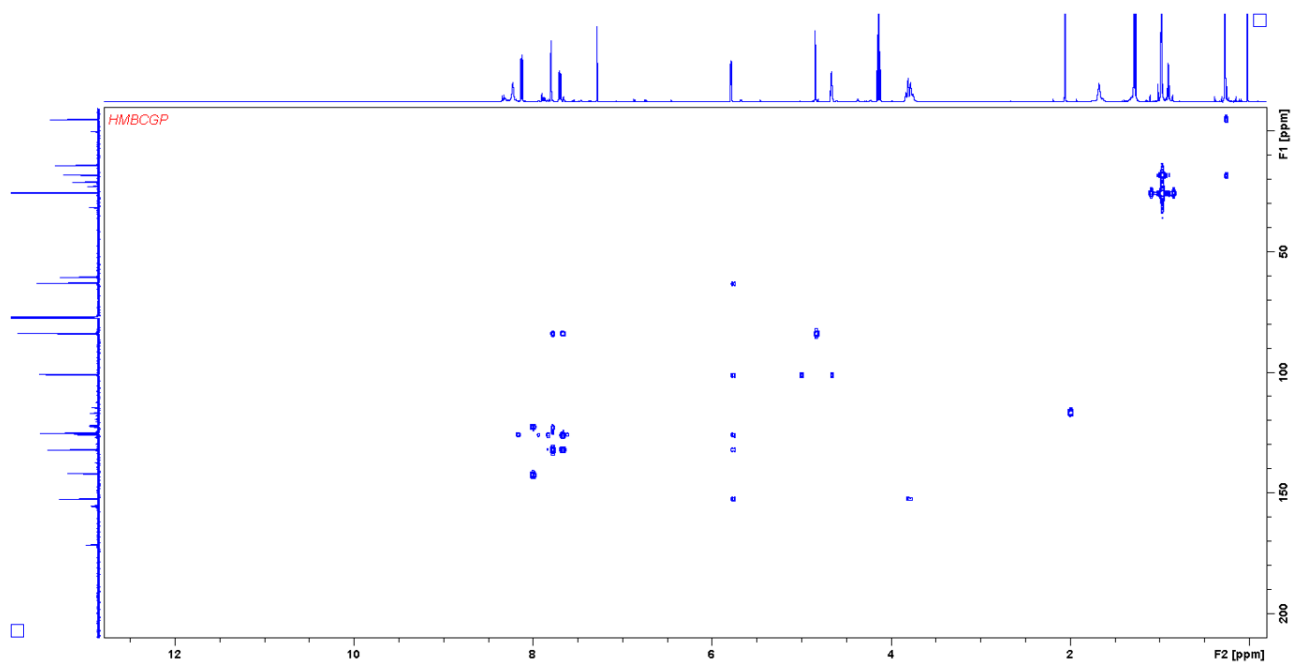


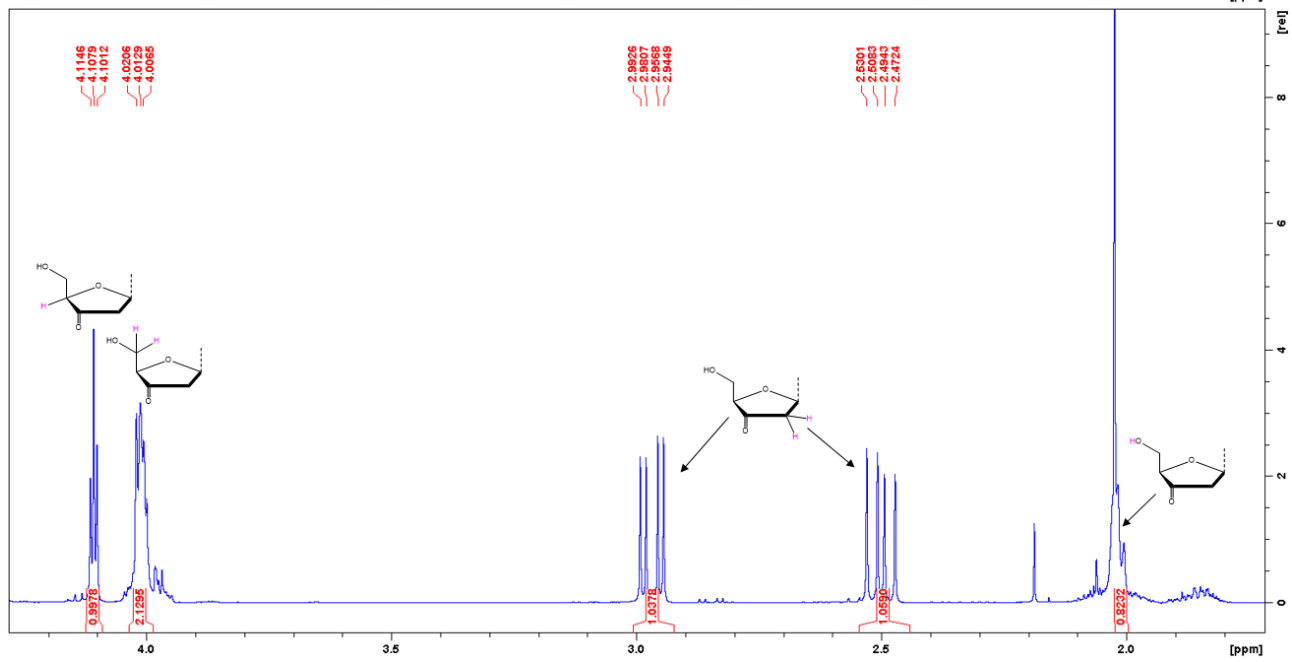
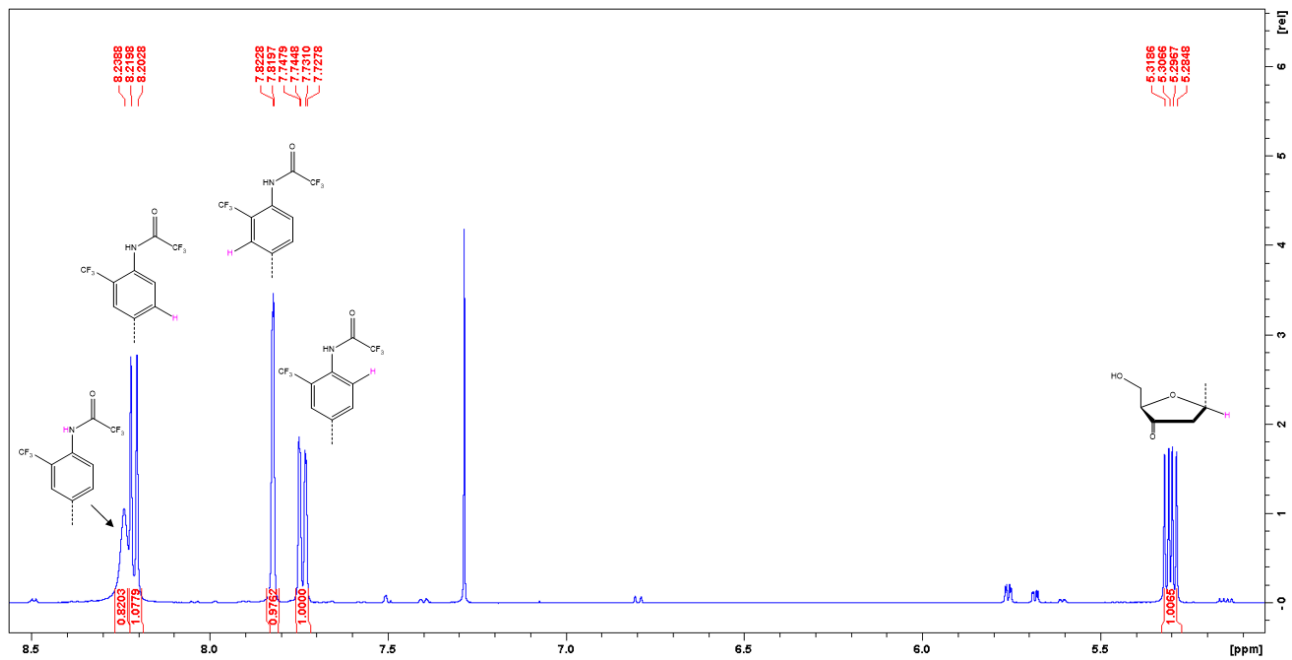


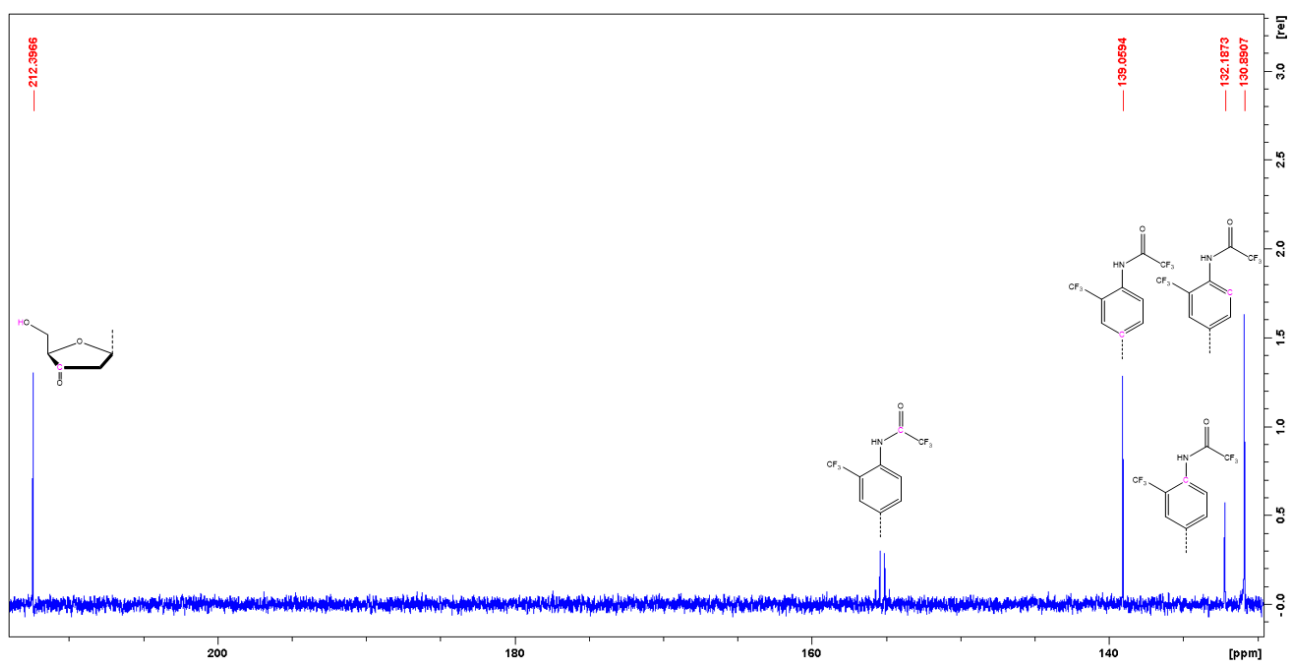
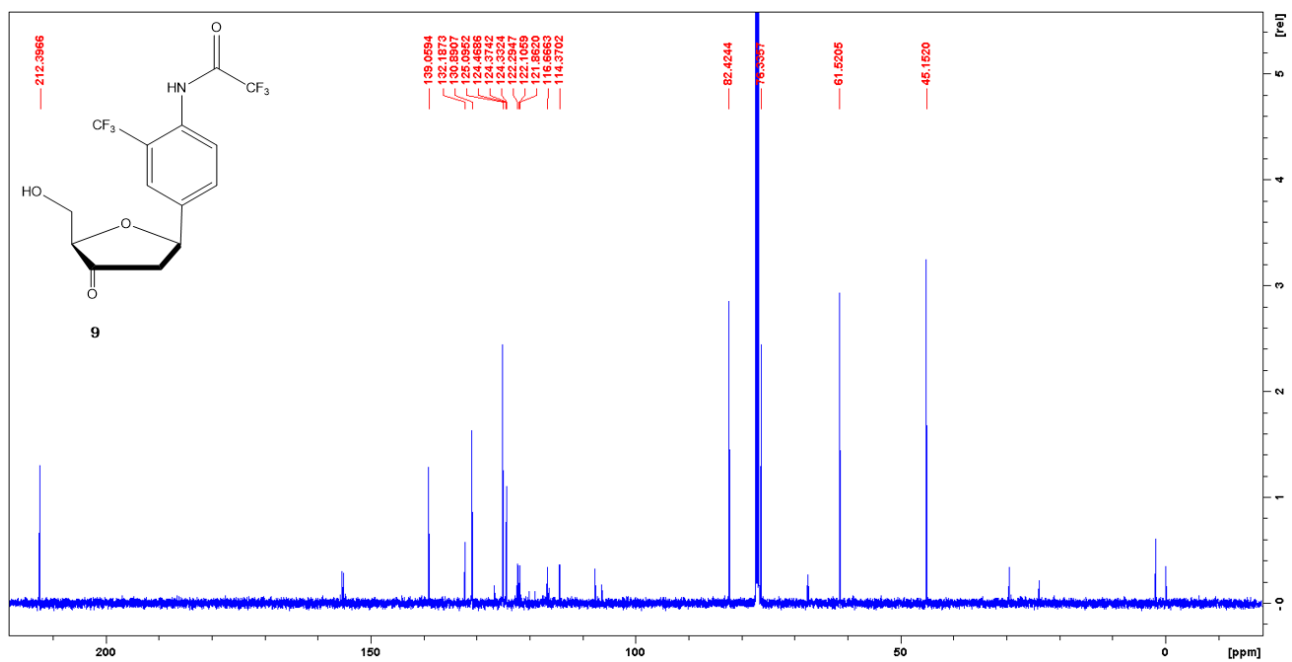


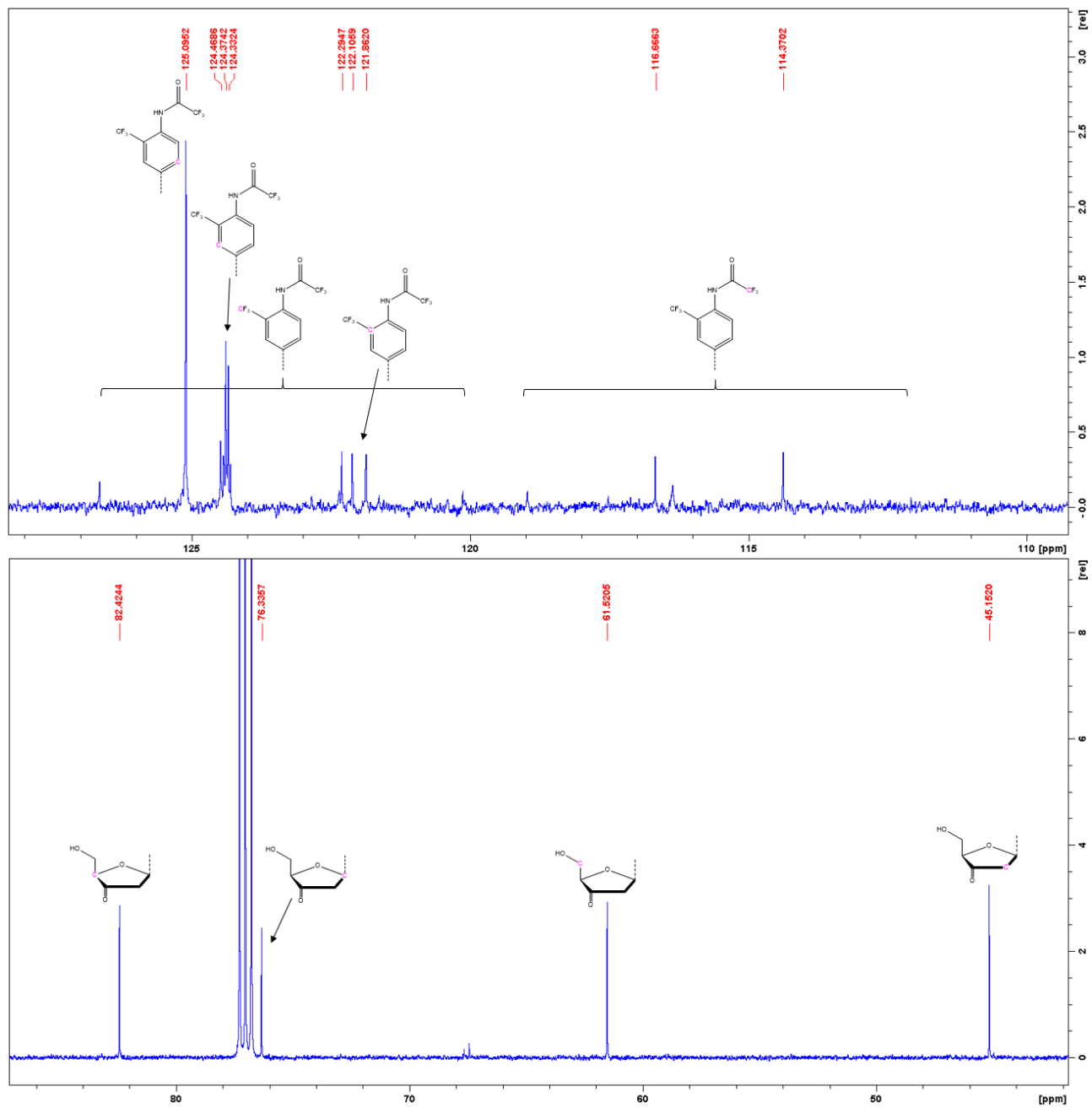


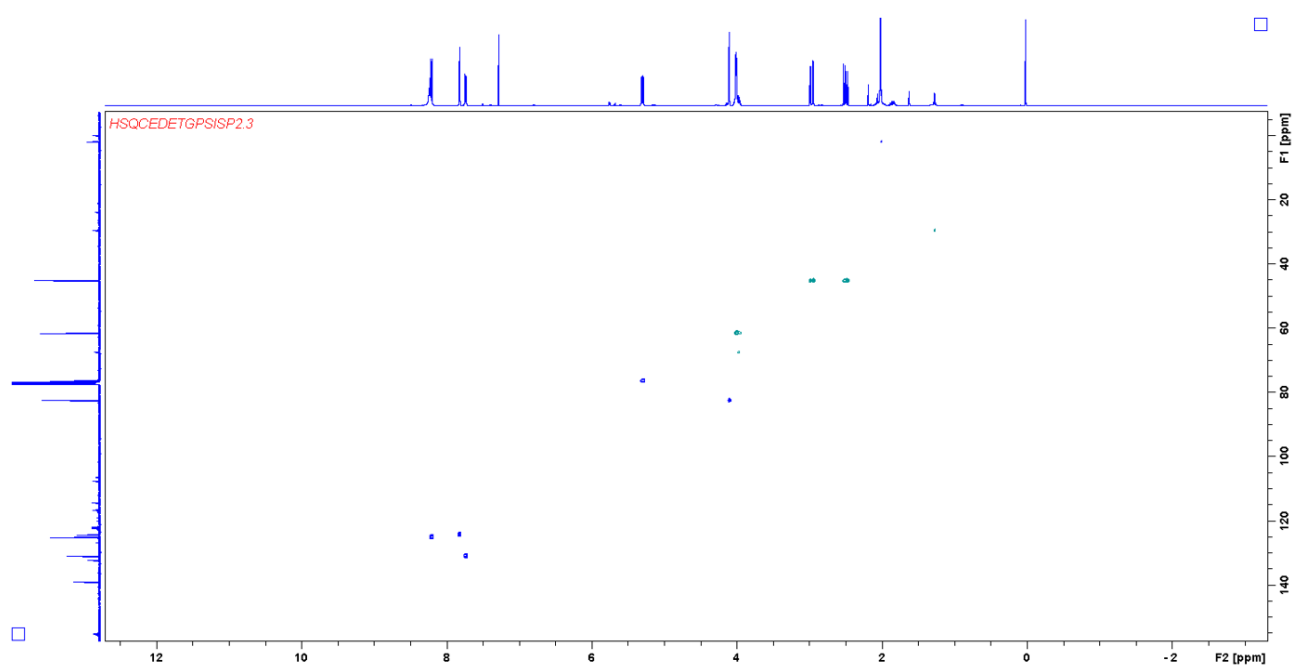
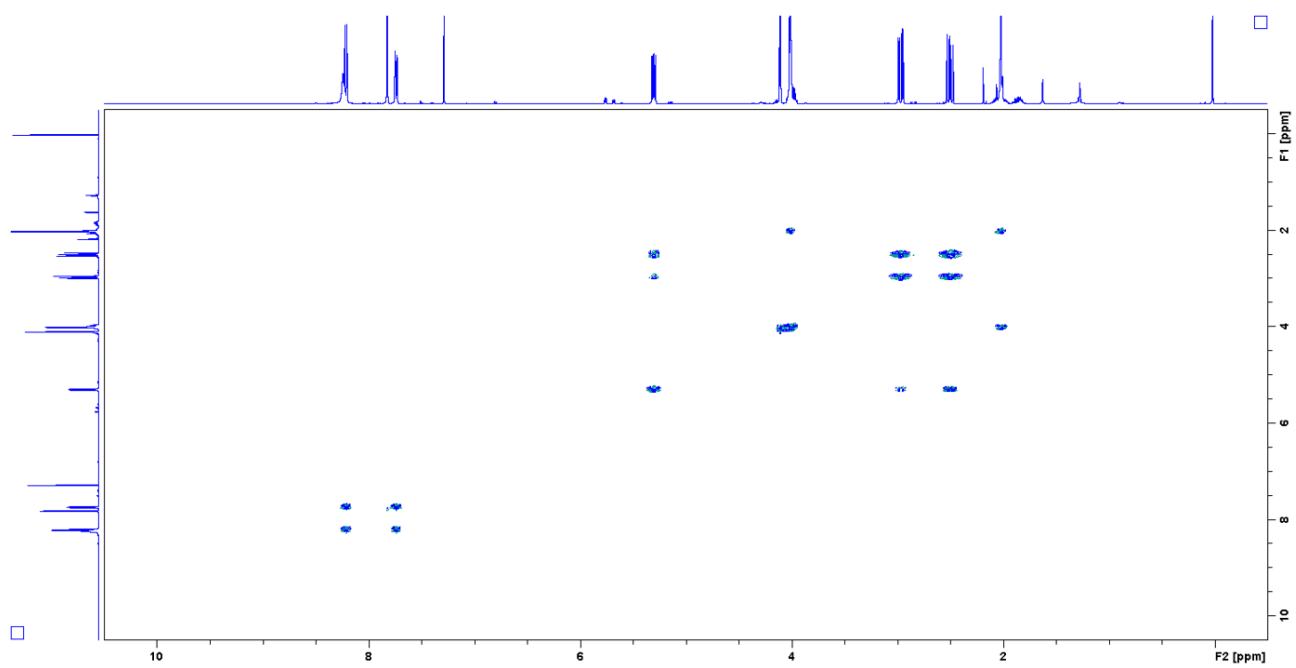


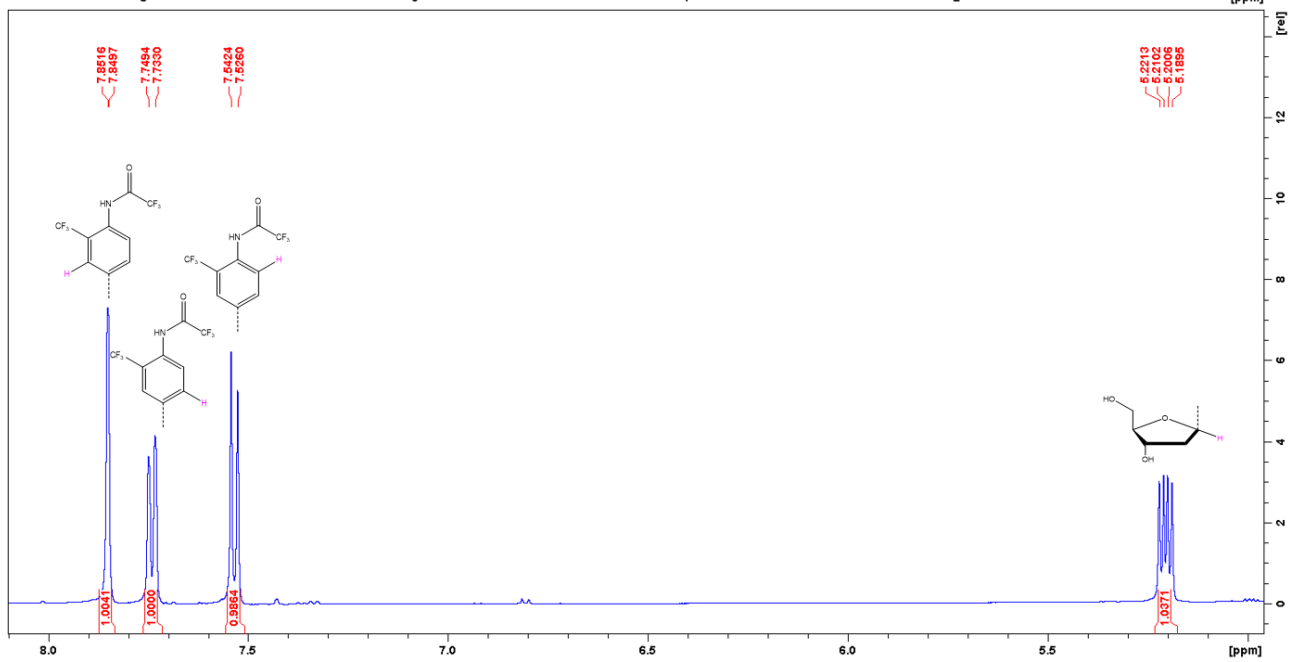
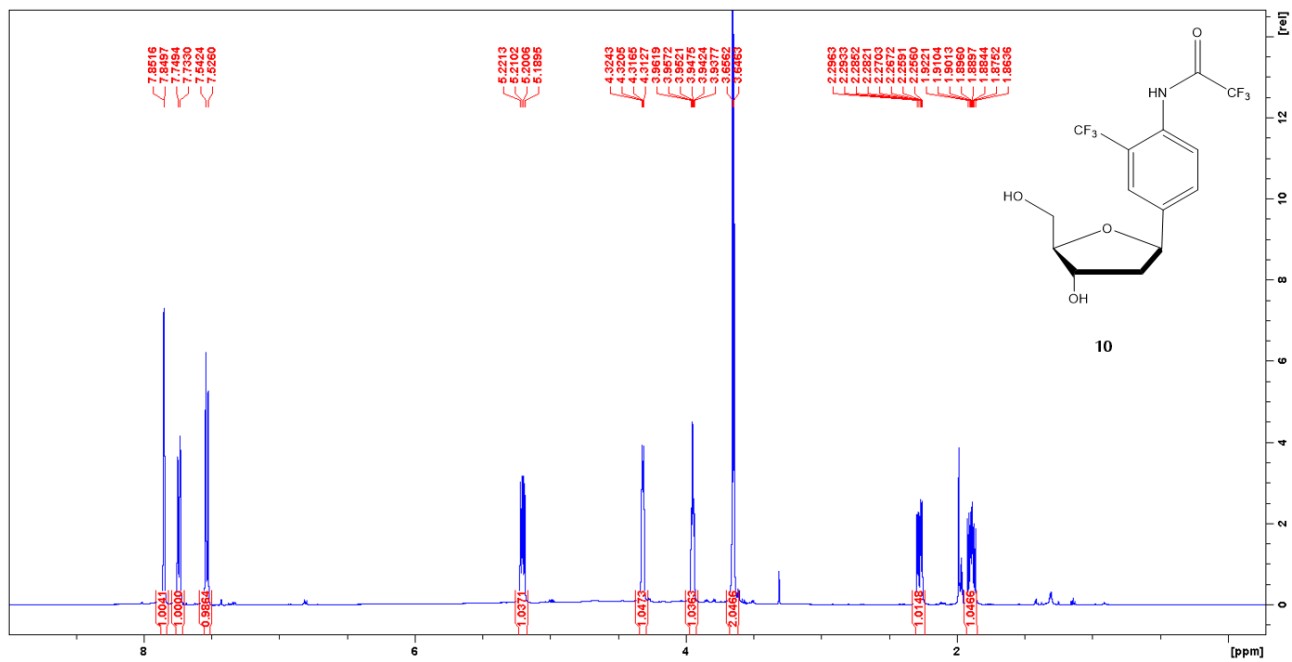


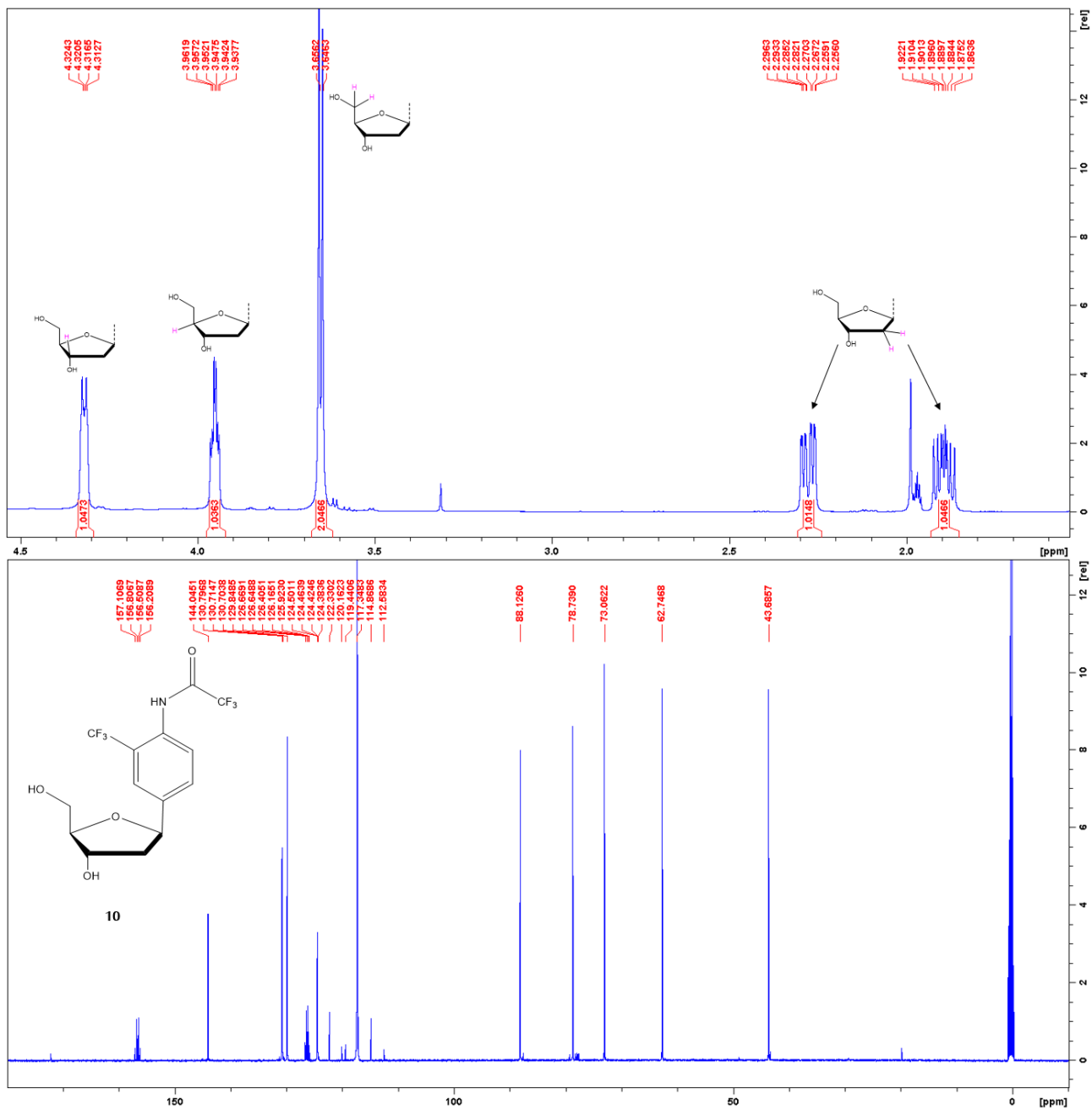


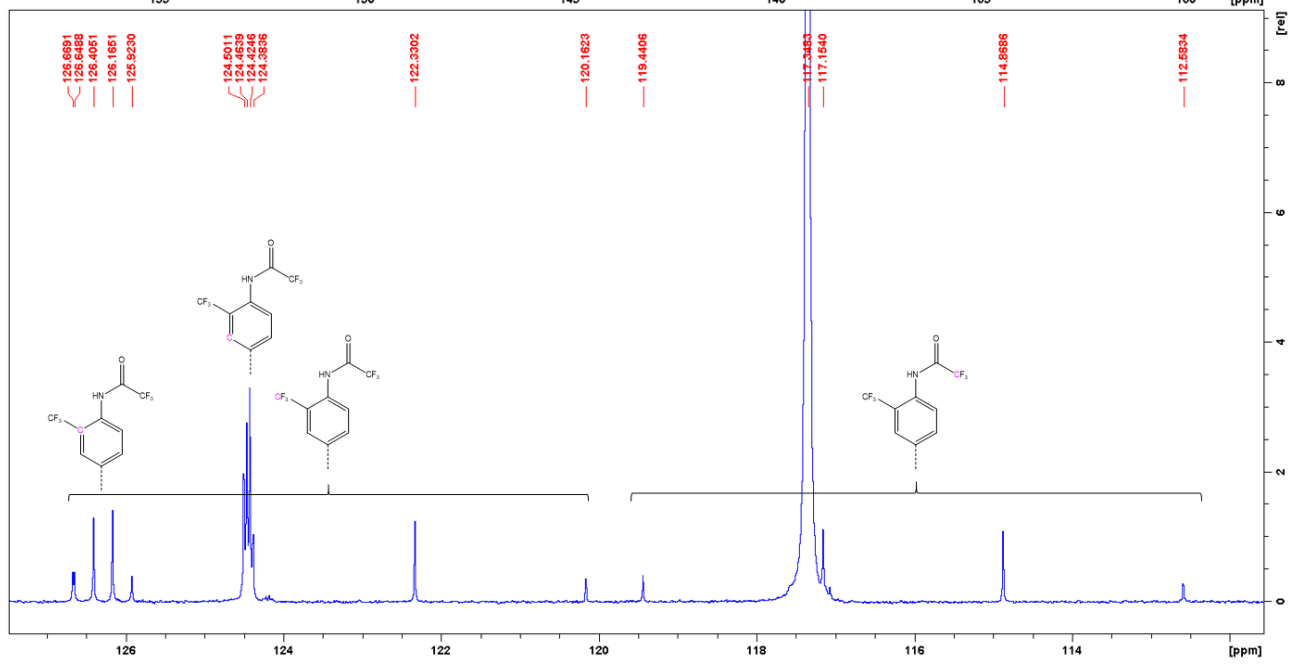
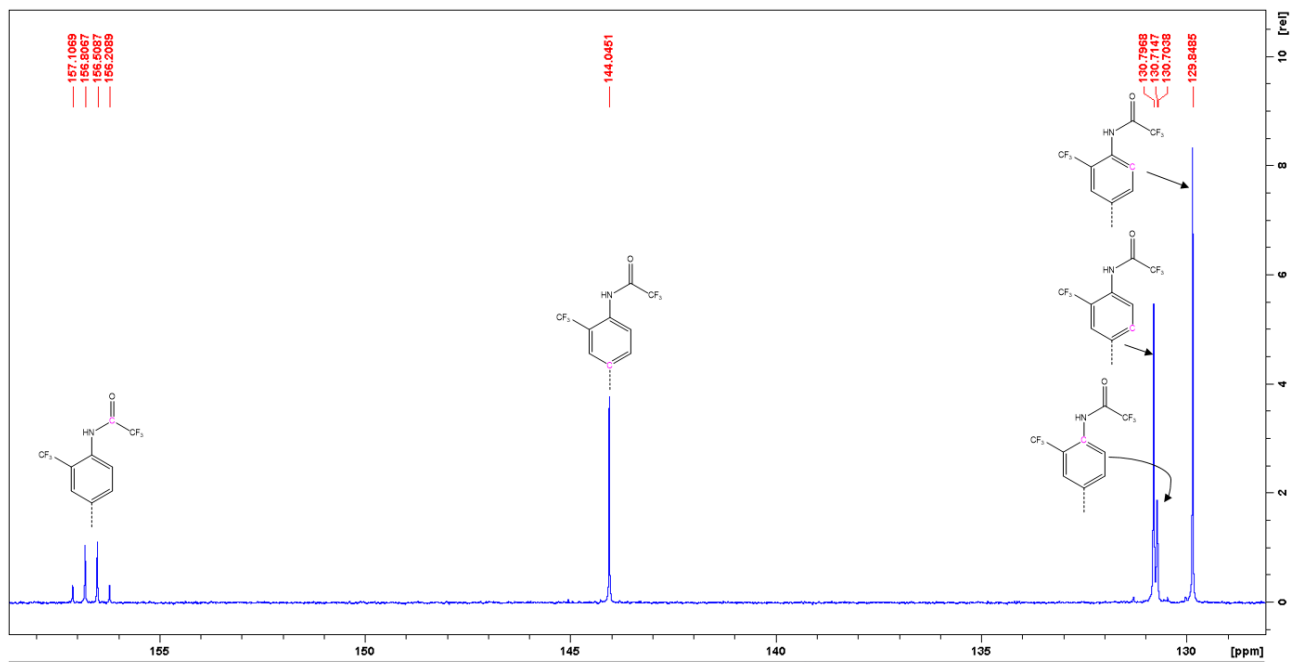


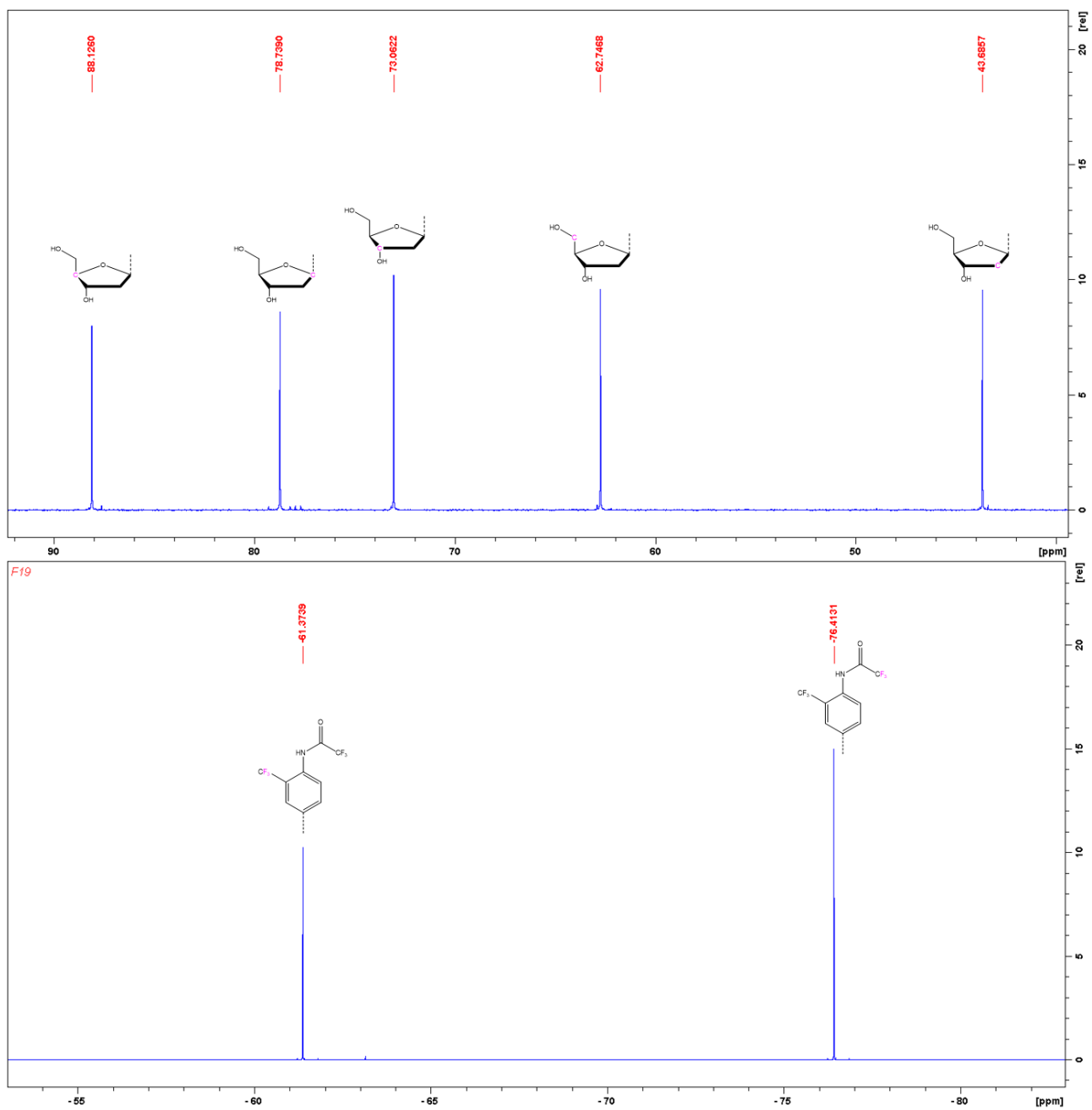


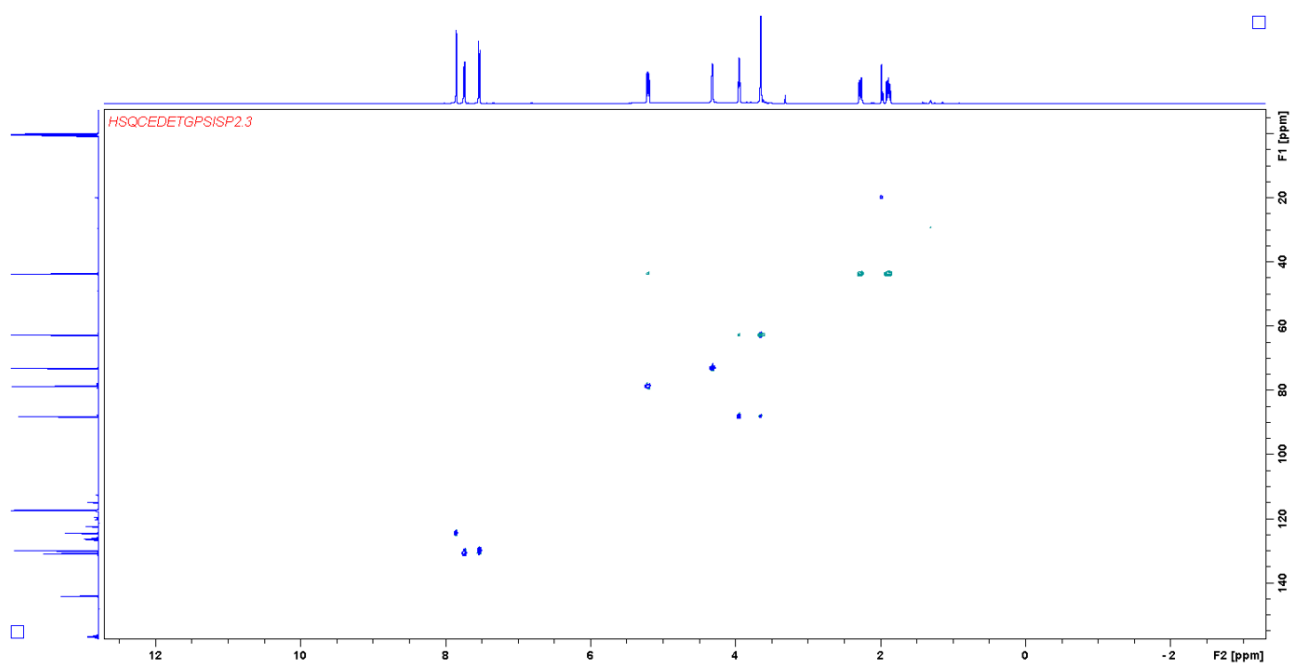
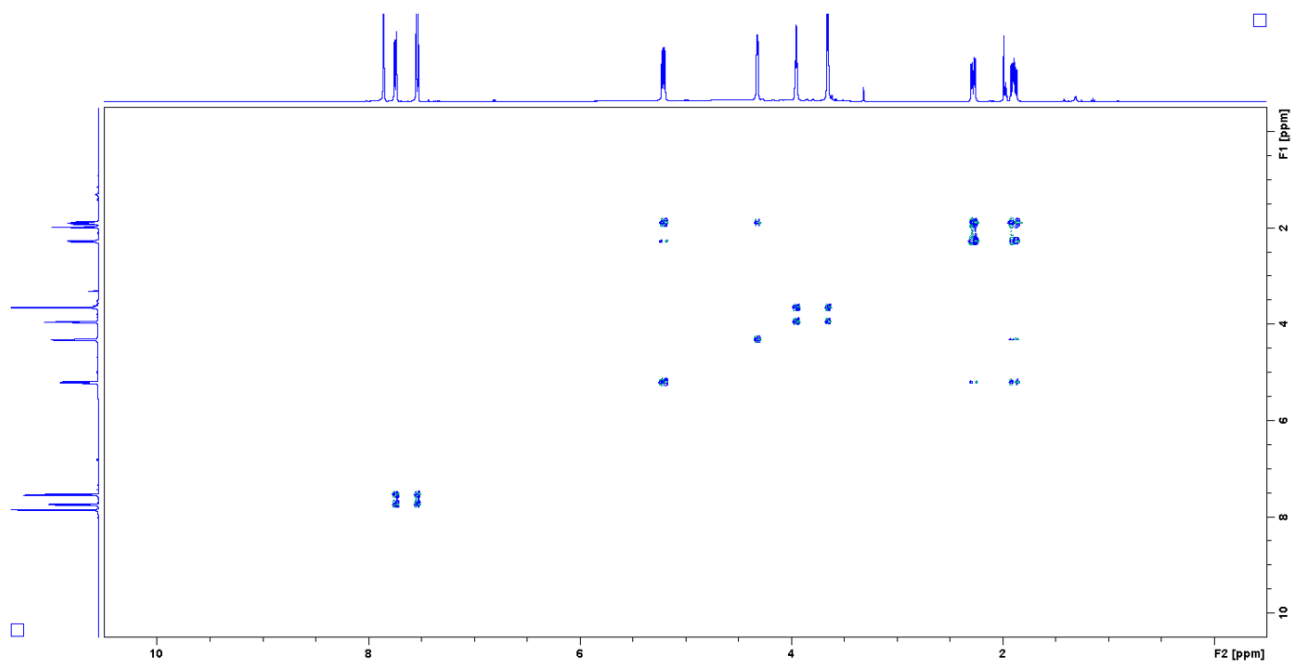


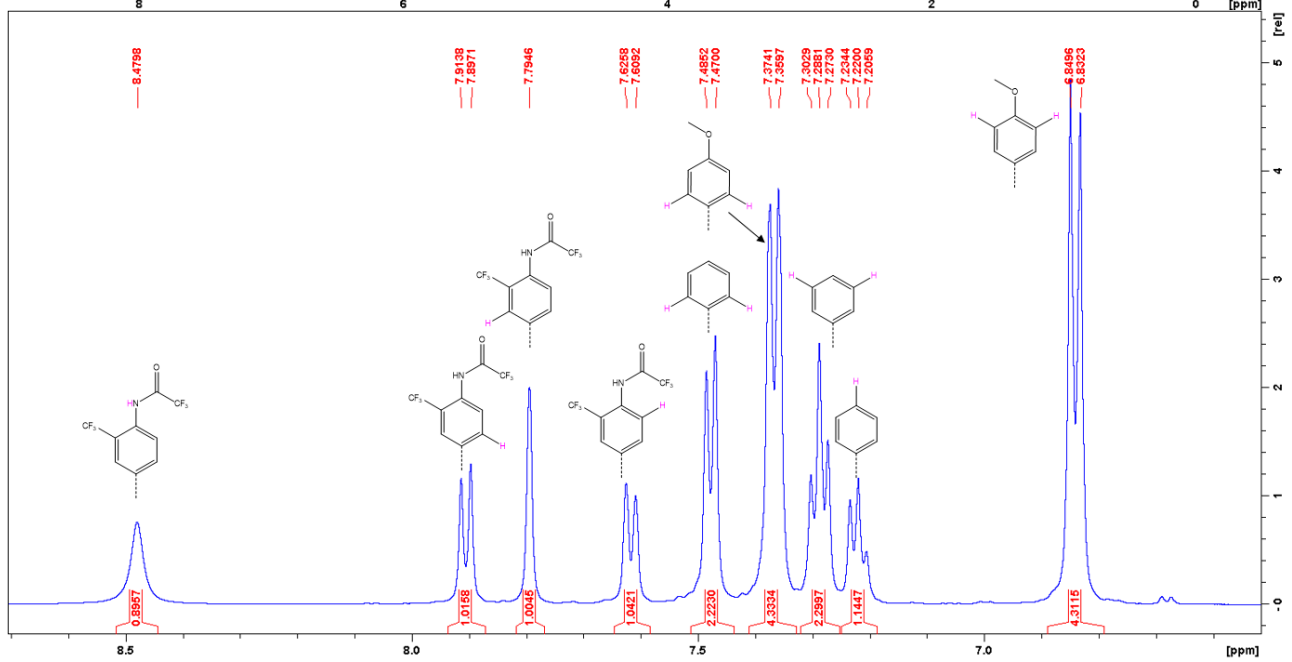
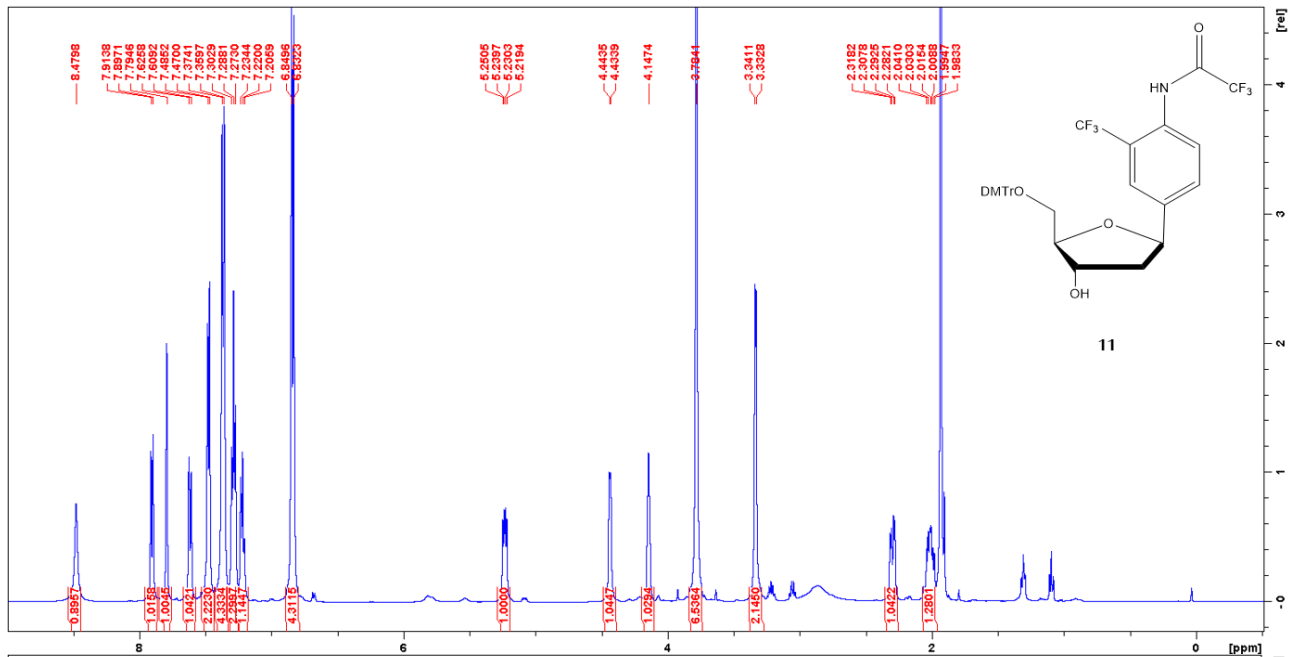


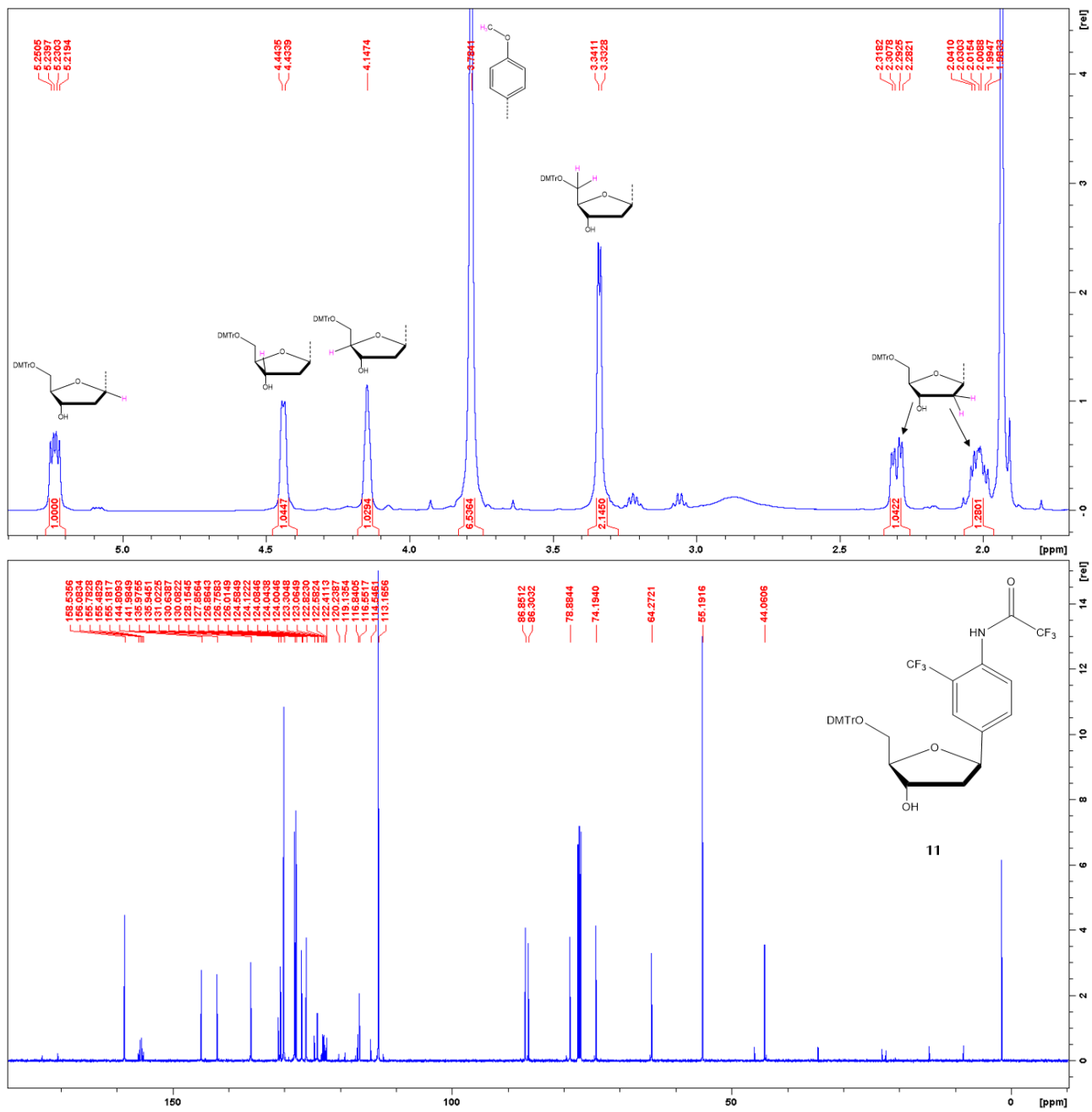


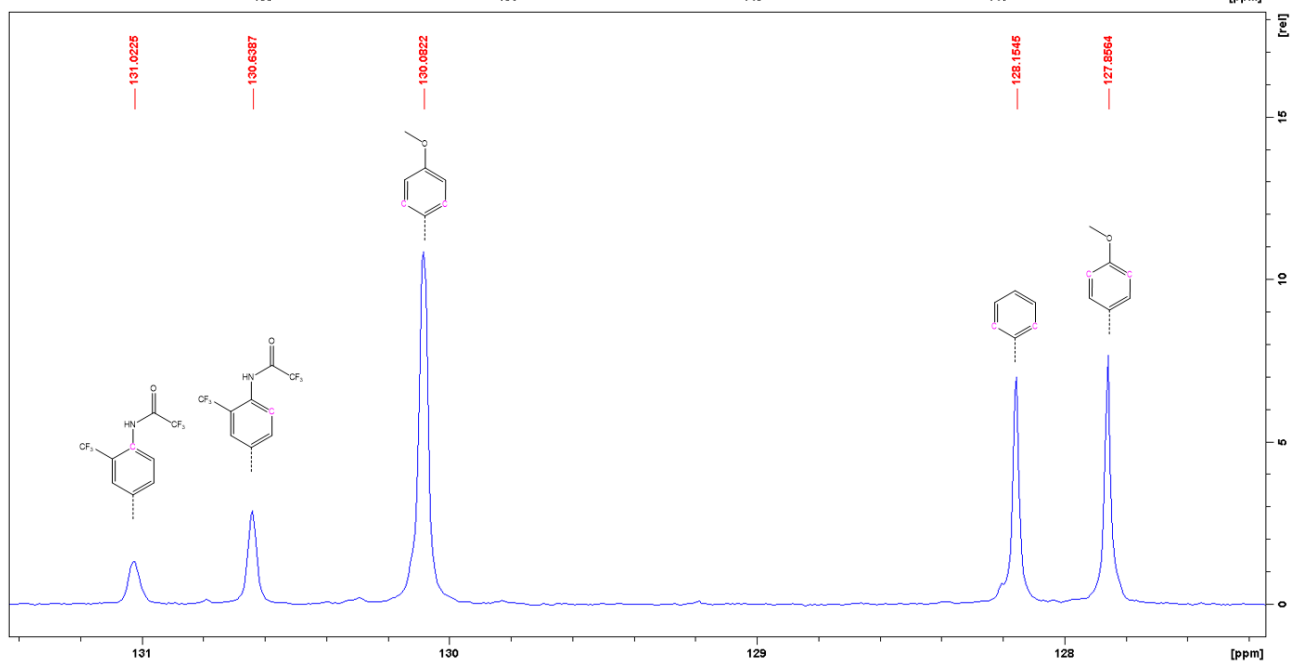
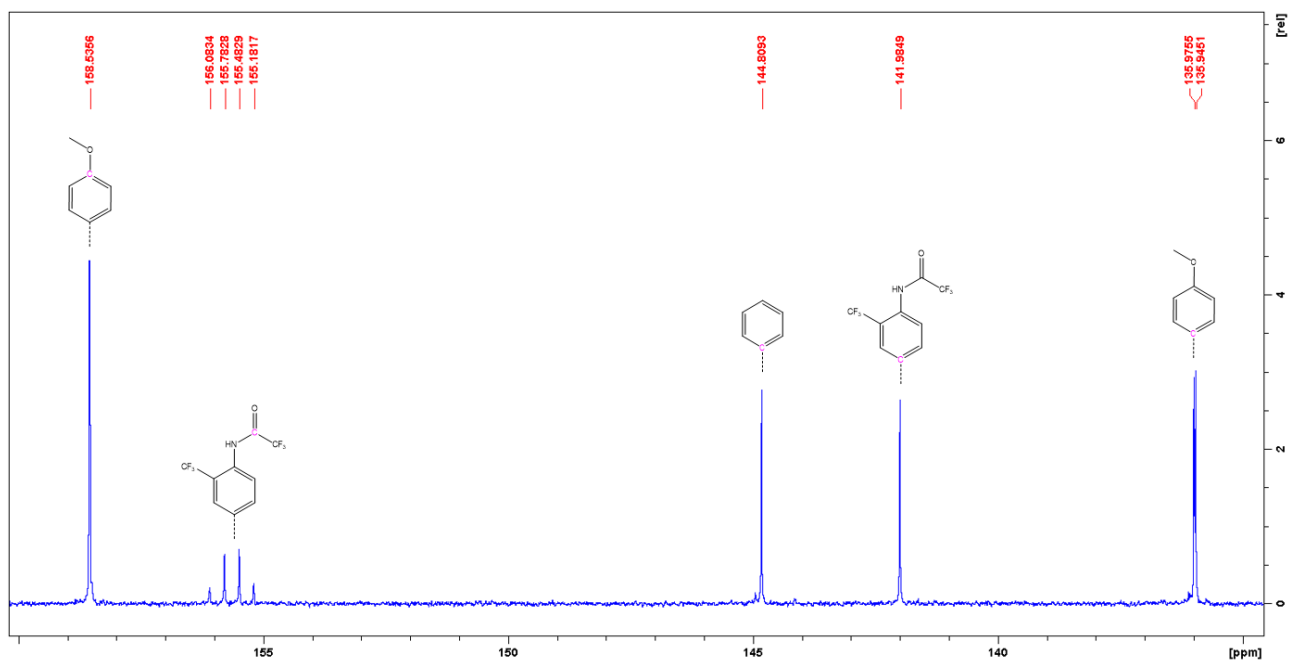


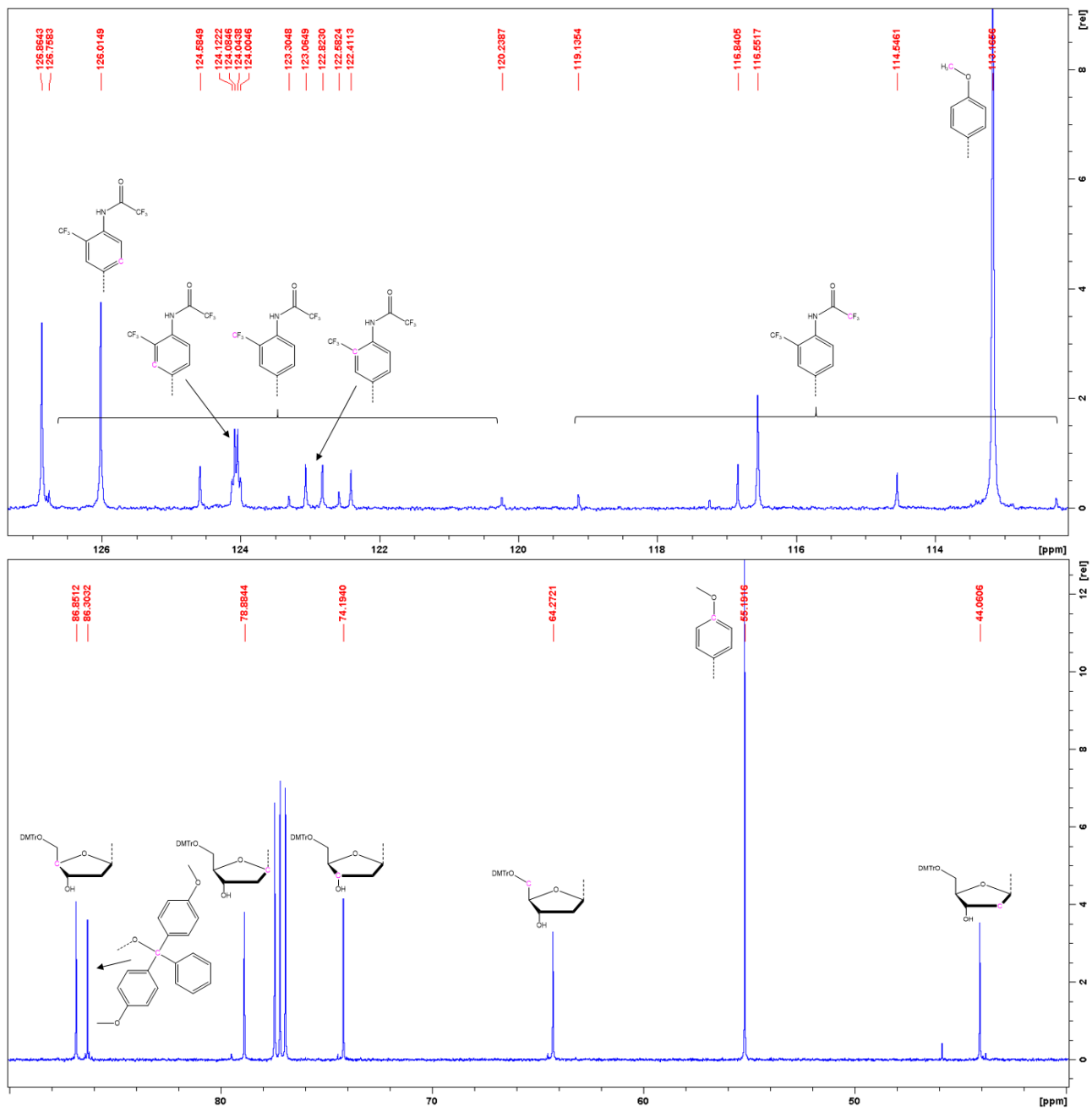


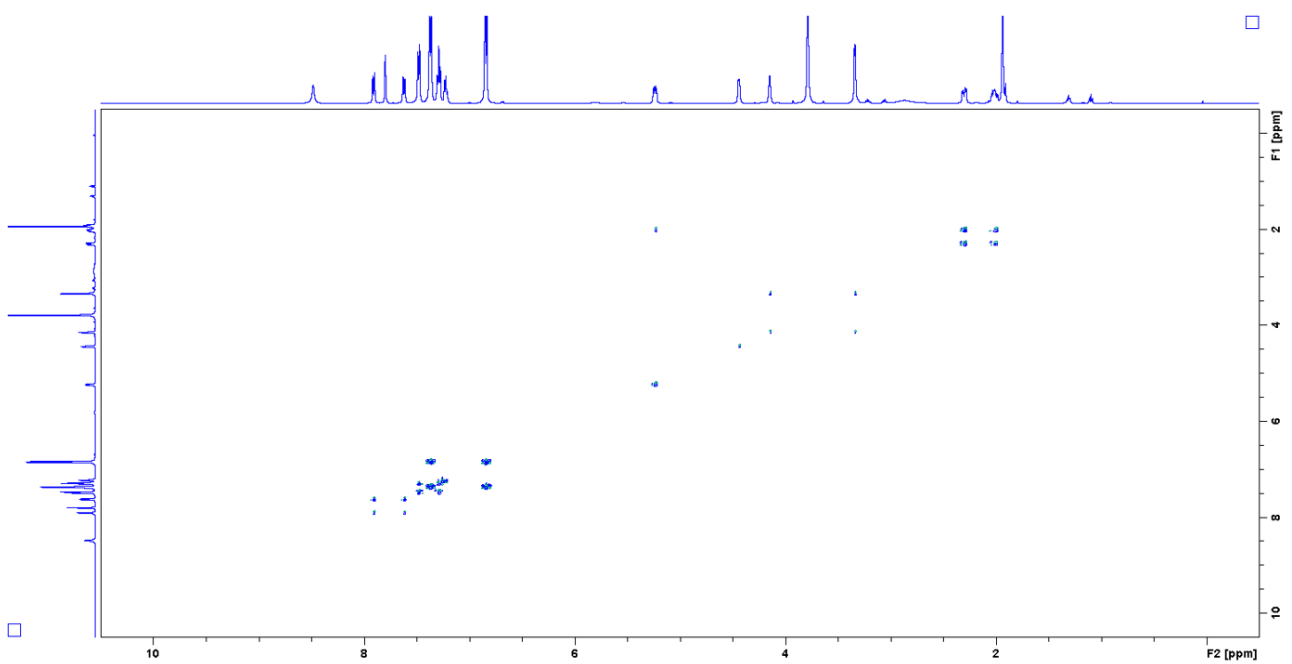


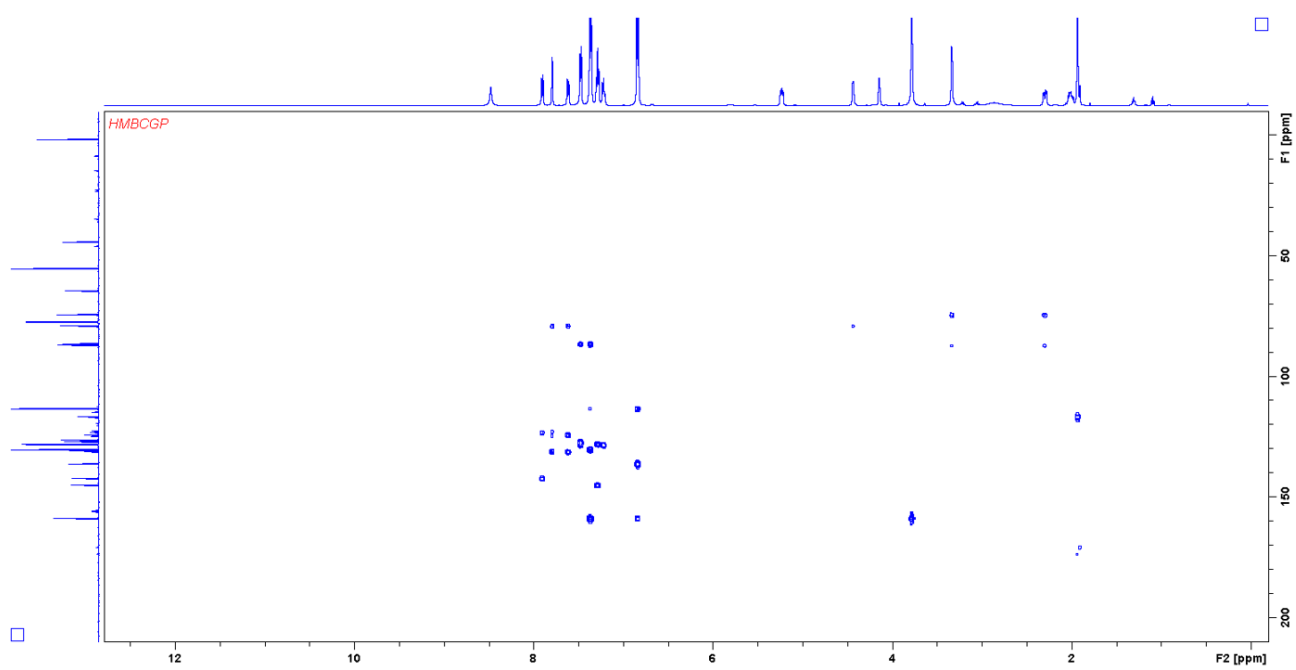
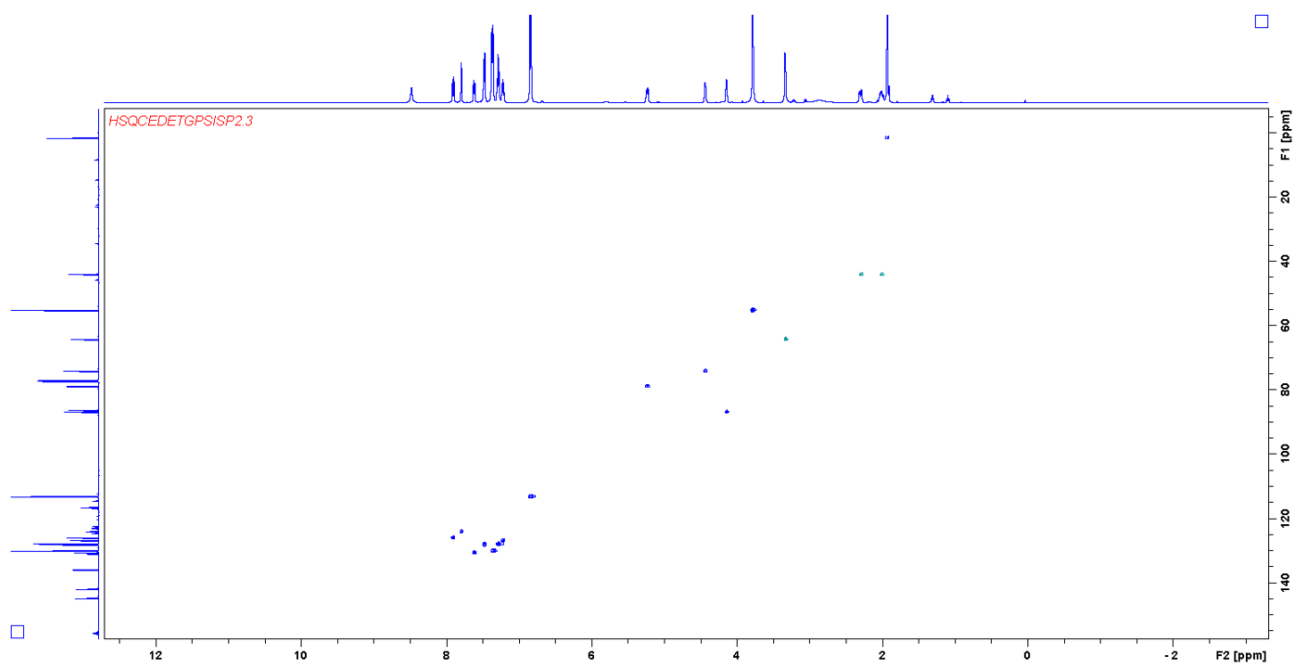


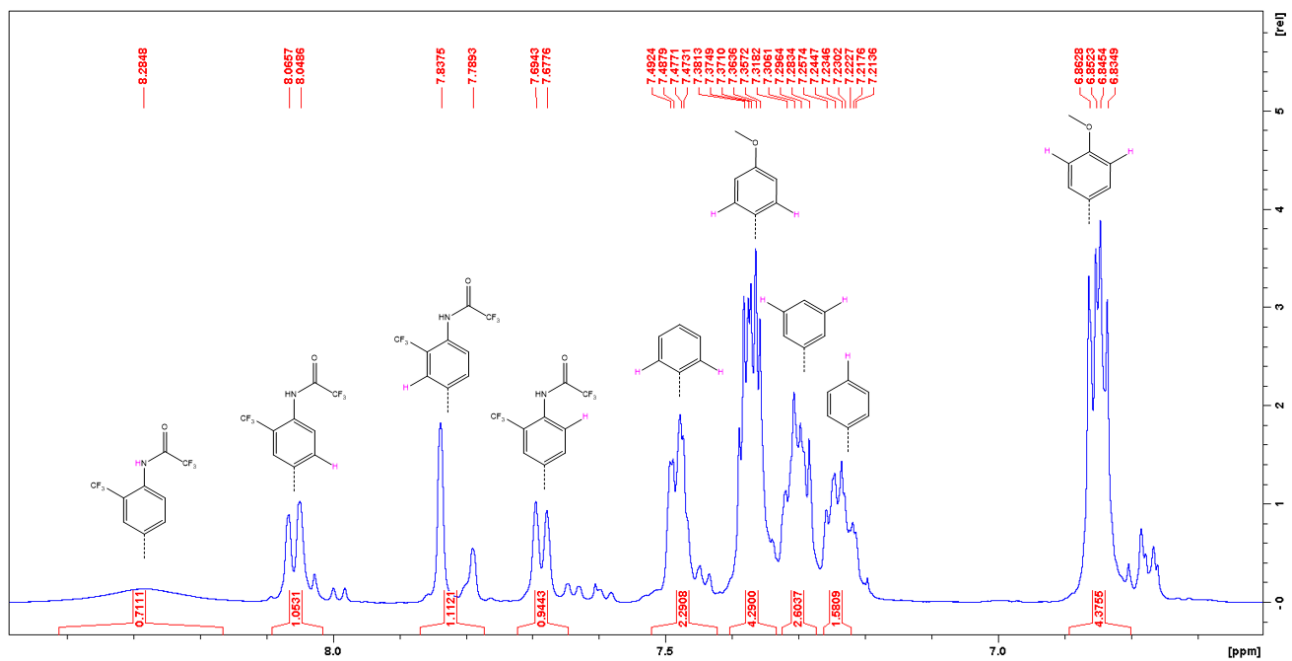
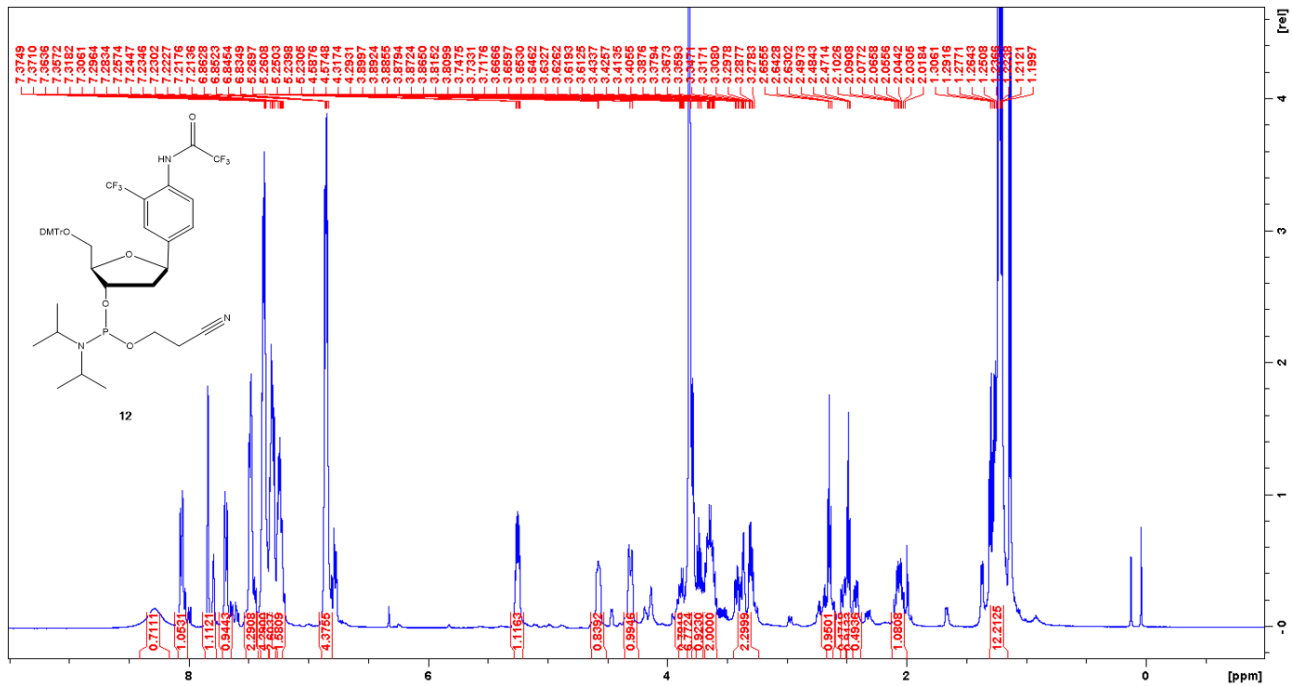


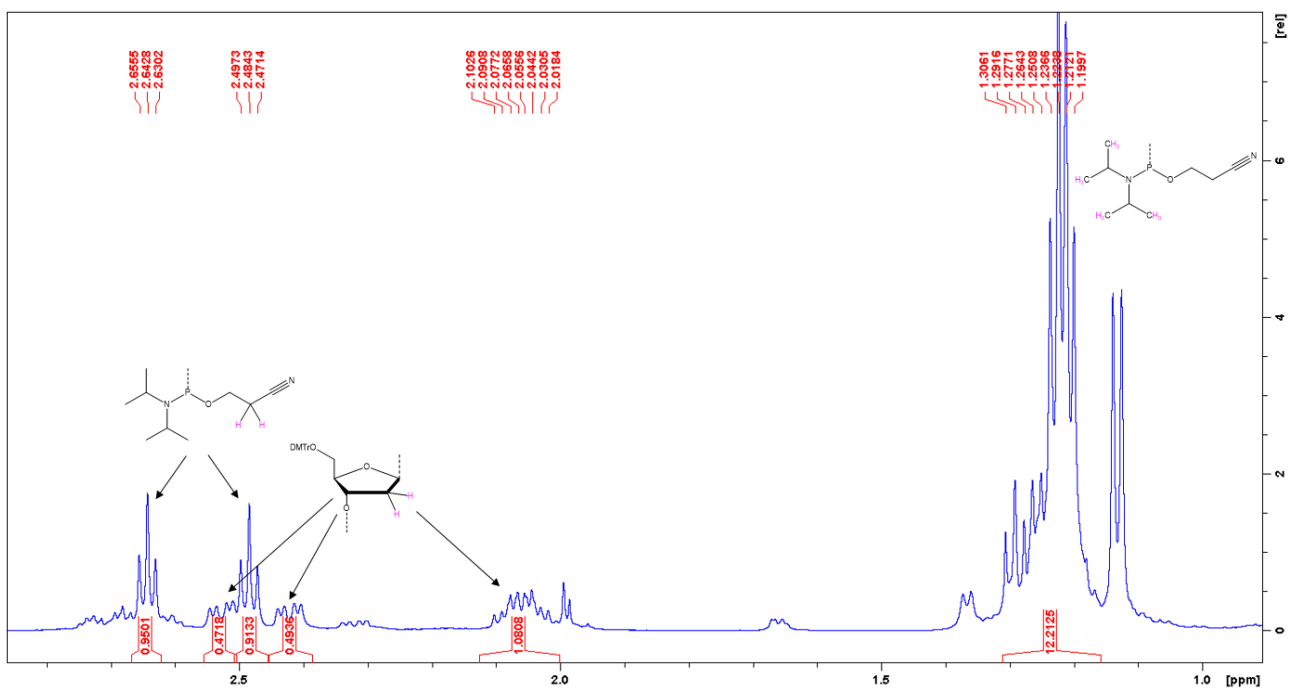
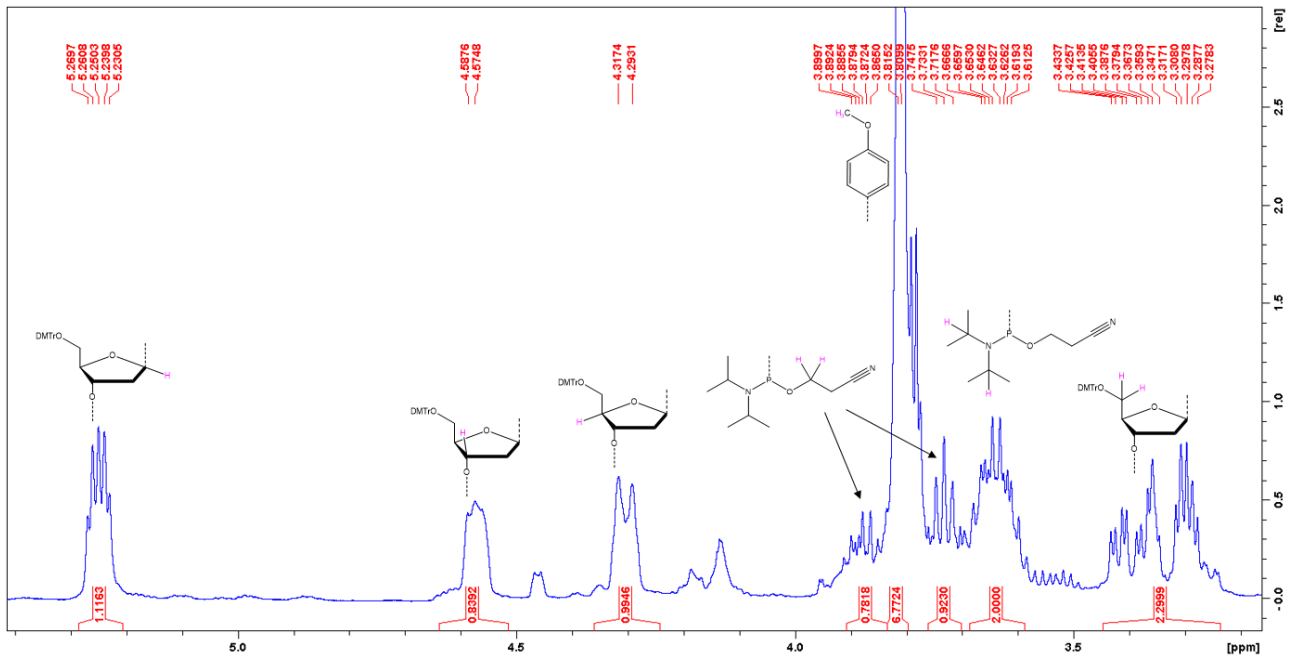


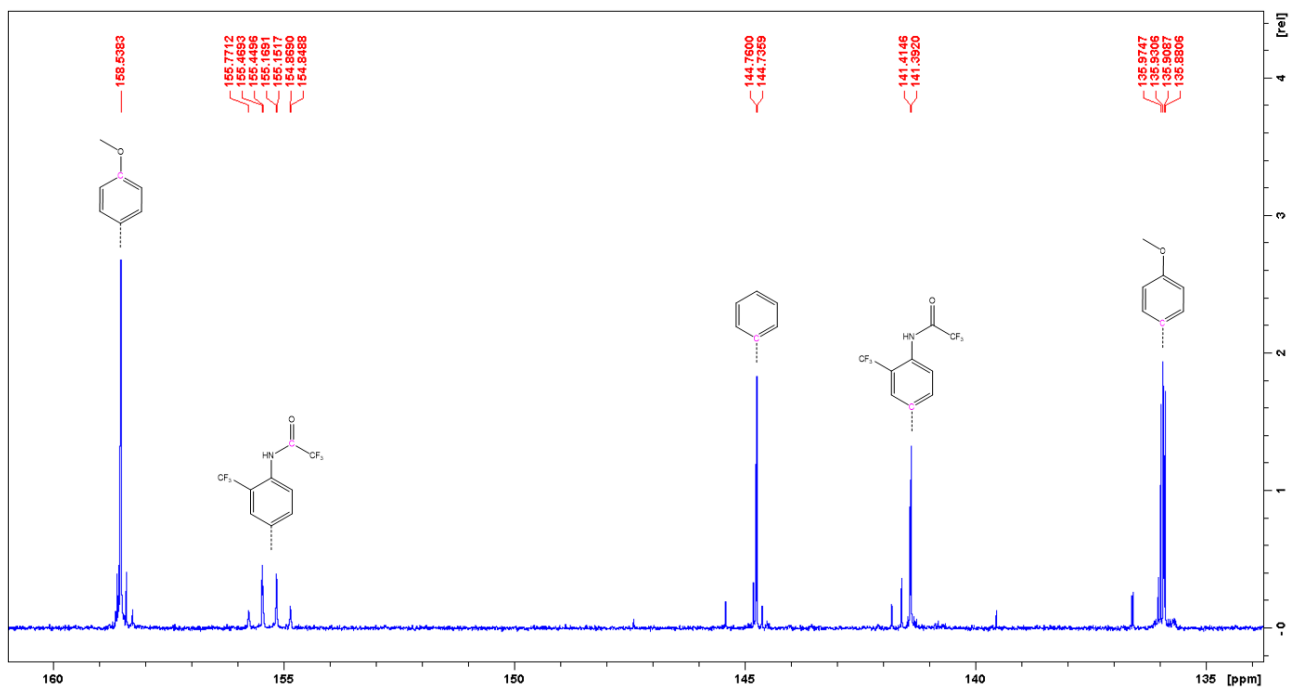
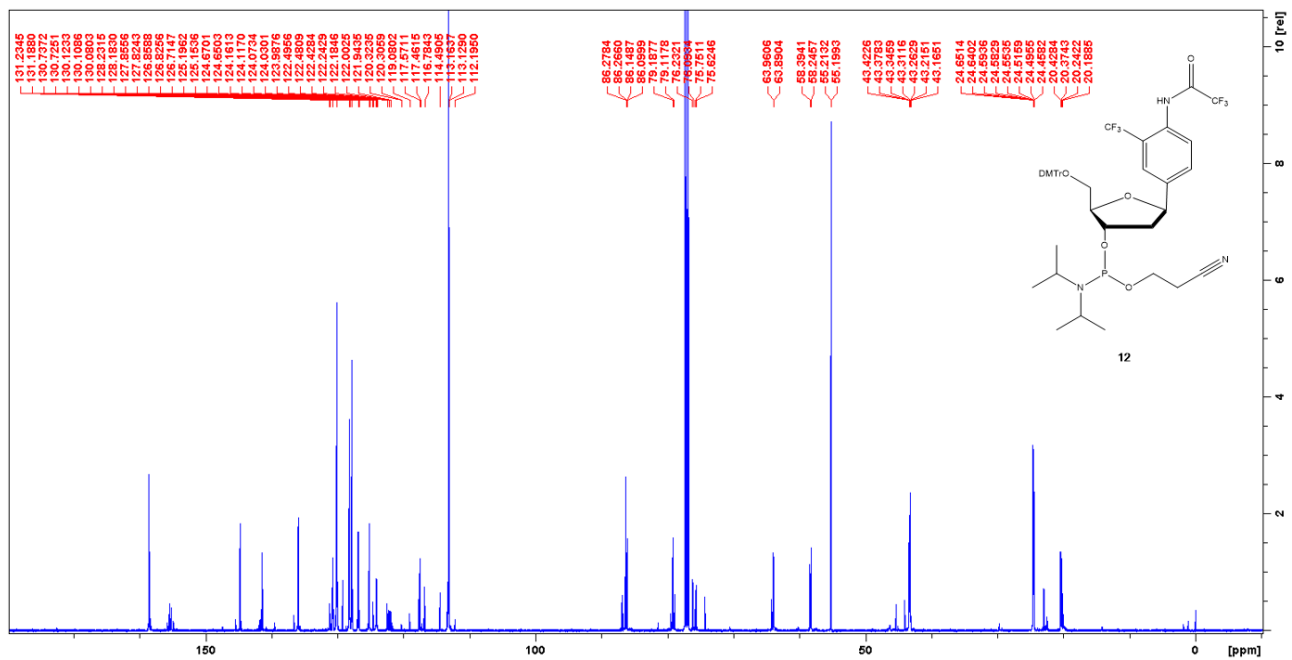


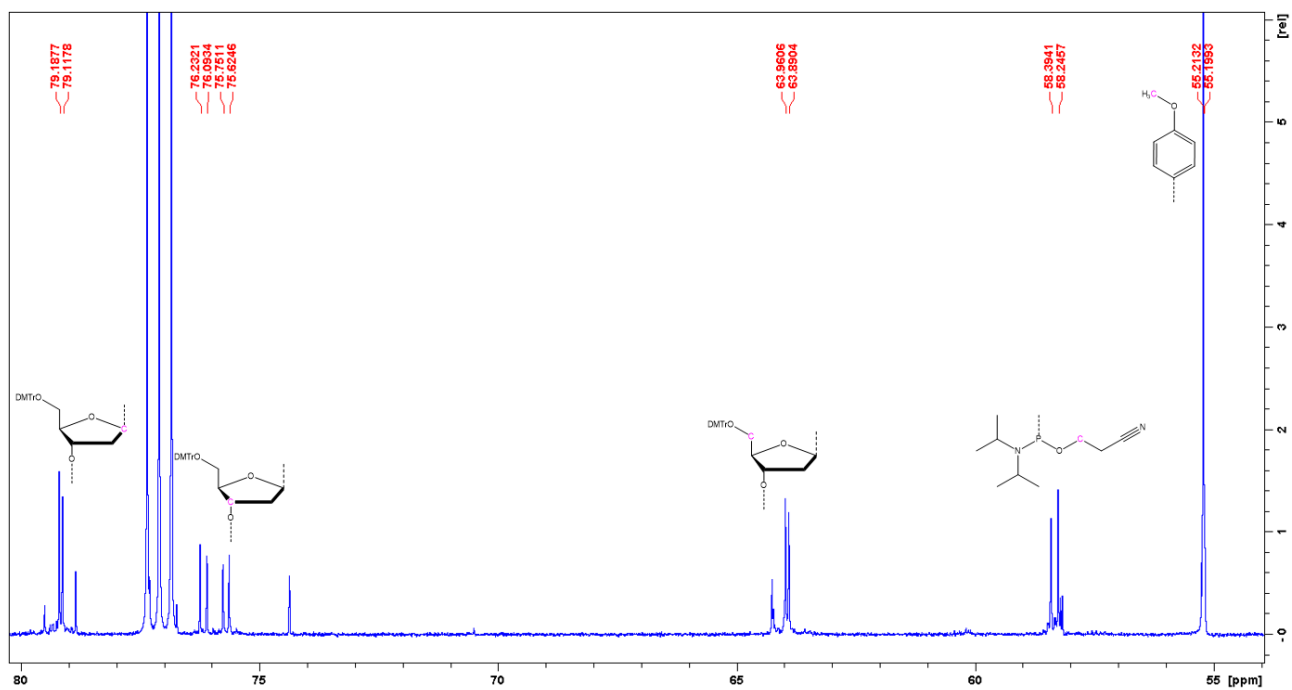
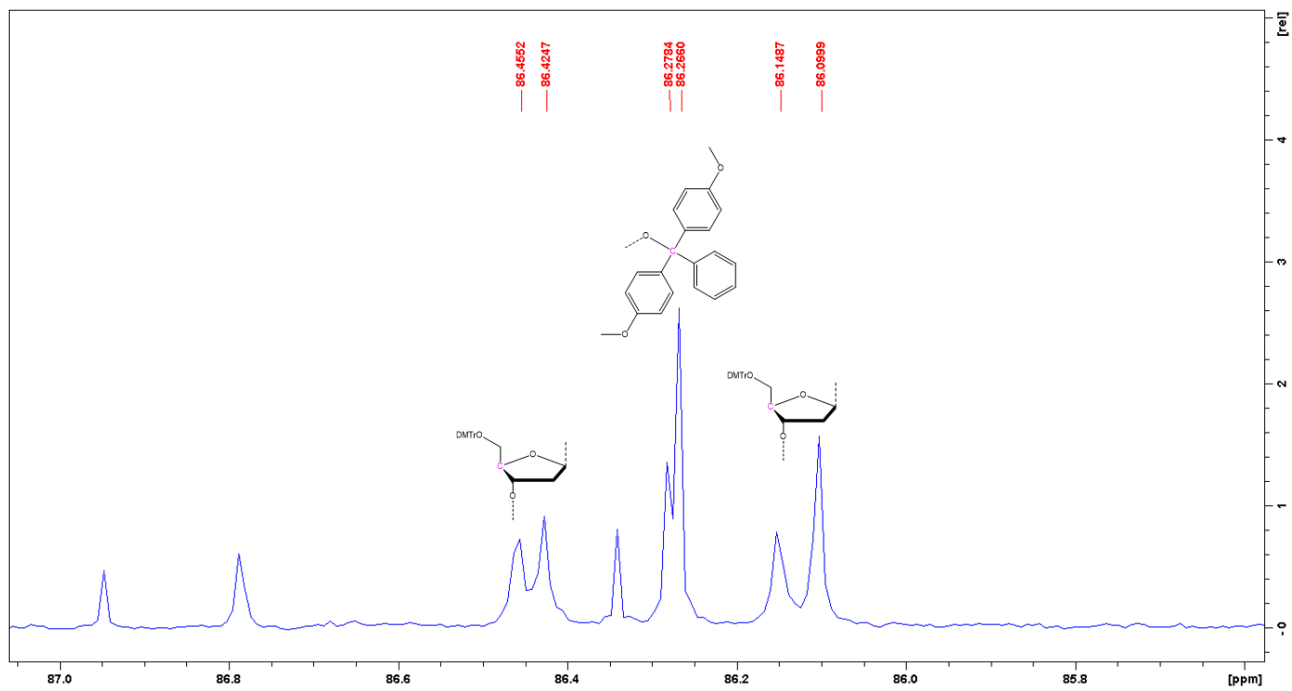


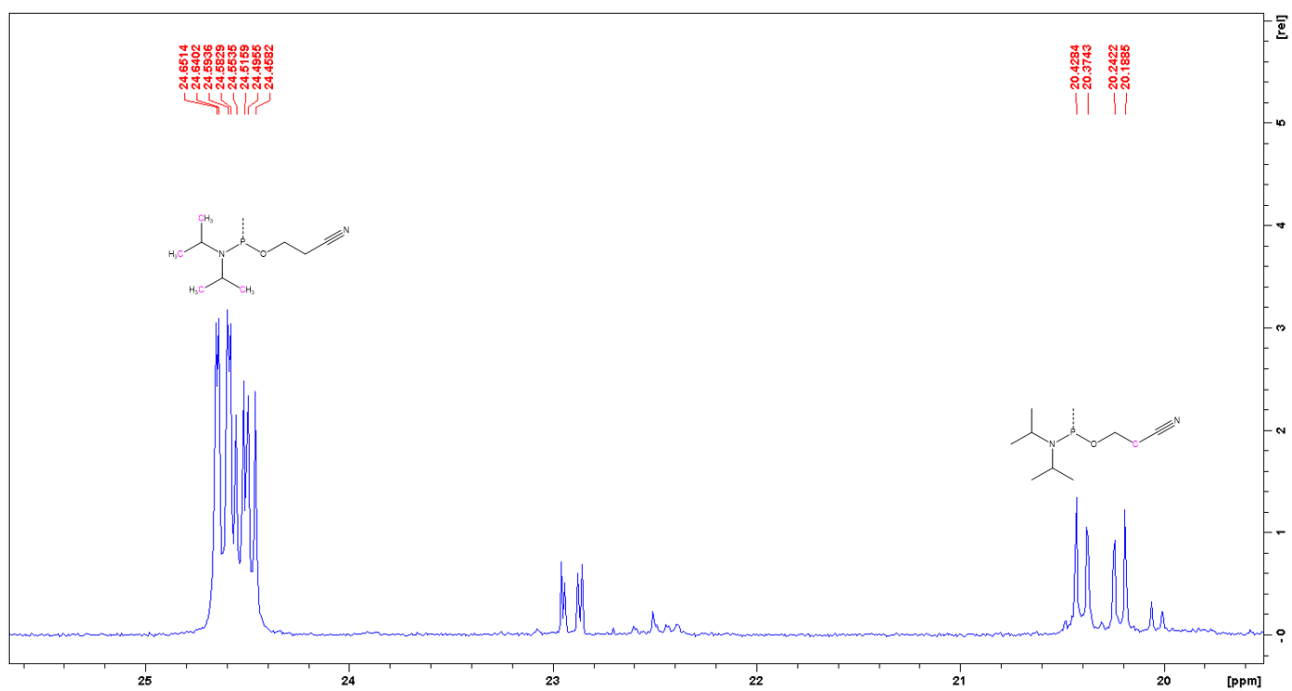
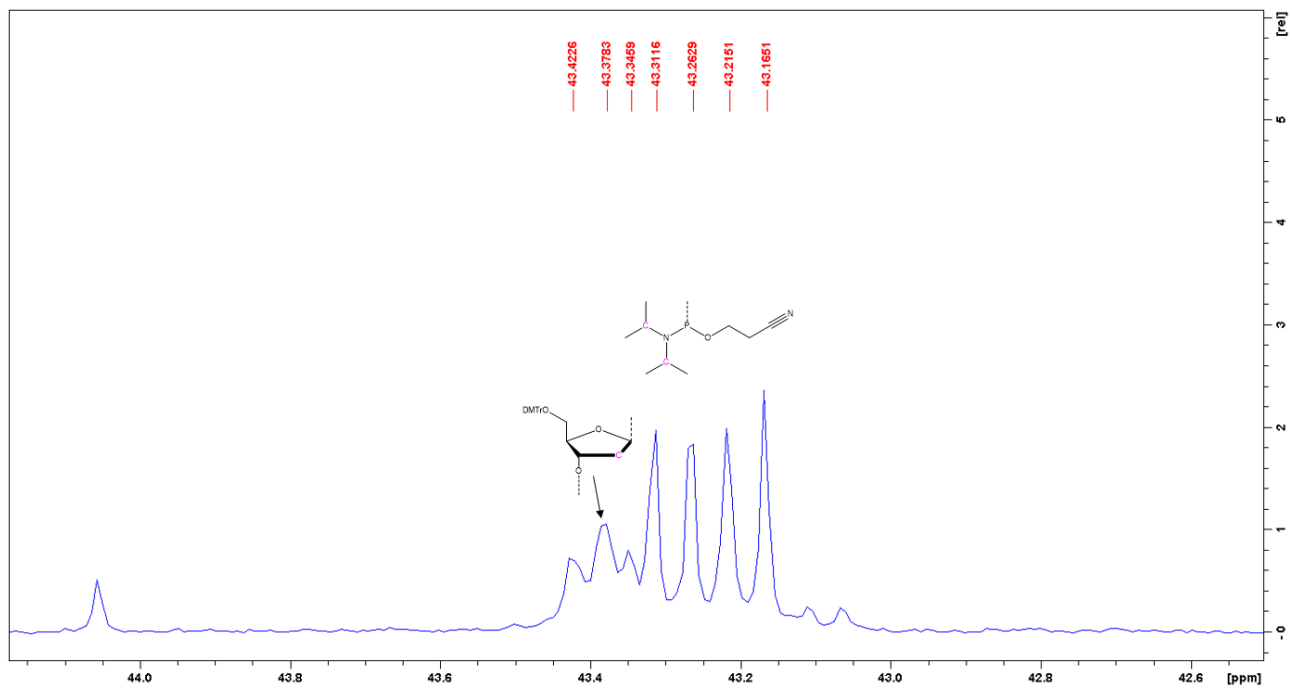


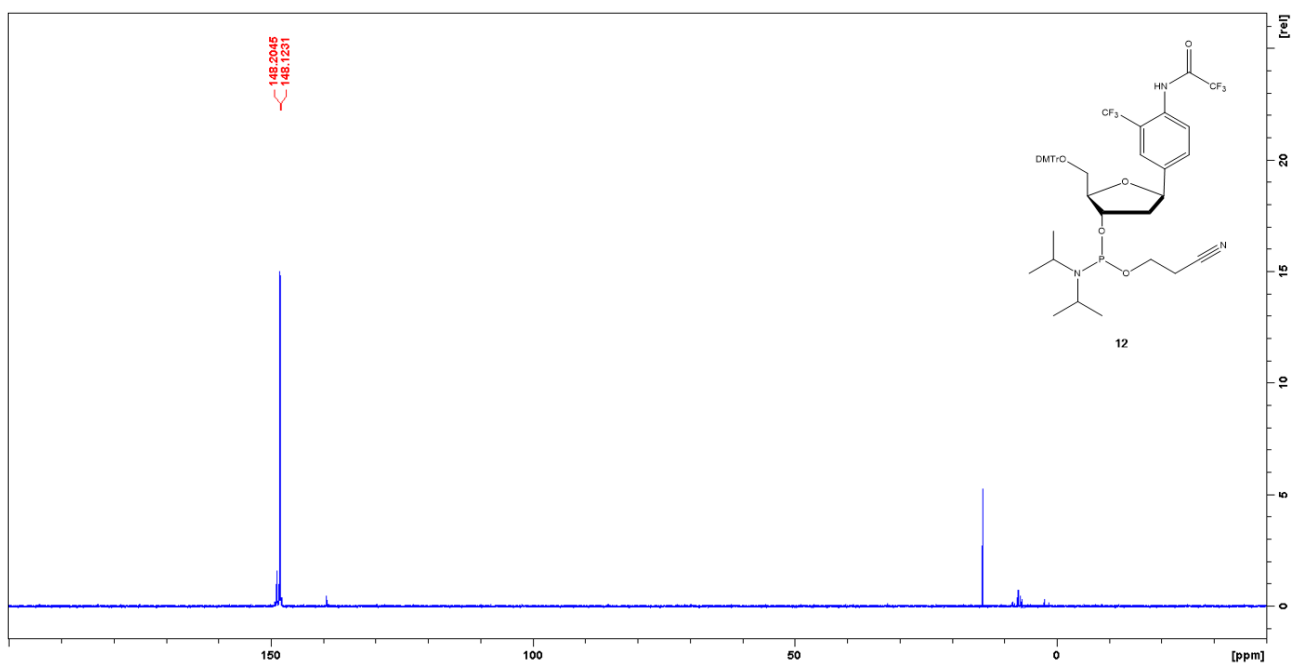
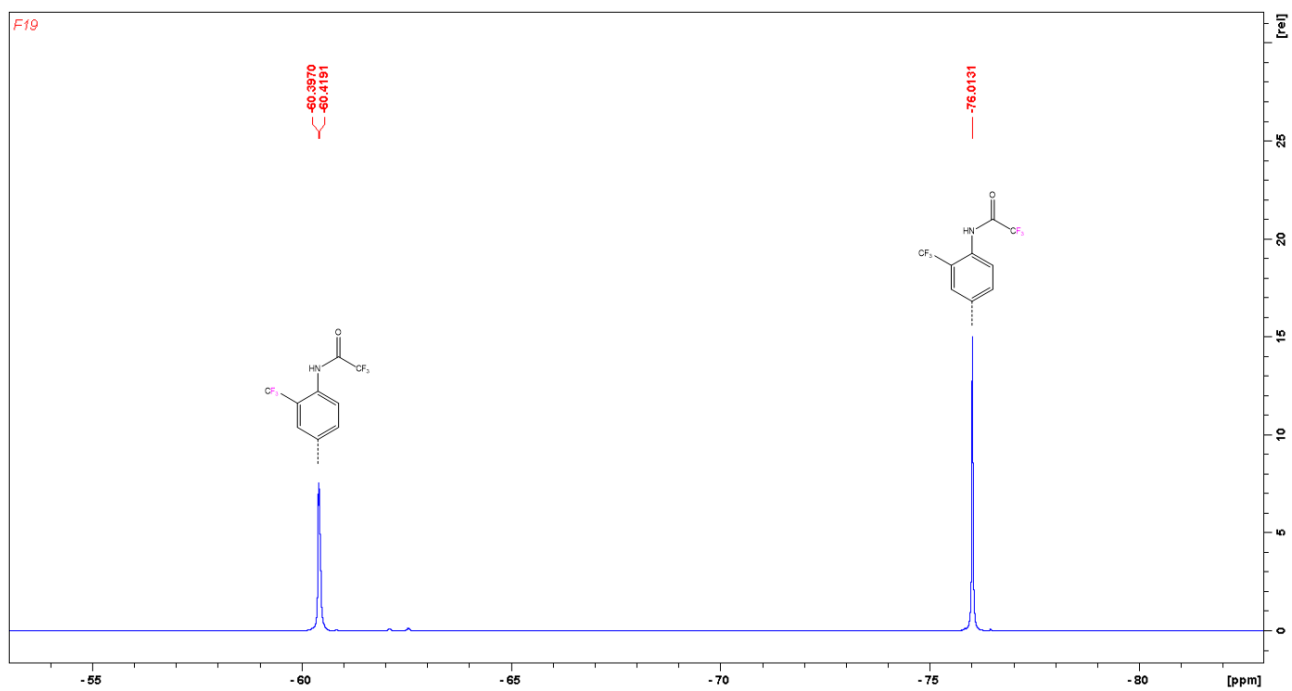


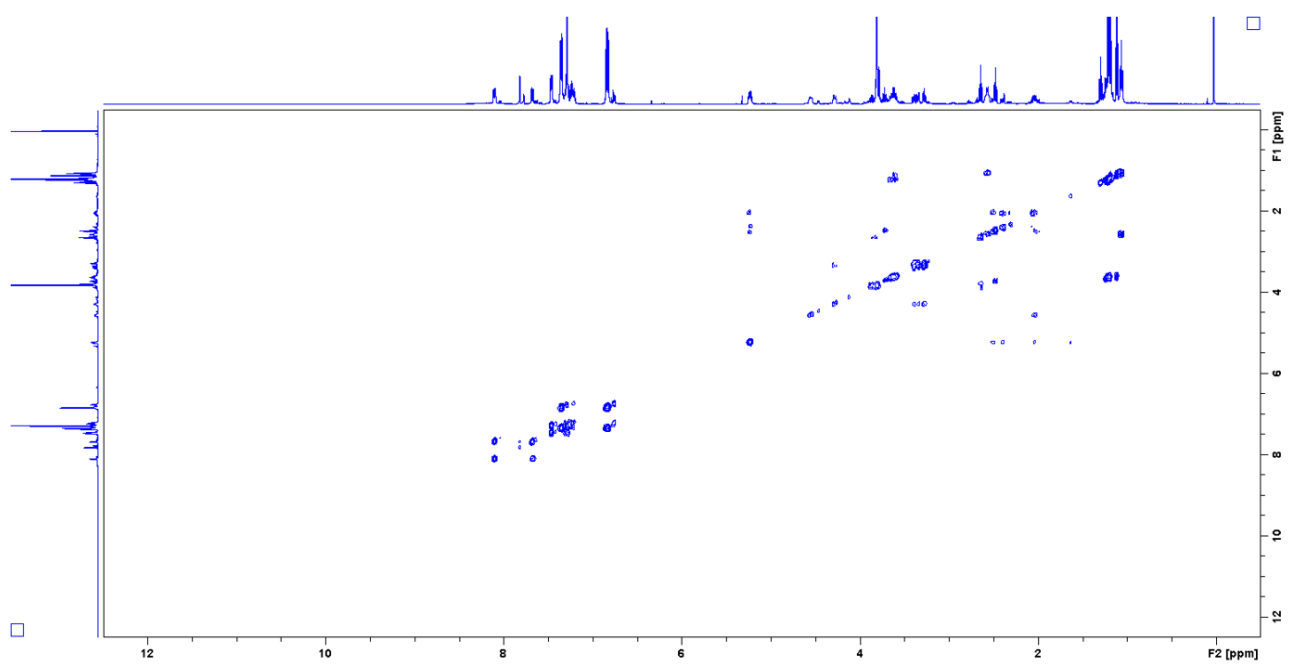
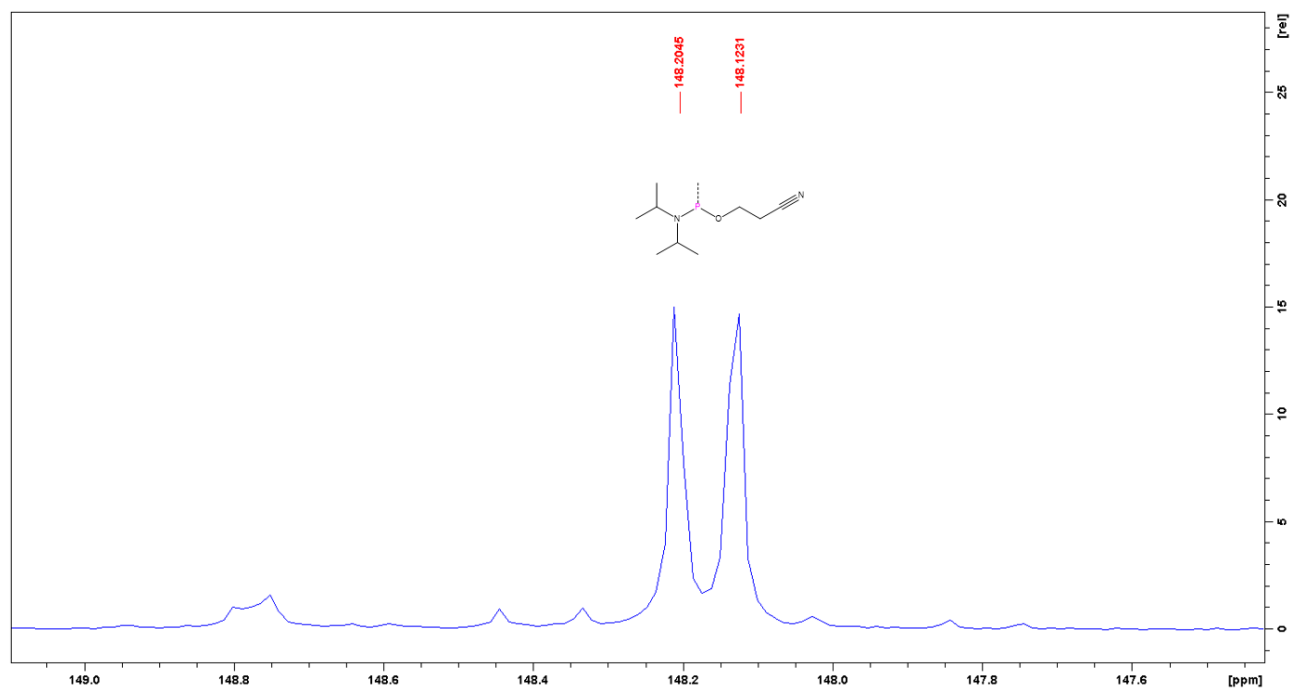


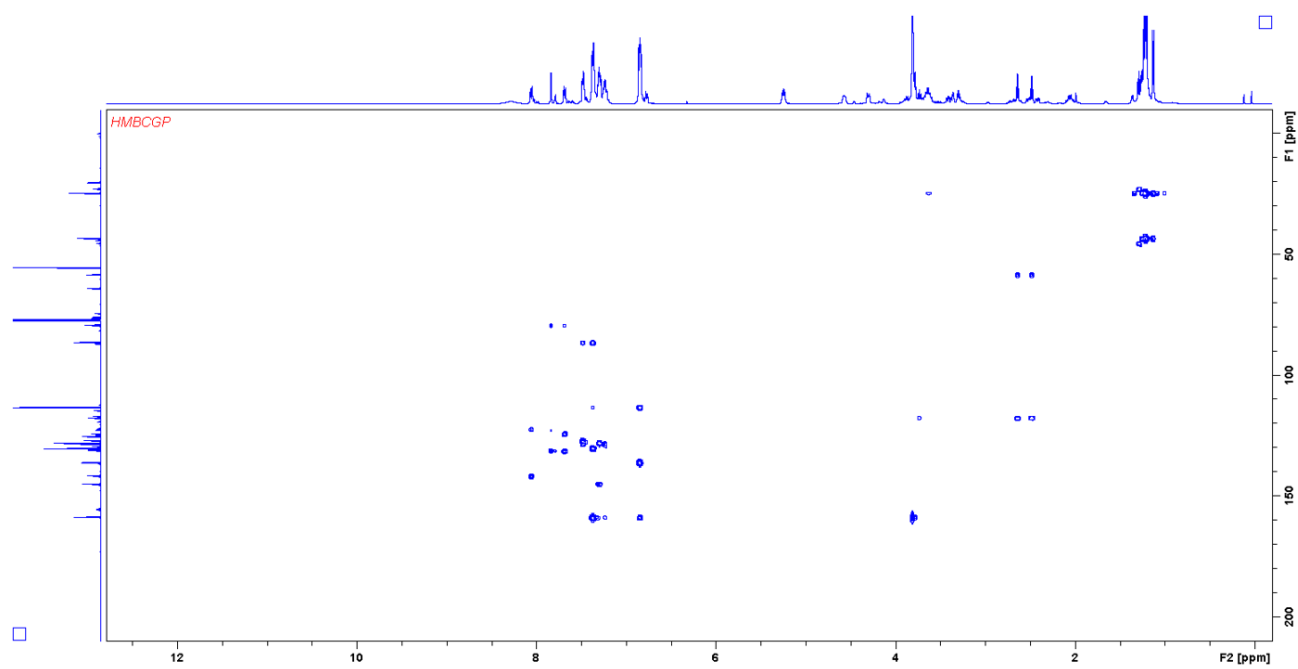
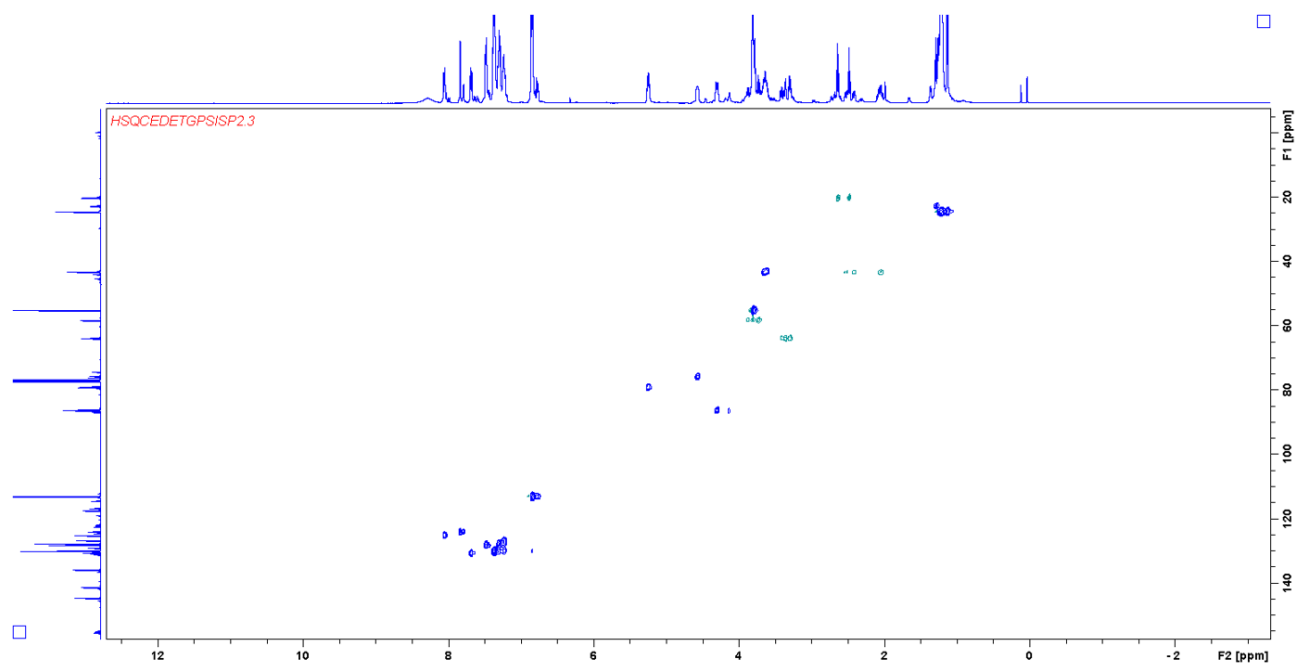


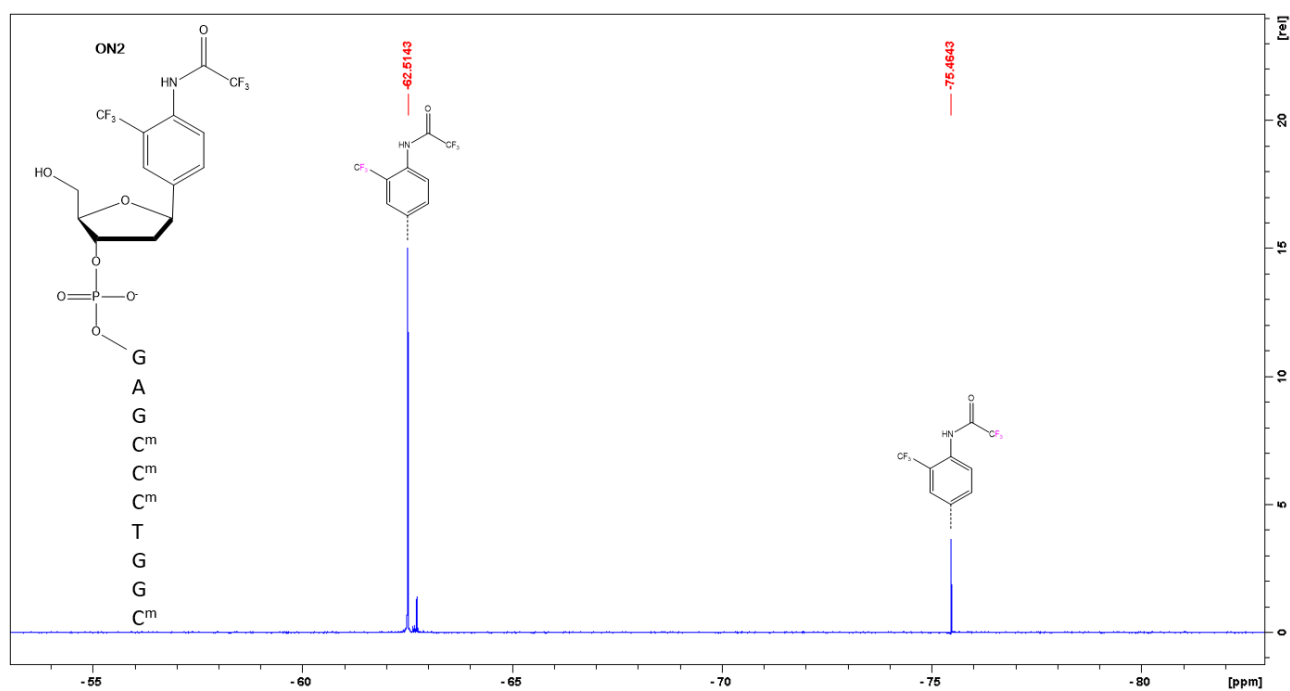
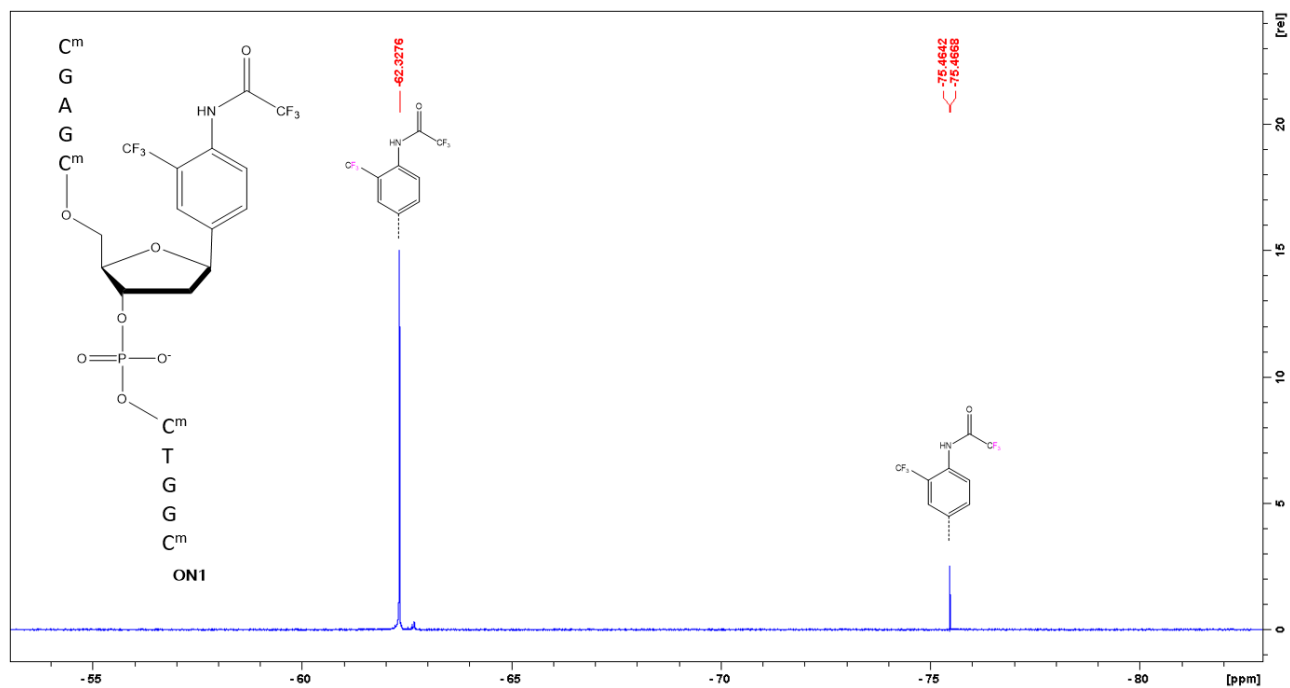


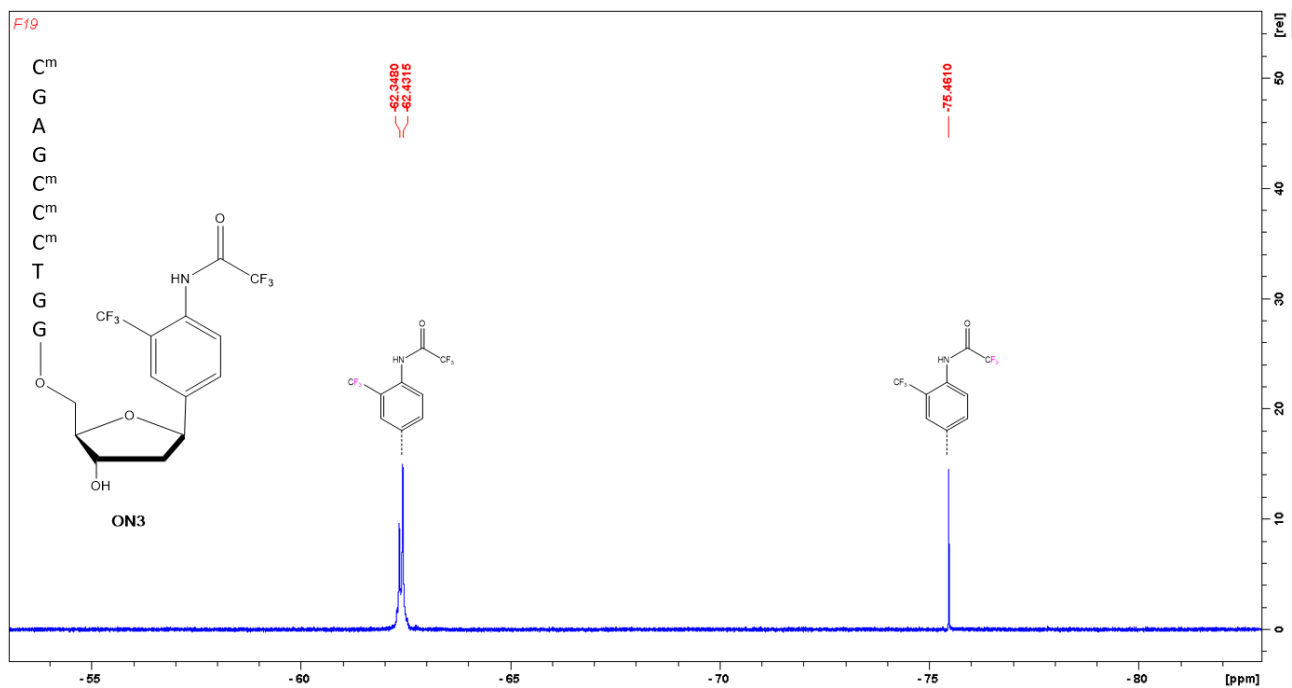












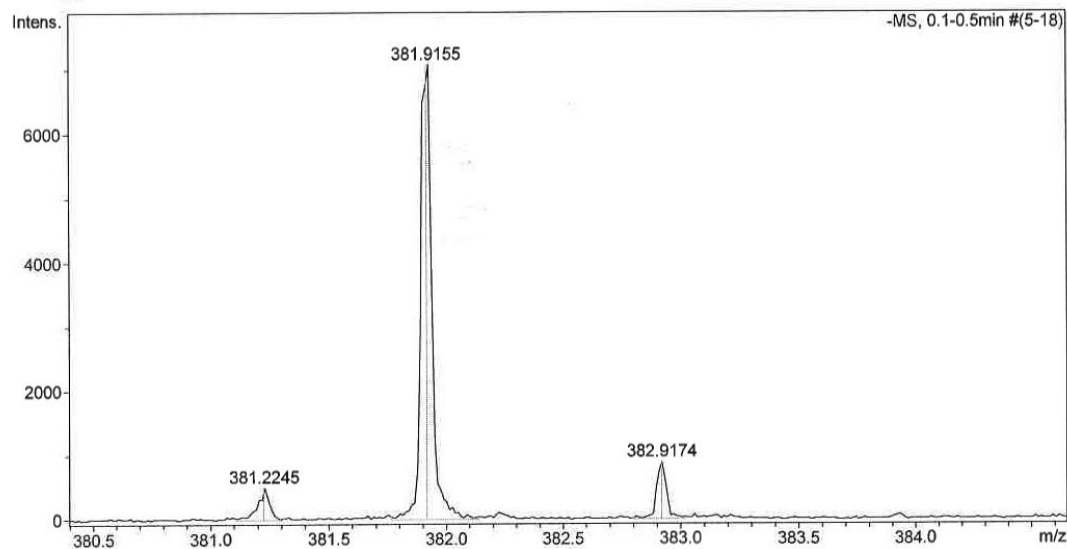
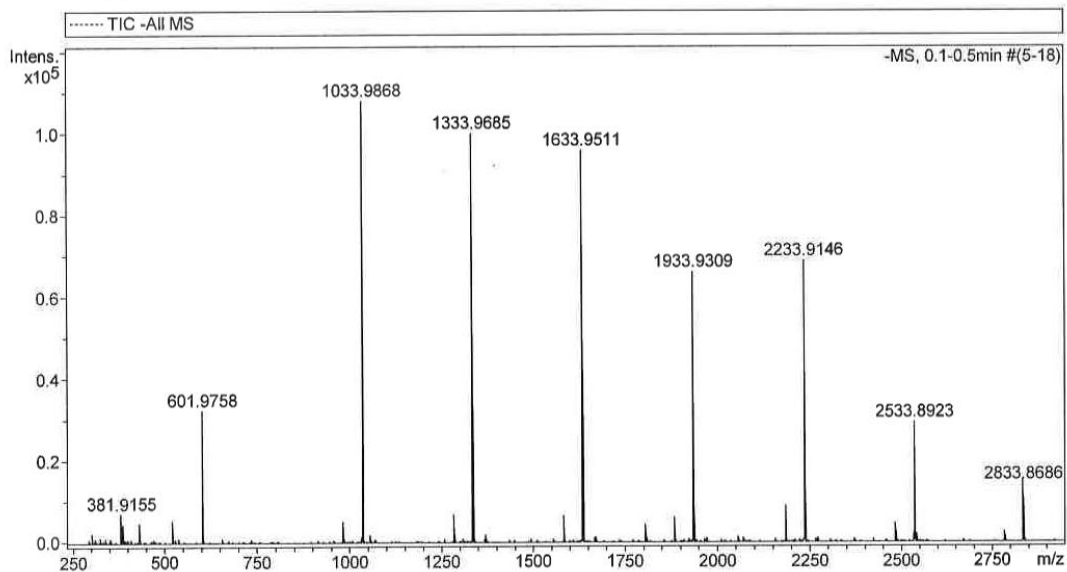
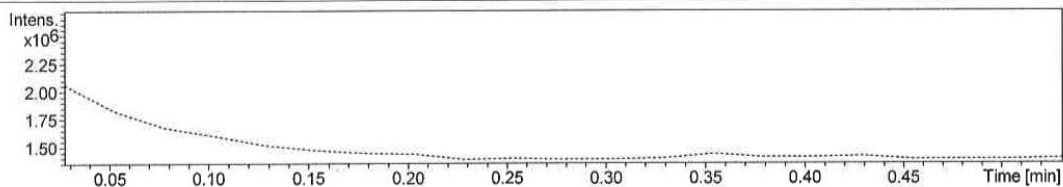
Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\TuomasL\AS_aniliini.d
Method tuneneg.m
Sample Name AS_aniliini
Comment

Acquisition Date 1/23/2019 2:28:28 PM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q



Kuva 1. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 7.

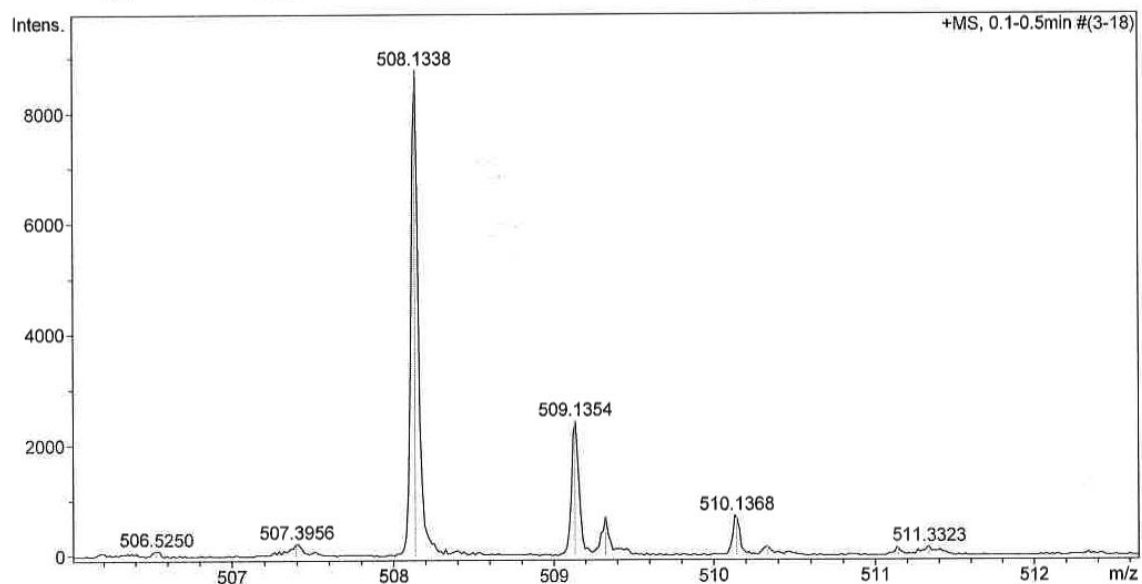
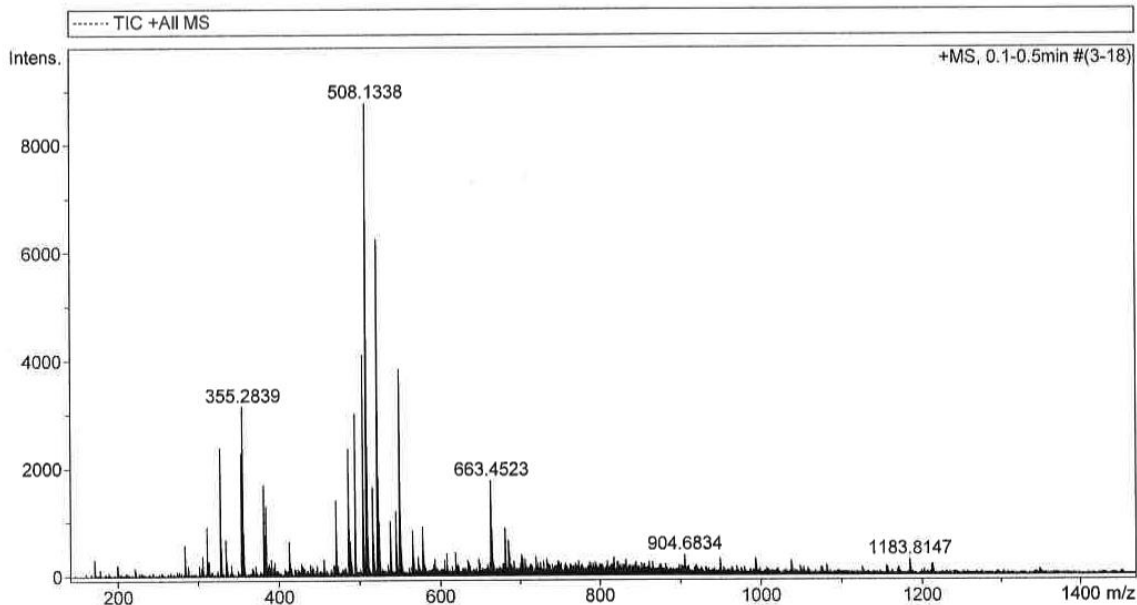
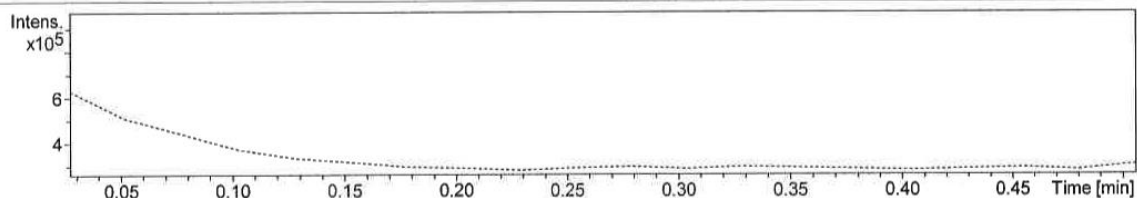
Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\TuomasL\AS_aniliinigykaali.d
Method tunepos_wide.m
Sample Name AS_aniliinigykaali
Comment

Acquisition Date 1/23/2019 1:48:19 PM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q



Kuva 2. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 8.

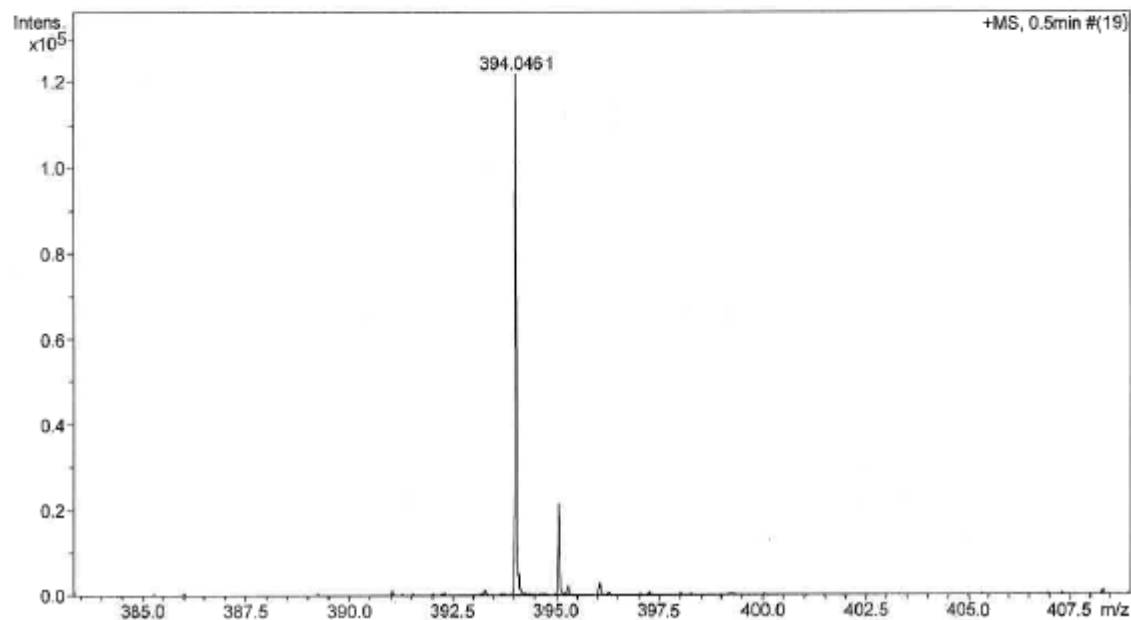
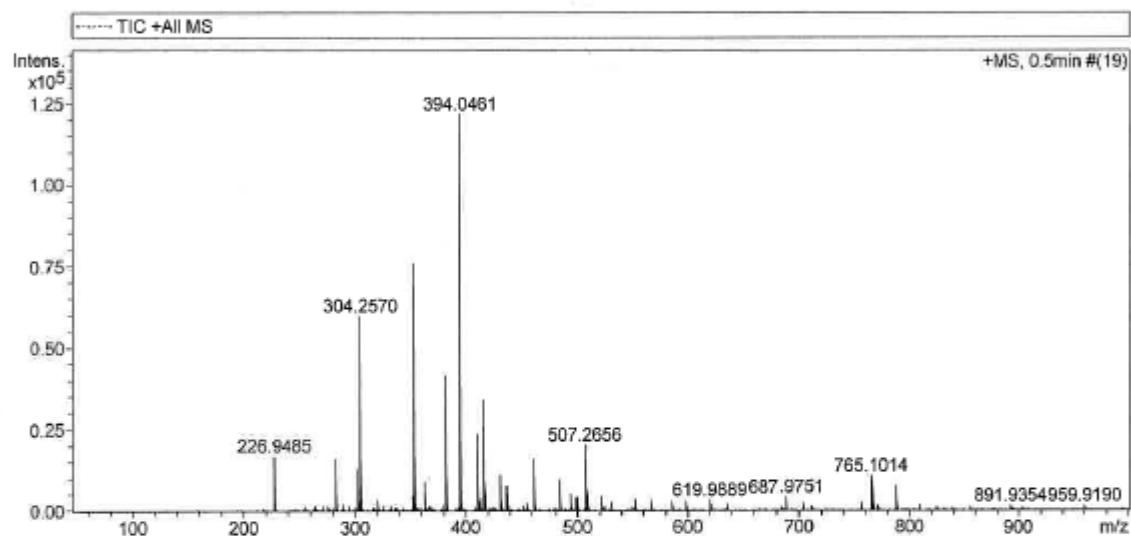
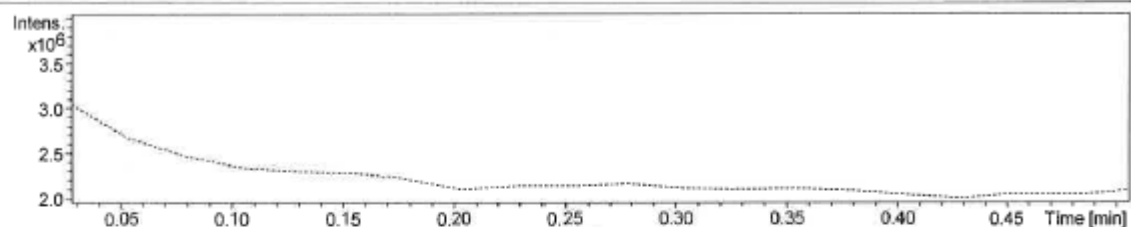
Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\TuomasL\nukleosidi 8.d
Method tunepos_wide.m
Sample Name nukleosidi 8
Comment

Acquisition Date 3/11/2019 11:11:33 AM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q



Kuva 3. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 9.

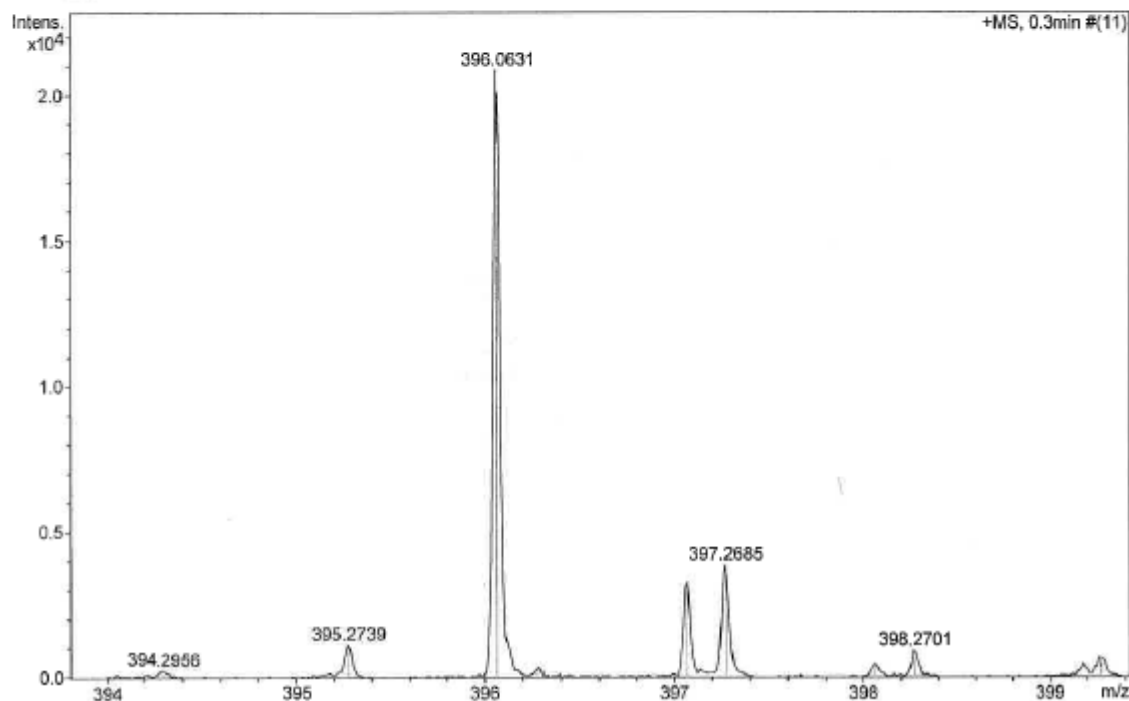
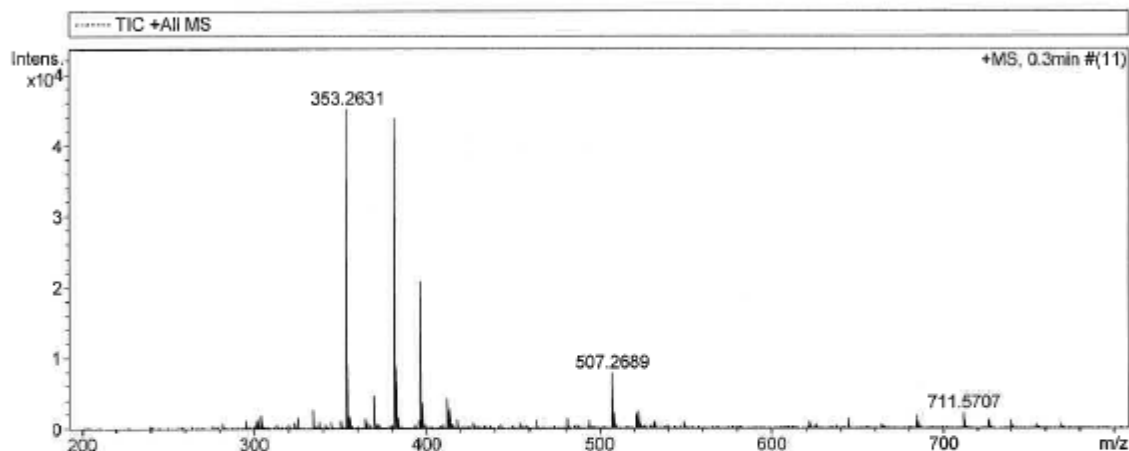
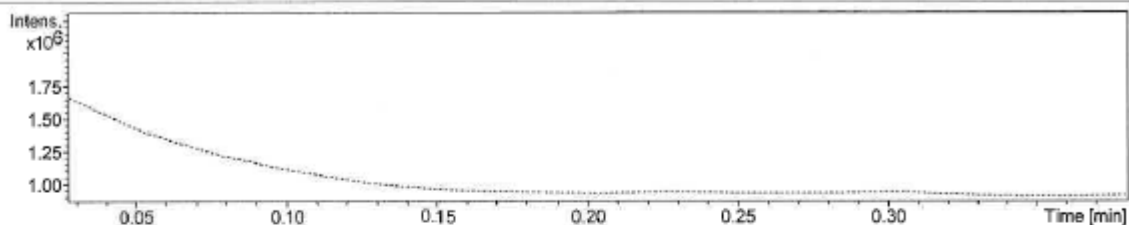
Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\AssiS\Nukleosidi 9.d
Method tuneos_wide.m
Sample Name Nukleosidi 9
Comment

Acquisition Date 3/19/2019 2:05:37 PM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q



Kuva 4. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 10.

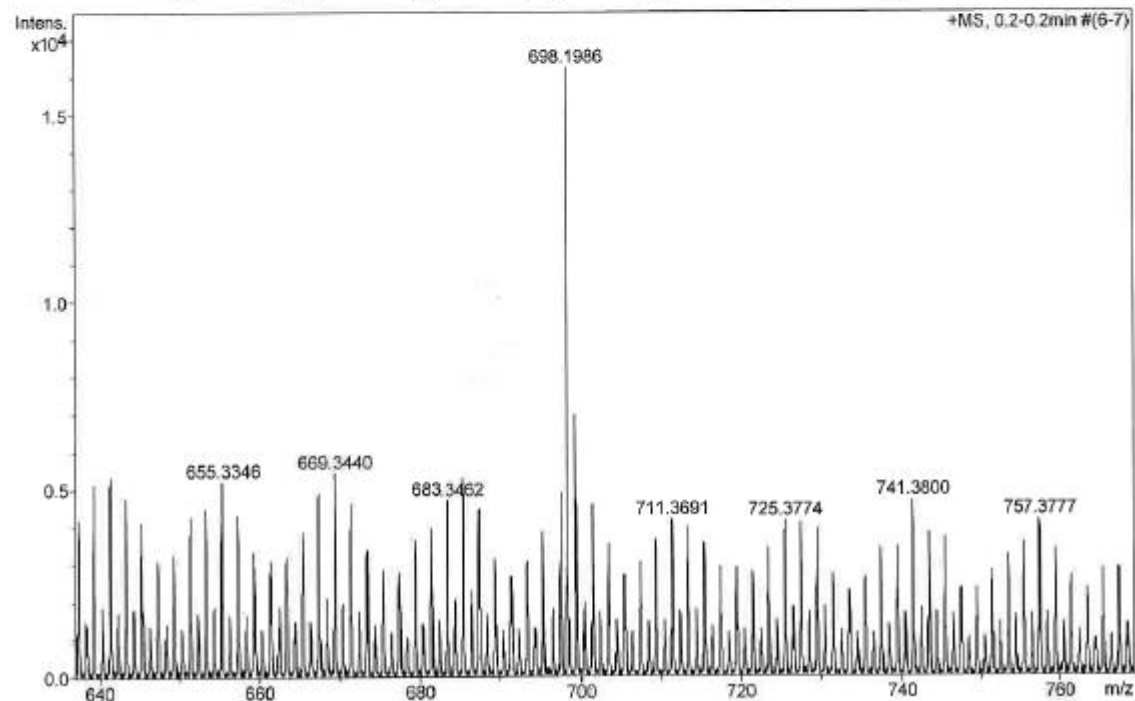
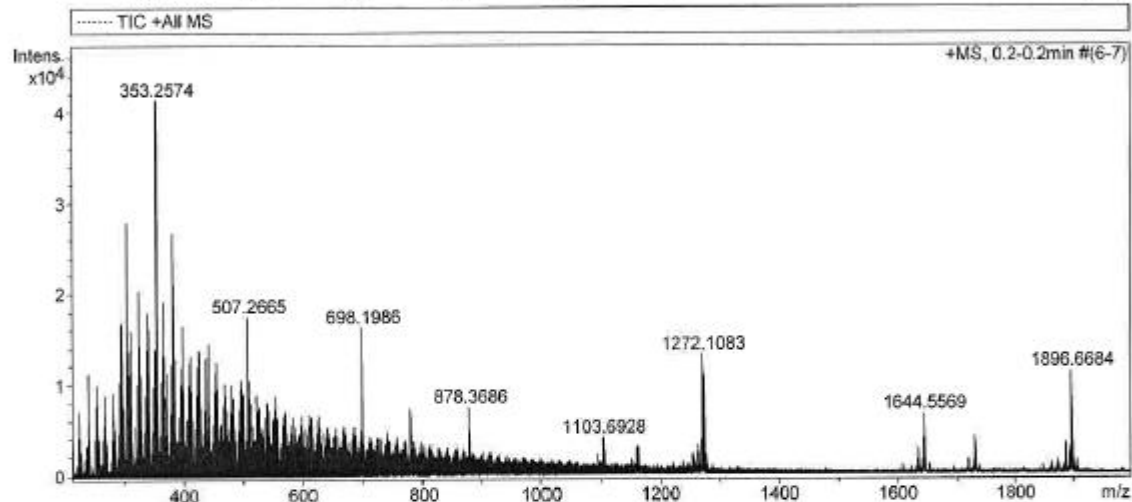
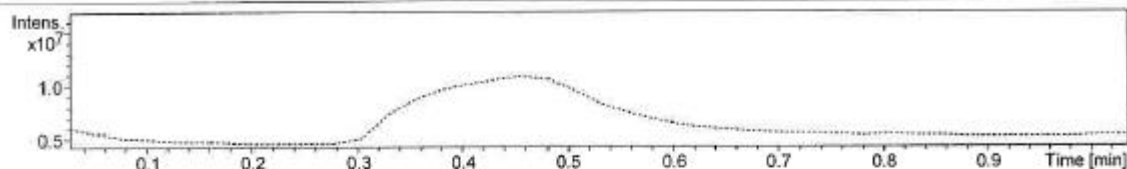
Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\AssiS\10.12.d
Method tunepos_wide.m
Sample Name 10.12
Comment

Acquisition Date 4/11/2019 12:08:12 PM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q



Kuva 5. ESI-TOF massa spektri yhdisteelle 11.

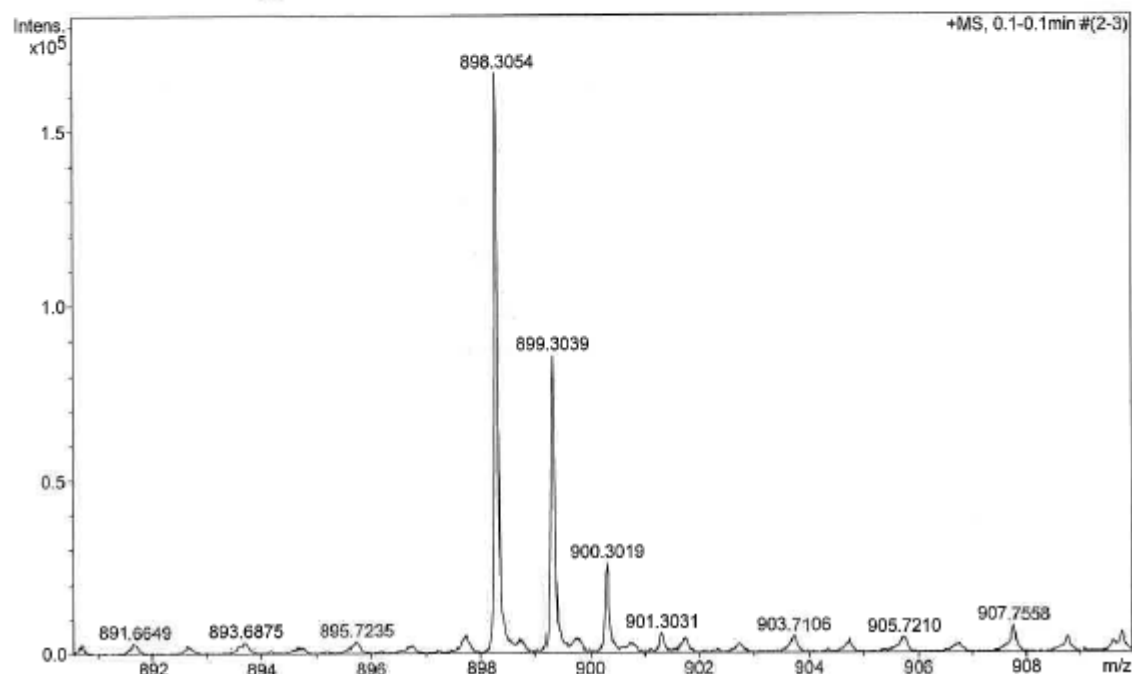
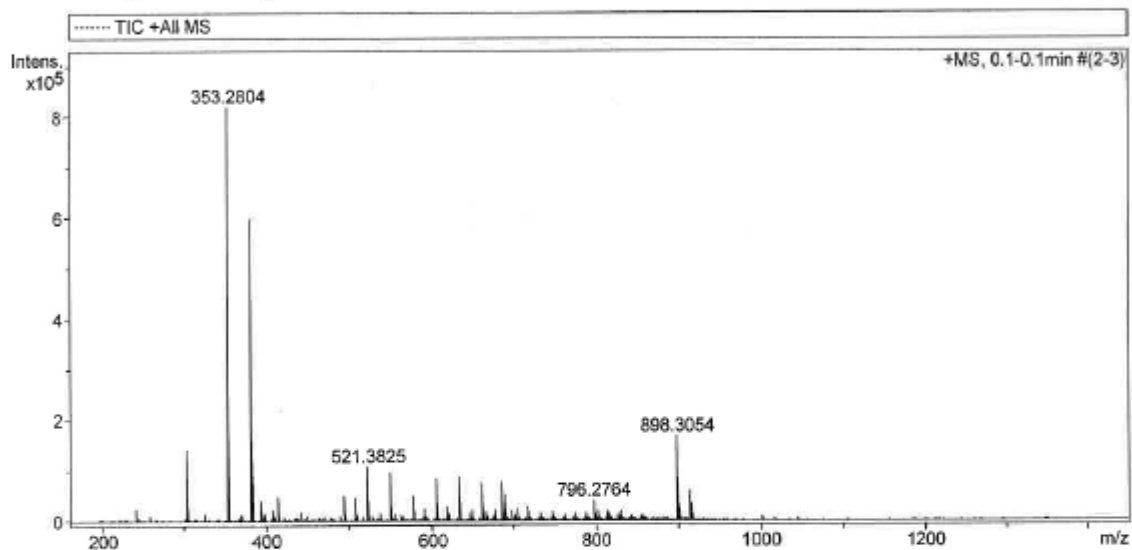
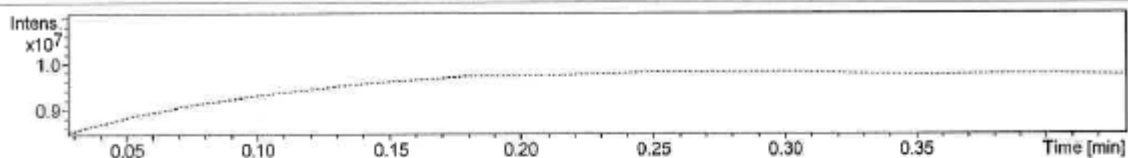
Generic Display Report

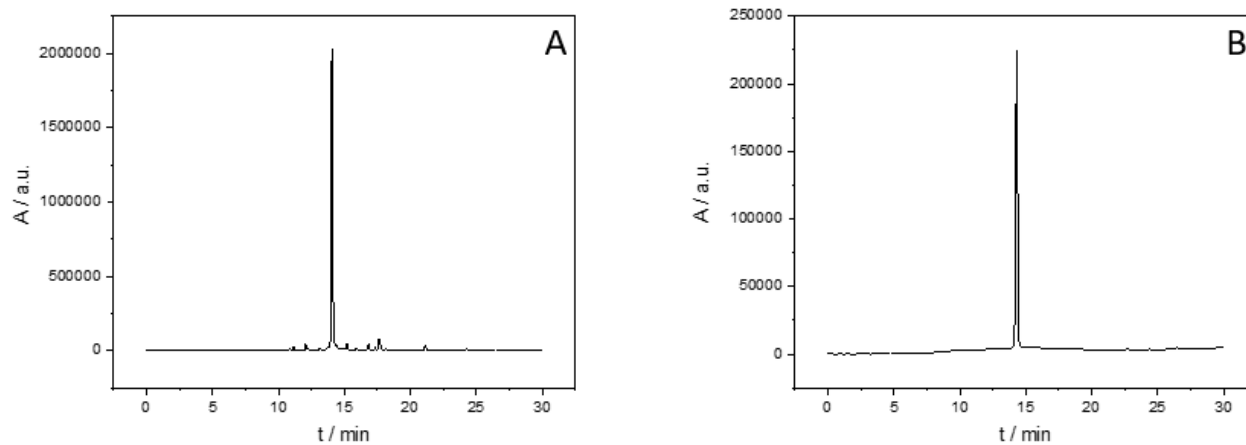
Analysis Info

Analysis Name D:\Data\AssiS\12.d
Method tune_pos_wide.m
Sample Name 12
Comment

Acquisition Date 4/30/2019 12:44:30 PM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q





Kuva 7. RP HPLC signaali oligonukleotidista **ON1** A) raakatuote ja B) puhdistettu; Clarity Oligo-RP C18 kolonnilla (250 x 10 mm, 10 μm); virtausnopeus = 3,0 ml min⁻¹; lineaarinen gradientti (5-35 % 30 min aikana) asetonitriilillä 0,1 molaarisessa trietyyliammoniumasetaatti vesiliuoksessa.

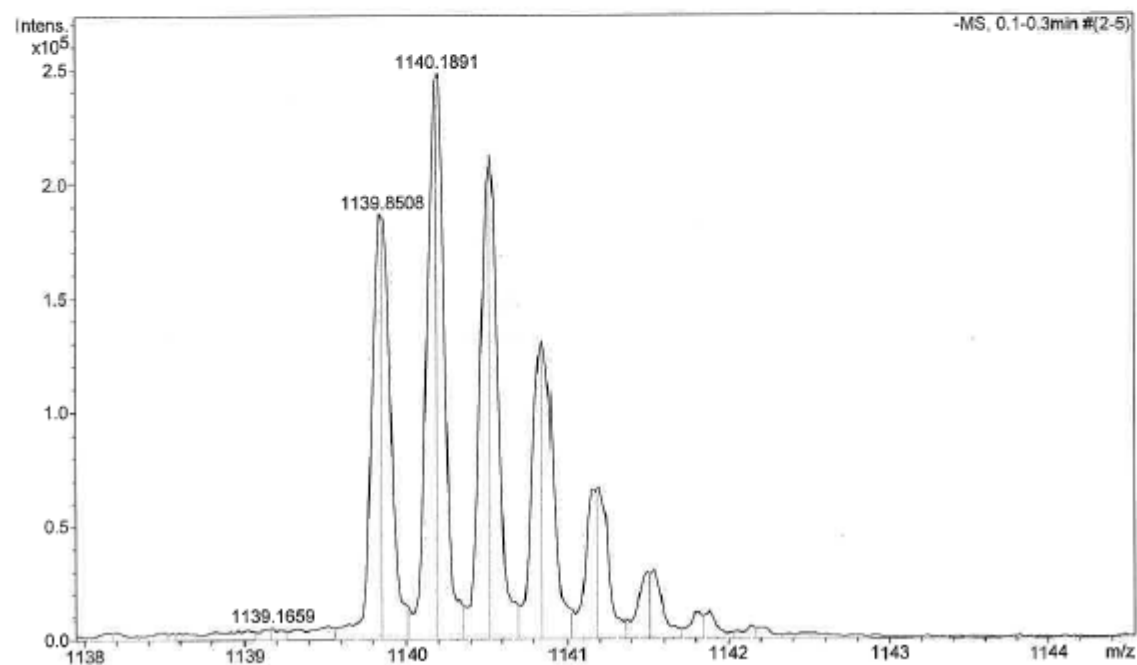
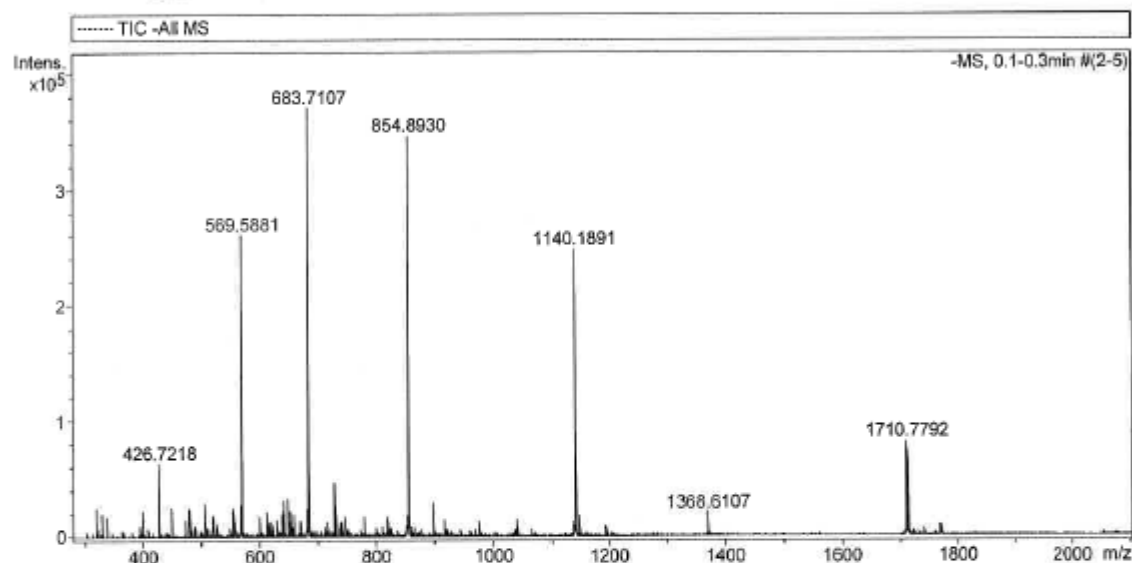
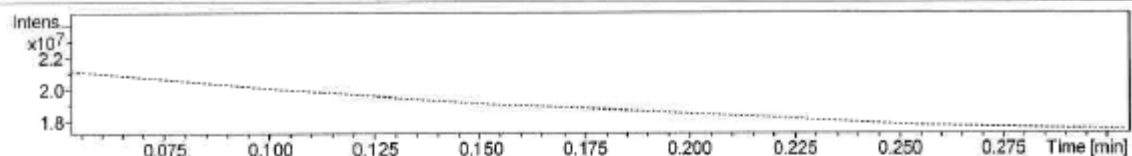
Generic Display Report

Analysis Info

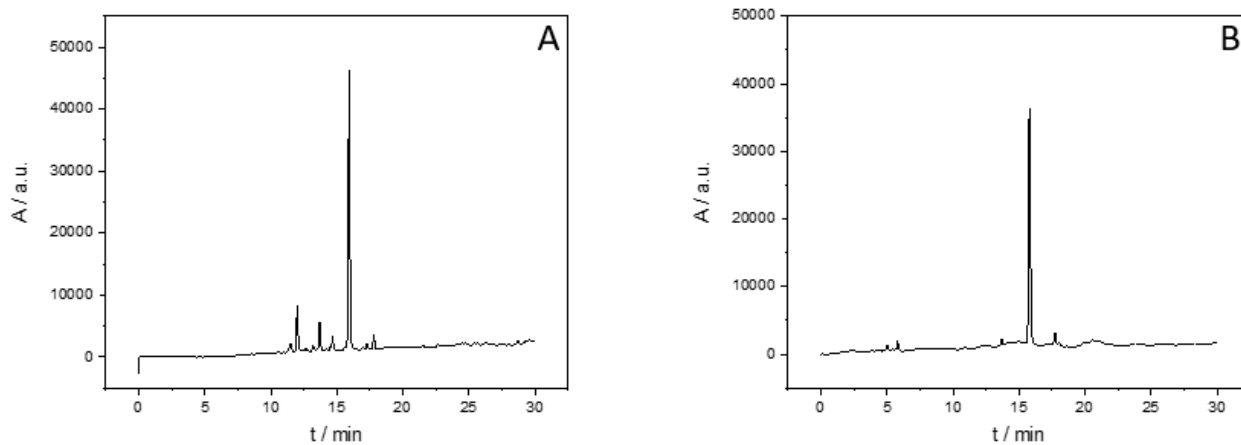
Analysis Name D:\Data\AssiS\ON1ASSI.d
Method oligo.m
Sample Name ON1ASSI
Comment

Acquisition Date 5/15/2019 10:35:09 AM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q



Kuva 8. ESI massa spektri oligonukleotidille ON1.



Kuva 9. RP HPLC signaali oligonukleotidista ON2 A) raakatuote ja B) puhdistettu; Clarity Oligo-RP C18 kolonnilla (250 x 10 mm, 10 μm); virtausnopeus = 3,0 ml min⁻¹; lineaarinen gradientti (5-35 % 30 min aikana) asetonitriilillä 0,1 molaarisessa trietyyliammoniumasetaatti vesiliuoksessa.

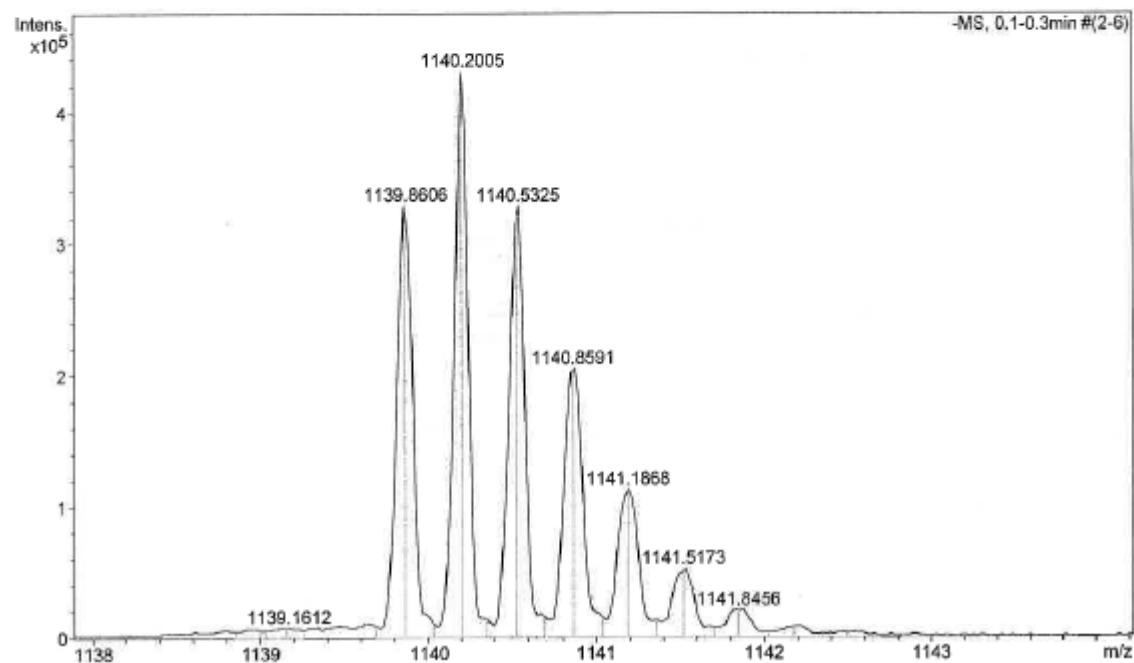
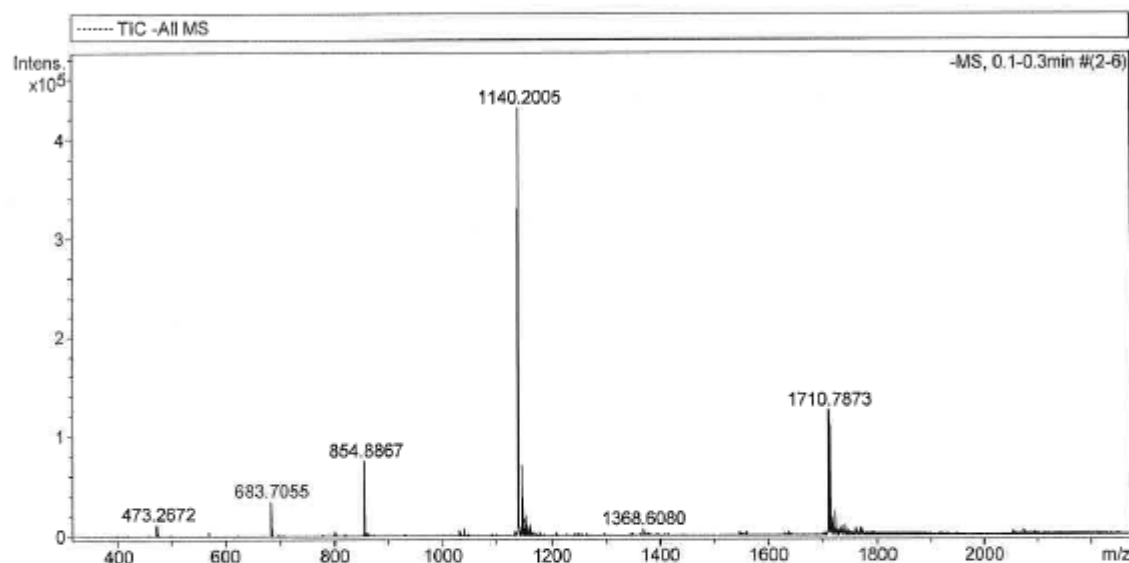
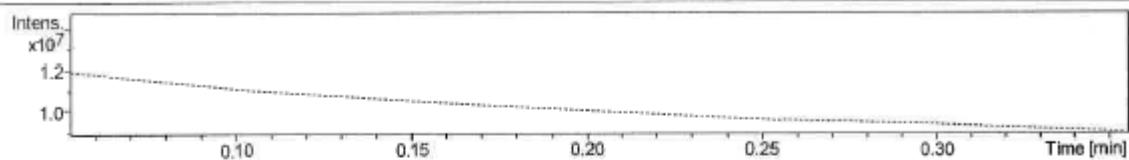
Generic Display Report

Analysis Info

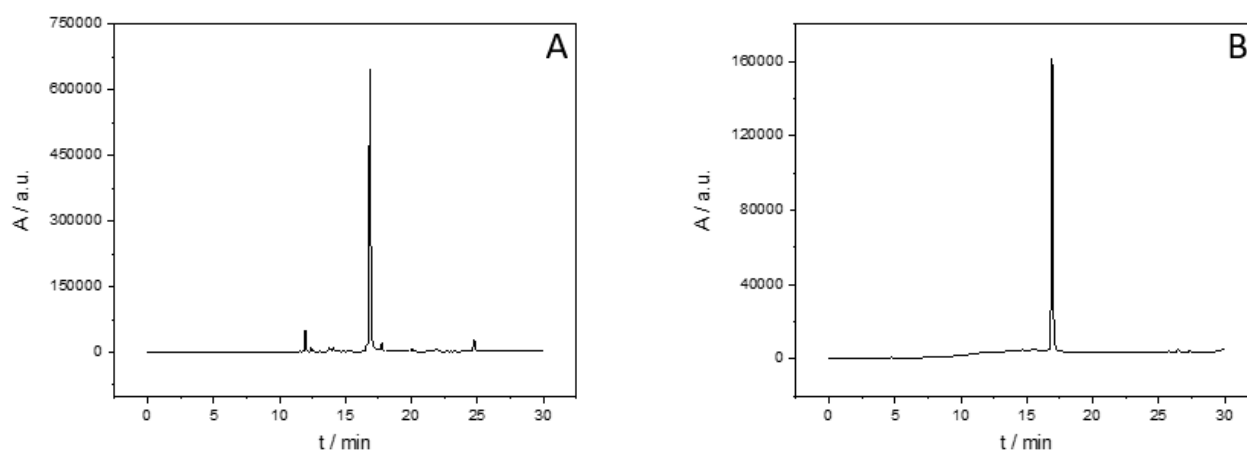
Analysis Name D:\Data\AssiS\ON2ASSI.d
Method oligo.m
Sample Name ON2ASSI
Comment

Acquisition Date 5/15/2019 10:45:23 AM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q



Kuva 10. ESI massa spektri oligonukleotidille ON2.



Kuva 11. RP HPLC signaali oligonukleotidista **ON3** A) raakatuote ja B) puhdistettu; Clarity Oligo-RP C18 kolonnilla (250 x 10 mm, 10 μm); virtausnopeus = 3,0 ml min⁻¹; lineaarinen gradientti (5-35 % 30 min aikana) asetonitriilillä 0,1 molaarisessa trietyyliammoniumasetaatti vesiliuoksessa.

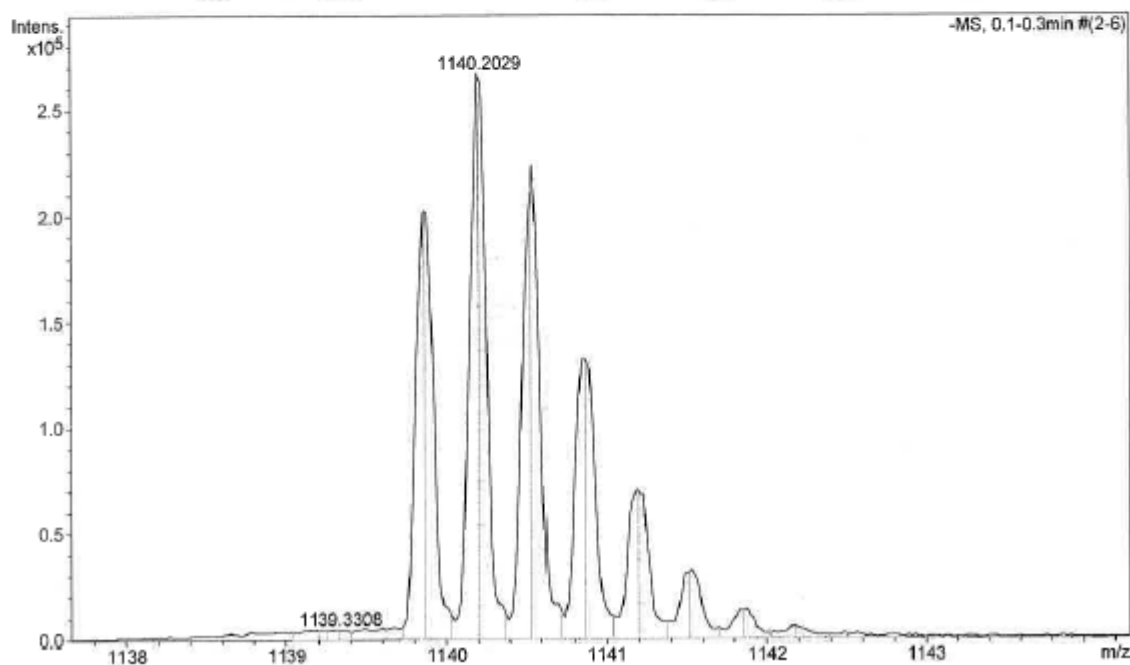
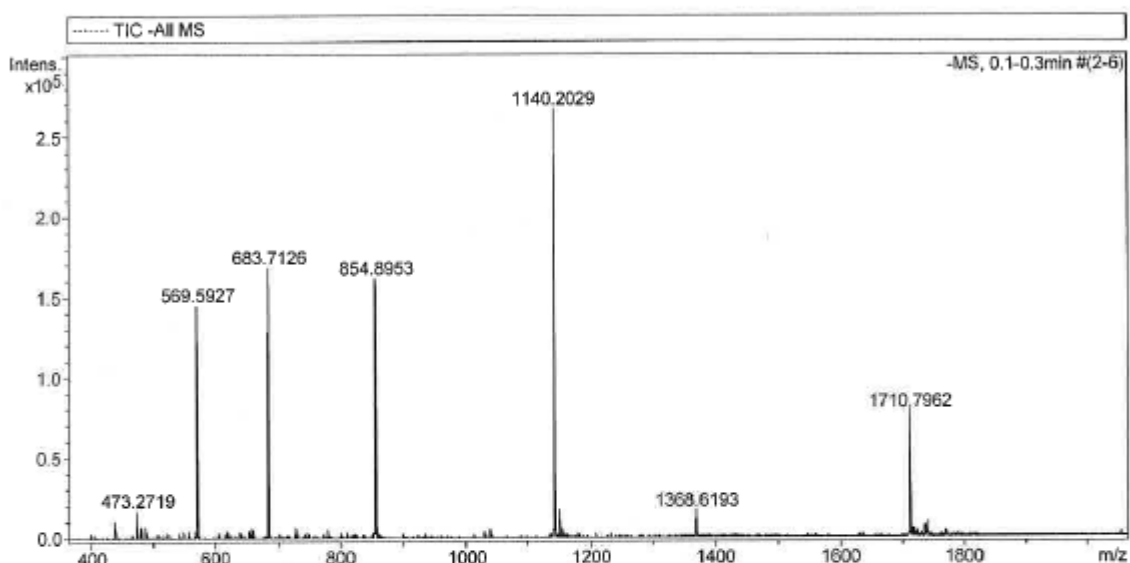
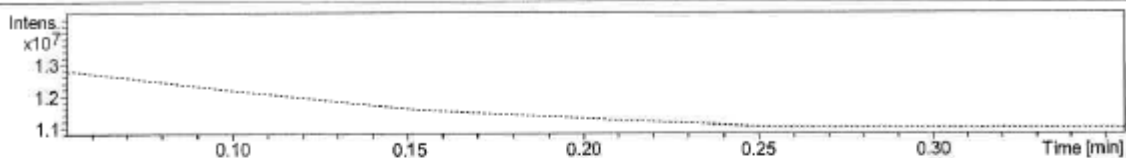
Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\AssiS\ON3ASSI.d
Method oligo.m
Sample Name ON3ASSI
Comment

Acquisition Date 5/15/2019 10:53:51 AM

Operator Bruker07
Instrument micrOTOF-Q



Kuva 12. ESI massa spektri oligonukleotidille ON3.

