

# **Nukleiinihappotemplatoitu polymerisaatio**

Turun Yliopisto  
Kemian Laitos  
Orgaaninen kemia ja kemiallinen biologia  
Pro gradu -tutkielma  
Aapo Aho  
Lokakuu 2018

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



TURUN YLIOPISTO

Kemian Laitos

AAPO AHO: Nukleiinihappotemplatoitu polymerisaatio

Pro gradu -tutkielma

Orgaaninen kemia ja kemiallinen biologia

Lokakuu 2018

---

Nukleiinihappotemplatoidussa polymerisaatiossa on kyse nukleoemästen spesifisen emäspariutumisen (Watson–Crick) katalyyttisyydestä. Katalyyttisyys perustuu nukleoemäksiä sisältävien polymeeriyksikköjen paikalliskonsentraation kasvuun. Nukleiinihappojen erilaiset emäsekvenssit sisältävät informaatiota, joka templatoidussa polymerisaatiossa siirtyy polymeeriin. Luonnon esimerkit nukleiinihappotemplatoidusta polymerisaatiosta ovat translaatio ja transkriptio. Näihin prosesseihin pohjautuu molekulaarinen evoluutio, johon tukeutumalla organismit ovat saavuttaneet miljardien vuosien aikana monimutkaisen rakenteen ja toiminnan.

Nukleiinihappotemplatoitua polymerisaatiota käsitellään tässä tutkielmassa kahtena aihepiirinä. Ensimmäinen koskee nukleiinihappojen ei-entsymaattista replikaatiota. Ei-entsymaattinen replikaatio on relevantti prebioottisen maailman mallinnuksen vuoksi. Kysymys siitä, miten ensimmäinen geneettinen materiaali kykeni monistamaan itseään ennen entsyymien läsnäoloa, ei ole lainkaan triviaali. Ei-entsymaattinen replikaatio on pitkään haastanut tutkijoita, mutta viime vuosina on löydetty lupaavia menetelmiä aktivoida nukleotidit replikaatiota varten etukäteen tai *in situ*.

Toisessa osiossa käsitellään nukleosidianalogien DNA-templatoitua polymerisaatiota dynaamisella kombinatorisella kemiällä (DCC). DCC:ssä polymerisaatio tapahtuu reversiibeilin ligaatioreaktioin. Idea reversiibelistä ligaatiokemiasta on saanut alkunsa virheellisten (ei-spesifisten) kytkentöjen ongelmasta luonnollisten nukleiinihappojen replikaatiossa. Reversiibelillä ligaatiokemiällä nukleiinihappo replikoituu termodynaamisen tasapainon ajamana täsmällisemmin. DCC:n saavutuksiin kuuluu mm. monimuotoisia sivuketjuja sisältävien peptidinukleiinihappojen synteesi. Mielenkiintoisia ovat myös boronaattiersterifikaatioon perustuvat nukleosidianalogien oligomerisaatiot, joita voidaan ohjata reaktioliuoksen happamuudella. Nukleosidianalogien potentiaalisia sovelluksia ovat mm. molekyylien ohjattu evoluutio ja synteetiset solut.

Kokeellisessa osuudessa tutkittiin nukleosidien dioksaanianalogien käytettävyyttä nukleiinihappotemplatoidussa oligomerisaatiossa. Työssä osoitettiin *N*(Me)-alkoksiamiini-funktiolla varustetun nukleosidin kondensoituvan reversiibelisti nukleosidin dioksaanianalogin hemiasetaaliin. Ligaatioreaktion nopeus ja tasapainon asema olivat riippuvaisia reaktioliuoksen happamuudesta. Tulokset viittasivat tutkittujen dioksaanianalogien olevan potentiaalisia rakenneyksiköjä DNA-templatoituun DCC-pohjaiseen oligomerisaatioon.

Asiasanat: nukleosidi, nukleotidi, nukleiinihappo, DNA, RNA, PNA nukleosidianalogi, katalyyysi, templaatti, polymerisaatio, supramolekulaarinen kemia, dynaaminen kombinatorinen kemia.



# Sisällysluettelo

## *Lyhenteet ja symbolit*

<b>KIRJALLINEN OSA: Nukleiinihappotemplatoitu oligomerisaatio .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Johdanto .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Aktivoidut nukleotidit .....</b>	<b>4</b>
2.1. Fosfodiesterisidos .....	4
2.2. Fosfodiesterisidoksen kinetiikkaa .....	6
2.3. Imidatsoli ja klassiset tutkimukset aktivoiduilla nukleotideilla.....	11
2.4. Modernia imidatsolipohjaista esiaktivaatiota.....	13
2.5. Nukleotidien aktivaatio in situ.....	16
<b>3. Dynaaminen kombinatorinen kemia nukleosidianalogeilla .....</b>	<b>19</b>
3.1. Reduktiivinen aminaatio 5'-amino-2'-deoksi-3'-(2-oksoetyyli)nukleosideilla .....	19
3.2. Peptidinukleiinihappo (PNA) .....	25
3.2.1. PNA ja polymerisaatio emäspaikkauksella.....	29
3.3. Fotoligaatio .....	32
3.4. Boronihappoanalokit.....	34
<b>4. Sovellukset .....</b>	<b>41</b>
4.1. Polymeerien ohjattu evoluutio .....	41
4.2. Synteettiset solut.....	45
<b>5. Yhteenveto ja päätelmät.....</b>	<b>47</b>



<b>KOKEELLINEN OSA: Nukleinihappotemplatoitu oligomerisaatio nukleosidien dioksaanianalogeilla....</b>	<b>49</b>
<b>1. Johdanto .....</b>	<b>50</b>
<b>2. Tulokset ja niiden tarkastelu .....</b>	<b>51</b>
2.1. Nukleosidijohdosten synteetit.....	51
2.2. Heteromolekulaariset ligaatioreaktiot.....	53
2.3. Kokeelliset menetelmät.....	54
2.3.1. Yleiset menetelmät .....	54
2.3.2. 5'-O-metyyliuridiinin NaO <sub>4</sub> -hapetus (2a, 2b) .....	54
2.3.3. 5'-O-metyyli-2',3'-seco-uridiini (3).....	55
2.3.4. (2R/S,3R,5R)-3-(metoksimetyyli)-2-hydroksi-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (4) .....	55
2.3.5. 2'- ja 3'-bentsoyyli-5'-O-metyyli-2',3'-seco-uridiini (11, 12) .....	56
2.3.6. 2'- ja 3'-bentsoyyli-5'-O-metyyli-2',3'-seco-uridiinin IBX-hapetus (13, 14) .....	57
2.3.7. (2R/S,3R,5R)-2-hydroksi-3-(metoksimetyyli)-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani ja (3R/S,3R,5R)-2-hydroksi-5-(metoksimetyyli)-3-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (4, 15) .....	58
2.3.8. 5'-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)-2',3'-seco-uridiini (6).....	58
2.3.9. (2R/S,3R,5R)-3-(4,4'-dimetoksitriptyylioksimetyyli)-2-hydroksi-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (7).....	59
2.3.10. (2R,3R,5R) 2-O-(tert-butyylidimetyylisilyyli)-3-(4,4'-dimetoksitriptyylioksimetyyli)-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (8).....	60
2.3.11. (2R,3R,5R) 2-O-(tert-butyylidimetyylisilyyli)-3-(hydroksimetyyli)-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (9) .....	61
2.3.12. Uridiinin dioksaanianalogin fosforamidiitti 10.....	61
2.3.13. Difunktionaalinen dimeeri DI1 .....	62
2.3.14. Oligonukleotidi 5'-GGT TGG U* (ON1) .....	63
2.3.15. Heteromolekulaaristen ligaatioreaktioiden seuranta.....	65
<b>3. Yhteenveto ja päätelmät.....</b>	<b>67</b>
<b>Viitteet.....</b>	<b>69</b>





## ***Lyhenteet ja symbolit***

1-MeIm	1-metyyli-imidatsoli
2-MeIm	2-metyyli-imidatsoli
Alm	2-aminoimidatsoli
dAON	5'-amino-2'-deoksi-3'-(2-oksoetyyli)nukleosidi
CD	sirkulaaridikroismispektrometria
DCC	dynaaminen kombinatorinen kemia
DCM	dikloorimetaani
DMF	dimetyyliformamidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DNA	2'-deoksiribonukleiinihappo
EDC	3-etyyli-1-(3-dimetyyliaminopropyli)- karbodi-imidihydrokloridi
ESI-MS	sähkösumutus-ionisaatiomassaspektrometria
1-EtIm	1-etyyli-imidatsoli
EtOAc	etyyliaetaatti
HEG	heksaetyleeniglykoli
HEPES	4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiinietaanisulfonihappo
Hp	hiuspinni
HPLC	korkean erotuskyvyn nestegromatografia
IBX	2-jodoksibentsoehappo
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LG	lähtevä ryhmä
MALDI	matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio
MeCN	asetonitriili
MeOH	metanoli
MS	massaspektrometria
NMR	ydinmagneettinen resonanssi (-spektroskopia)
OAt	atsabentsotriatsoyyli- <i>N</i> -oksi
PAGE	polyakriilamidigeelielektroforeesi
PNA	peptidinukleiinihappo
PCR	polymeraasiketjureaktio
RNA	ribonukleiinihappo
TBDMS	tert-butyylidimetyylisilyyli
TEAA	trietyyliammoniumasetatti
TOF	lentoaika-analysointilaitte
tPNA	tioesteripeptidinukleiinihappo
TREAT-HF	trietyyliammoniumtrihydrofluoridi
UV	ultravioletti-säteily

### **Nukleosidit ja nukleotidit:**

N	nukleosidi (A/C/G/T/U)
r	ribonukleosidi (etuliittinä rN tai rNMP)
d	2'-deoksiribonukleosidi (etuliittinä, dN tai dNMP)
A	adenosiini, adeniini (lihavoitu, <b>A</b> ) tai vastaava PNA-tähde (pienellä, a)
C	sytydiini, sytyosiini (lihavoitu, <b>C</b> ) tai vastaava PNA-tähde (pienellä, c)
G	guanosiini, guaniini (lihavoitu, <b>G</b> ) tai vastaava PNA-tähde (pienellä, g)
T	tymidiini, tymiini (lihavoitu, <b>T</b> ) tai vastaava PNA-tähde (pienellä, t)
U	uridiini tai urasiili (lihavoitu, <b>U</b> )
v	peptidinukleiinihapon tähde (a/c/g/t)
<b>B</b>	nukleoemäs (A/C/G/T/U)
NMP	nukleosidi-5'-monofosfaatti
NTP	nukleosidi-5'-trifosfaatti
<sup>v</sup> U	5-vinyyli-2'-deoksiuridiini
<sup>CV</sup> U	5-karboksivinyyli-2'-deoksiuridiini



**Aminohapot:**

Lys	lysiini
Phe	fenyylialaniini
Leu	leusiini
Gln	glutamiini
Glu	glutamiinihappo
Cys	kysteiini
Asp	asparagiinihappo
Arg	arginiini
Gly	glysiini



**KIRJALLINEN OSA:**

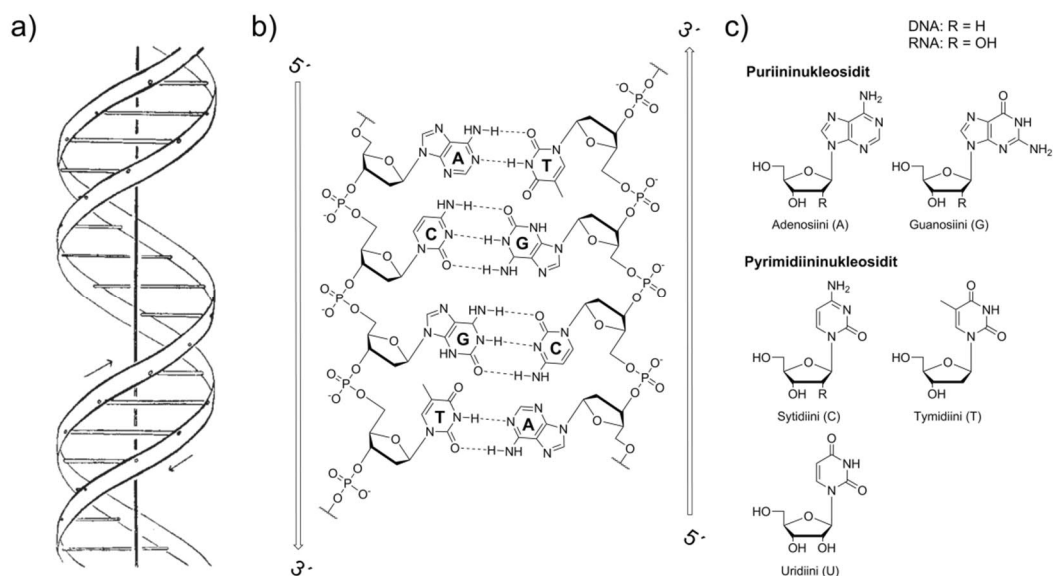
**Nukleinihappotemplatoitu oligomerisaatio**



# 1. Johdanto

Nukleiinihappoja (DNA ja RNA) esiintyy kaikissa elävissä olennoissa. Niiden merkitys elämälle perustuu informaation säilömiseen, siirtämiseen ja tämän tiedon käsittelyyn liittyviin katalyyttisiin prosesseihin. Koska nukleiinihapot ovat tuntemamme elämän välttämättömiä kemiallisia yhdisteitä, on niiden rakenteen ja toiminnan ymmärtäminen motivoinut tiedeyhteisöjä siitä saakka, kun sveitsiläinen lääkäri Friedrich Miescher saosti solun tumasta tuntemattoman yhdisteen vuonna 1868.<sup>1</sup> Kokeiden perusteella hän huomasi, että kyseessä ei ollut lipidi taikka proteiini. Hän antoi uudelle yhdisteelle nimen ”nuclein”, ja ehdotti sen liittyvän solun jakaantumiseen tarvittavien yhdisteiden biosynteesiin. Nukleiinihappojen matka tieteessä alkoi.

DNA:n kaksoiskierteisen rakenteen (Kuva 1a) selviäminen 1950-luvulla<sup>2</sup> on viime vuosisadan merkittävimpiä löytöjä biotieteiden saralla. Löytö on poikanut molekulaarisen biologian lähtökohdan: DNA koodaa RNA:n, joka taas koodaa proteiineja. Tämä yksinkertainen oletus on kuitenkin osoittautunut riittämättömäksi selittämään nukleiinihappojen biologista merkitystä, sillä niillä on havaittu olevan myös toiminnallisia ominaisuuksia, joista esimerkkejä ovat katalyyttiset ribotsyymit<sup>3</sup> sekä deoksiribotsyymit<sup>4</sup> ja geenejä vaimentava mikroRNA<sup>5</sup>. Nukleiinihappojen toiminnallisuus perustuu niiden kykyyn muodostaa proteiinien tapaan kaksoiskierrettäkin monimutkaisempia sekundääri-, tertiääri- ja kvaternäärirakenteita.<sup>6,7</sup> DNA:n sekä RNA:n rakenteet ja biokemiallinen merkitys ovat edelleen kiivaita tutkimuksen kohteita.



**Kuva 1** a)<sup>2</sup> Kahden toisiinsa hybridisoituneen DNA-juosteen kaksoiskierre kuten J. Watson ja F. Crick sen esittivät. b) Nukleotidien emäsosien väliset spesifiset vetysidokset, Watson–Crick-parit (AT ja GC), johtavat komplementaaristen DNA-juosteiden kaksoiskierteen muodostumiseen. c) DNA:n (dA, dG, dC, dT) ja RNA:n (rA, rG, rC, rU) nukleosidit. Kuva 1a on uudelleenjulkaistu kustantajan Springer Nature luvalla.

Nukleiinihappojen toiminta perustuu niiden itsejärjestäytymiseen ja kemialliseen tunnistukseen. Nukleosidien (Kuva 1c) emäsosat pinoutuvat vesiliuoksessa hydrofobisten vuorovaikutusten seurauksena. Nukleoemästen pooliset osat sen sijaan tunnistavat komplementaarisia emäksiä muodostamalla vetysidoksia (Kuva 1b). Tähän tunnistukseen perustuu DNA:n replikaatio. Replikaatiossa yksijuosteisen DNA:n, ”templaatin”, pohjalta rakennetaan komplementaarinen vastinjuoste. Tämä biokemiallinen prosessi on haaste, mikäli se halutaan toteuttaa ei-entsyymaattisesti. Ei-entsyymaattisesti toteutettu nukleiinihapon replikaatio on yksi ydinkysymyksiä prebioottisen maailman tutkimuksessa: miten ensimmäinen replikoituva geneettinen polymeeri syntyi ilman entsyymejä?<sup>8</sup>

Toinen esimerkki templatoidusta biokemiallisesta polymeerisynteesistä on proteiinisynteesi, jossa uusi aminohappotähde liitetään kasvavaan polypeptidiin tietyn trimeerisen RNA-sekvenssin 1. kodonin perusteella. Templatoituja polymerisaatioita käyttäen luonto on yltänyt äärimmäisen kompleksisiin kemiallisiin systeemeihin, mikä on herättänyt tutkijoissa kysymyksen, voisiko nukleiinihappoja käyttää katalyytteinä myös muiden polymeerien synteesissä.<sup>9-11</sup> Nukleiinihappotemplatoitu polymerisaatio on verrattain uusi tutkimusala, mutta sille on visioitu jo mahdollisuuksia mm. molekyylien ohjatussa evoluutiossa, missä luonnon monimutkaisia rakenteita tuottavaa prosessia pyritään jäljittelemään.<sup>12,13</sup>

Tässä tutkielmassa käsitellään lineaaristen polymeerien nukleiinihappotemplatoitua synteesiä. Ensimmäisessä luvussa tehdään katsaus kanonisten nukleotidien aktivaatioon ja ei-entsyymaattiseen replikaatioon. Toisen pääotsikon alla käsitellään nukleiinihappo-analogeja erityisesti dynaamisen kombinatorisen kemian<sup>14</sup> näkökulmasta. Lopuksi tarkastellaan lyhyesti nukleiinihappotemplatoidun polymerisaation sovelluksia.

## **2. Aktivoituneet nukleotidit**

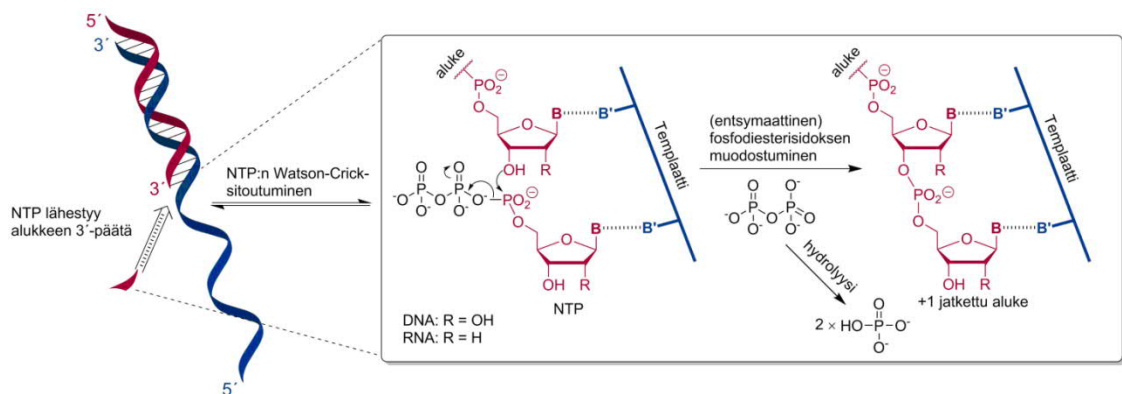
### **2.1. Fosfodiesterisidos**

DNA:ssa ja RNA:ssa esiintyvän fosfodiesterisidoksen muodostuminen on ilmeisin reaktio nukleiinihappotemplatoidun polymerisaation tutkimiseen. Biokemiallisessa DNA:n replikaatiossa uusi DNA-juoste rakennetaan DNA-templaatin emässekvenssin pohjalta. Replikaatio alkaa lyhyen DNA-juosteen, eli alukkeen, hybridisaatiolla templaatin 3'-päähän. Replikaatio etenee, kun DNA-polymeraasientsyymi liittyy alukkeen 3'-päähän uusia nukleotideja 3',5'-fosfodiesterisidoksin (Kaavio 1). Aluketta



jatketaan templaatille Watson–Crick-komplementaarisesti n. 50 nukleotidia sekunnissa (eukaryoottisolut).<sup>15</sup> Replikaatiota seuraavien tarkistus- ja korjausprotokollien jälkeen virheellisiä (ei-komplementaarisia) kytkentöjä on arvioitu jäävän vain kerran per miljardi kytkentää.<sup>16</sup>

8



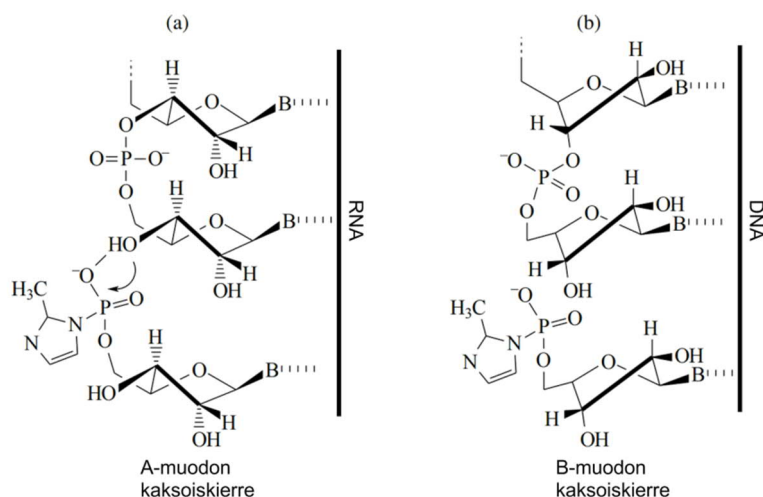
**Kaavio 1** 3',5'-fosfodiesterisidoksen muodostuminen nukleinihapon replikaatiossa.

DNA:n biokemiallisessa fosfodiesterifikaatiossa alukkeen 3'-OH hyökkää liitettävän nukleotidin 5'-fosfaattiin, ja korvaa lähtevänä ryhmänä olevan difosfaatin (Kaavio 1). Reaktion energiakynnykseen vaikuttaa läsnäolevat katalyytit sekä lähtevän ryhmän laatu. Tunnettuja katalyyttejä ovat jo mainitut entsyymit sekä templaatti, mutta myös divalentit kationit nopeuttavat fosfodiesterisidoksen muodostusta.<sup>17</sup> Biokemiallisessa (entsyymattisessa) fosfodiesterifikaatiossa alukkeeseen liitettävät nukleotidimonomeerit aktivoidaan 5'-trifosfaateiksi (NTP). Poistuva ryhmä on tällöin difosfaatti, jonka hydrolyysi fosfaateiksi energisoi alukkeenjatkoa.<sup>18,19</sup> Tämä aktivaatio ei ole kuitenkaan ilman entsyymejä riittävä, koska NTP hydrolysoituu nopeammin kuin jatkaa aluketta.<sup>20</sup> Vesi on luonnollisesti hankala ympäristö reaktiolle, joka perustuu hydroksyyli ryhmän (3'-OH) nukleofiiliseen hyökkäykseen. Lisää hankaluuksia ei-entsyymattisessa replikaatiossa kohdataan, kun DNA-aluke vaihdetaan RNA:ksi. Tällöin 3'-OH:n kanssa kilpailee 2'-OH, minkä vuoksi 3',5'-fosfodiesterisidosten spesifinen aikaansaaminen RNA-alukkeen pidennyksessä vaikeutuu.<sup>20</sup>

Alukkeen pituudella on suuri merkitys templatoidun fosfodiesterisidoksen muodostumisen nopeuteen. Hybridisoituneen alukkeen pituuden kasvaessa muuttuu templaatin overhang-osan konformaatio yhä lähemmäksi hybridisaatiossa vallitsevaa konformaatiota. Tämä esijärjestyminen helpottaa entropisesti uuden monomeerin liittoa alukkeeseen.<sup>17</sup> Ligaatiolle edullista esijärjestyymistä (sekä emäspinoutumista) saadaan aikaan myös templaatin overhang-asemaan sitoutuvilla ”avustavilla oligomeereilla”.<sup>21,22</sup> Lisäksi aktivoitujen oligomeerien liitto alukkeeseen on helpompaa

kuin monomeerien,<sup>23</sup> johtuen mitä ilmeisimmin suuremmasta kokonaisaffiniteetista templaattiin. Näiden syiden vuoksi replikaation toteuttaminen pelkillä aktivoituilla monomeereillä on erittäin haastavaa.

DNA- ja RNA-templaatit eroavat huomattavasti niiden kyvyssä katalysoida alukkeenjatkoa, mikä on seurausta niille ominaisten kaksoiskierteiden rakenteista. RNA–RNA ja DNA–RNA-kaksoiskierteet esiintyvät vesiliuoksessa tavanomaisesti A-kierteisessä muodossa, jolle on ominaista furanoosin 3'-*endo*-konformaatio. Sen sijaan DNA–DNA-kaksoiskierteet ottavat vedessä yleensä B-kierteisen muodon, jossa furanoosilla on 2'-*endo*-konformaatio. A-muodon kaksoiskierteessä furanoosin 3'-OH on paremmassa asemassa hyökätäkseen aktivoituneen monomeerin 5'-fosfaattiin kuin B-muodon 3'-OH, joka osoittaa enemmän dupleksin keskustaa kohti (Kuva 2). Tämän vuoksi RNA-templaatti katalysoi fosfodiesterisidoksen muodostumista huomattavasti paremmin kuin DNA-templaatti.<sup>24</sup>

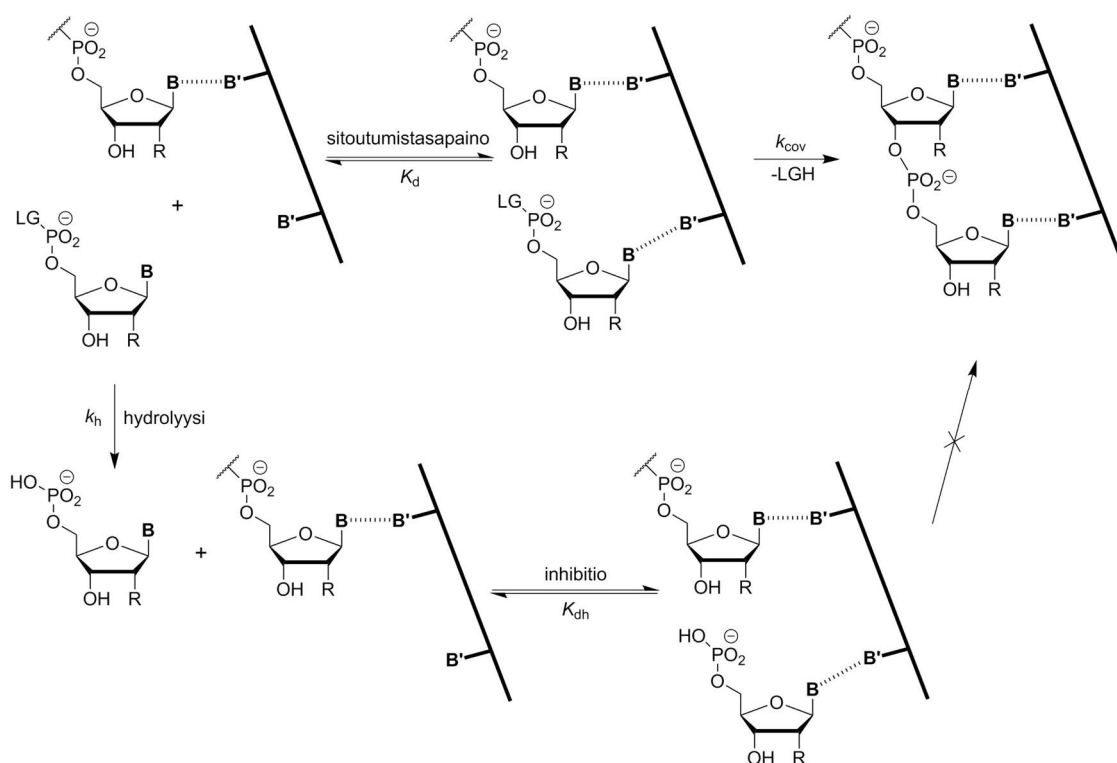


**Kuva 2** Alukkeen asema ligatoituvaa monomeeriä nähden (5'-fosfaatin lähtevänä ryhmänä 2'-metyyli-imidatsoli). a) RNA-templaatti. b) DNA-templaatti. Kuva uudelleenjulkaistu kustantajan Springer Nature luvalla.<sup>24</sup>

## 2.2. Fosfodiesterisidoksen kinetiikkaa

Luotettavan ja nopean nukleinihappojen replikaatiomenetelmän löytämiseksi, on prosessin kineettis-mekanististen tekijöiden ymmärtäminen olennaista. Tämän asian parissa ovat työskennelleet Richert kollegoineen, jotka ovat kehittäneet kvantitatiivisen mallin<sup>25</sup> 5'-fosfaatistaan aktivoitujen nukleotidien nukleinihappotemplatoidulle fosfodiesterisidoksen muodostumiselle (alukkeen pidennykselle). Tässä luvussa esitellään lyhyesti kvantitatiivinen malli, jolla onnistuttiin simuloimaan kokeellisten havaintojen kanssa täsmäviä alukkeen pidennyksen saantoja. Onnistunut mallinnus johti päätelmiin erilaisista menetelmistä, joilla tehokas luonnollisen nukleinihapon ei-entsymaattinen replikaatio voitaisiin toteuttaa.

Kvantitatiivisessa mallissa (Kaavio 2) oletetaan, että aktivoidun nukleotidimonomeerin on ensin hybridisoiduttava templaatin kanssa, minkä jälkeen alukkeen 3'-OH (tai 2'-OH) voi hyökätä aktivoituun 5'-fosfaattiin ja korvata lähtevän ryhmän (LG). Aktivoiduilla kanonisilla nukleotideilla viimeksi mainitun ligaatiiovaiheen ( $k_{cov}$ ) on havaittu olevan nopeutta rajoittava vaihe fosfodiesterisidoksen muodostumisessa. Aktivoidun nukleotidin efektiivisen konsentraation määrittämiseksi, on tunnettava sen dissosiaatiovakio ( $K_d$ ) templaatin suhteen. Näiden tekijöiden lisäksi alukkeen pidentymisen nopeuteen vaikuttaa myös aktivoidun nukleotidin spontaani hydrolyysi nukleosidimonofosfaatiksi (NMP). Hydrolyysi ei ainoastaan kuluta lähtöaineita, vaan myös inhiboi templaattikatalyysiä, sillä NMP kilpailee templaattihybridisaatiosta aktivoidun nukleotidin kanssa. Inhibitiotehon selvittämiseksi on tunnettava aktivoidun nukleotidin hydrolyysin nopeus ( $k_h$ ) sekä NMP:n dissosiaatiovakio ( $K_{dh}$ ) templaatin suhteen.<sup>25</sup>

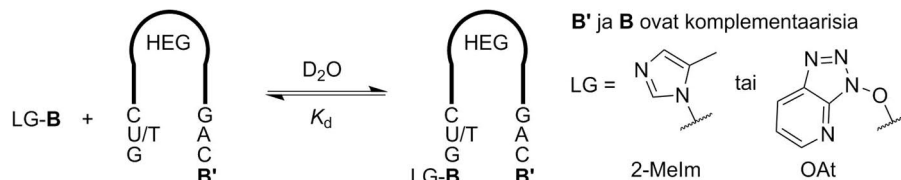


**Kaavio 2** Templatoidun alukkeenpidennyksen kvantitatiivisen mallin parametrit: aktivoidun nukleotidin dissosiaatiovakio ( $K_d$ ), hydrolyysin nopeus ( $k_h$ ), hydrolysoituneen nukleotidin dissosiaatiovakio ( $K_{dh}$ ) ja kovalenttisen ligaation nopeus ( $k_{cov}$ ).<sup>25</sup>

Richertin tutkimusryhmä määrittä <sup>31</sup>P NMR -spektroskopisesti hydrolyysin nopeudet kahdelle erilaiselle 5'-fosfaatistaan aktivoidulle monomeerityypille. Nukleotidimonomeerit aktivoitiin liittämällä 5'-fosfaatin lähteväksi ryhmäksi joko 2-metyyli-imidatsoli (2-MeIm) tai atsabentsotriatsoyyli-N-oksi (OAt) (Kaavio 3). 2-MeIm on kirjallisuudessa hyvin tunnettu, mutta OAt on tuottanut Richertin ryhmässä parempia

tuloksia<sup>26,27</sup> alukkeen pidennyksessä.<sup>25</sup> OAt-aktivoitujen deoksiribo- ja ribonukleotidimonomeerien hydrolyysireaktioiden puoliintumisajat olivat välillä 5–8 h, poikkeuksena nukleotidin OAt-dTMP 16 h puoliintumisaika.<sup>28,29</sup> 2-MeIm-deoksiribonukleotideilla hydrolyysien puoliintumisajat vaihtelivat välillä 19–29 h, kun taas 2-MeIm-ribonukleotideilla vaihtelu osui välille 53–63 h.<sup>30</sup> OAt-nukleotidien nopeampi hydrolyysi on sopusoinnussa sen kanssa, että ne myös jatkavat aluketta (reagoivat alkoholin kanssa) nopeammin.<sup>27</sup>

Aktivoitujen nukleotidien ja NMP:ien dissosioitumisvakiot ( $K_d$  ja  $K_{dh}$ ) määritettiin NMR-spektroskopisesti hiuspinnitemplaattilla<sup>31</sup>, jossa hiuspinnin lenkki koostui heksaetyleeniglykolista (HEG) helpommin tulkittavan NMR-spektrin saamiseksi (Kaavio 3). 2-MeIm-nukleotidit hybridisoituivat templaatin kanssa suunnilleen yhtä tehokkaasti kuin NMP:t.<sup>30</sup> Sen sijaan OAt-nukleotidien templaattiaffiniteetti kasvoi NMP:iin verrattuna kaikilla muilla paitsi OAt-dGMP-nukleotideilla. Suurimmillaan affiniteetin kasvu näkyi nukleotidien OAt-rTMP ja OAt-rUMP kohdalla, joiden templaattiaffiniteetti oli yli 3- ja 10-kertainen (mainitussa järjestyksessä) NMP-vastineisiinsa verrattuna. OAt vaikutti siis parantavan nimenomaan heikosti hybridisoituvien monomeerien sitoutumista templaattiin (ribonukleotidimonofosfaattien templaattiaffiniteetti karkeasti:  $rC > rG > rA > rU$ )<sup>32</sup>. Nukleosidimonofosfaateilla osoitettiin, että hybridisaation dissosioitumisvakio oli riippuvainen myös templaatin ja alukkeen sekvenssistä.<sup>29</sup>



**Kaavio 3** Aktivoitujen nukleotidien dissosiaatiovakion ( $K_d$ ) NMR-määrittämisessä käytetty heksaetyleeniglykolista (HEG) koostuva hiuspinnitemplaatti. Templaatin  $\text{B}'$  on Watson–Crick-komplementaarinen aktivoidun nukleotidin emäsosalle  $\text{B}$ .<sup>30</sup>

Kvantitatiivisen mallin (Kaavio 2) parametrit  $k_h$ ,  $K_d$  ja  $K_{dh}$  oli määritetty. Niiden ja havaittujen alukkeenjatkojen alkunopeuksien avulla voitiin laskea erilaisten aktivointimenetelmien ja templaattien tuottamat ligaatioreaktionopeudet  $k_{cov}$ . Aktivoitujen nukleotidien ligaatioreaktionopeudet RNA-templaattilla ja -alukkeella sijoittuivat  $0,01 \text{ h}^{-1}$  (2-MeIm-rAMP) ja  $0,1 \text{ h}^{-1}$  (OAt-rGMP) väliin. DNA-templaattitutkimuksissa alukkeen 3'-OH korvattiin aminoryhmällä (3'-NH<sub>2</sub>), koska deoksiriboosilla reaktio olisi liian hidas ja mittausvirhe siksi suuri (3'-aminoalukkeen ligaatiossa muodostuu fosfodiesterisidokselle isosteerinen fosforamidaatti. Menettely on yleisesti käytetty, kun ligaation toivotaan tapahtuvan nopeammin kuin kanoniseen 3'-

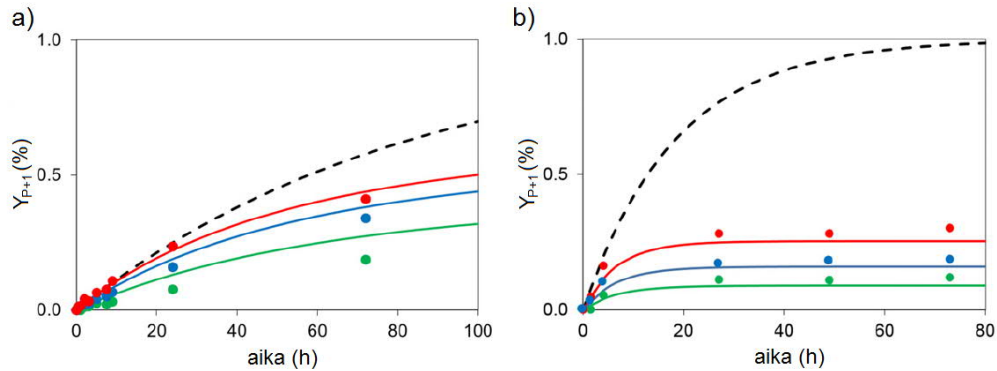
alukkeeseen.<sup>17</sup>). DNA-templaatilla ja 3'-amino-2'-deoksinukleotidialukkeella alukkeen jatkon nopeudet olivat 0,3 h<sup>-1</sup> (2-MeIm-dAMP) ja 10 h<sup>-1</sup> (OAt-dCMP) välillä. Yleisesti OAt-nukleotidit jatkoivat aluketta nopeammin,<sup>30</sup> mikä on odotettavissa myös niiden nopeamman hydrolysoitumisnopeuden perusteella.

Kaikkien neljän parametrin avulla alukkeen pidennyksen saannon ( $Y_{P+1}$ ) aikariippuvuutta mallinnettiin aktivoitujen nukleotidien eri pitoisuuksissa käyttäen kaavaa 1.<sup>29,30</sup> Mallinnus täsmäsi melko hyvin kokeellisten havaintojen kanssa (Kuva 3: RNA-aluke RNA-templaatilla ja Kuva 4: 3'-amino-2'-deoksialuke DNA-templaatilla). Hyvin täsmänneellä mallinnuksella simuloitiin alukkeen pidennyksen maksimaalista saantoa aktivoituneen nukleotidin konsentraation funktiona. Näistä simulaatioista kävi ilmi, että RNA-alukkeen kvantitatiivinen pidennys on vaikeaa pelkästään aktivoituneen nukleotidin konsentraatiota nostamalla (Kuva 5b).<sup>30</sup> Sen sijaan 3'-aminoryhmä DNA-alukkeessa mahdollistaa kvantitatiivisen alukkeen pidennyksen (Kuva 5a), koska aminoryhmän hydroksyyli-ryhmää suurempi nukleofilisyys nostaa reaktiota rajoittavan ligaatiovaiheen nopeutta ( $k_{cov}$ ).

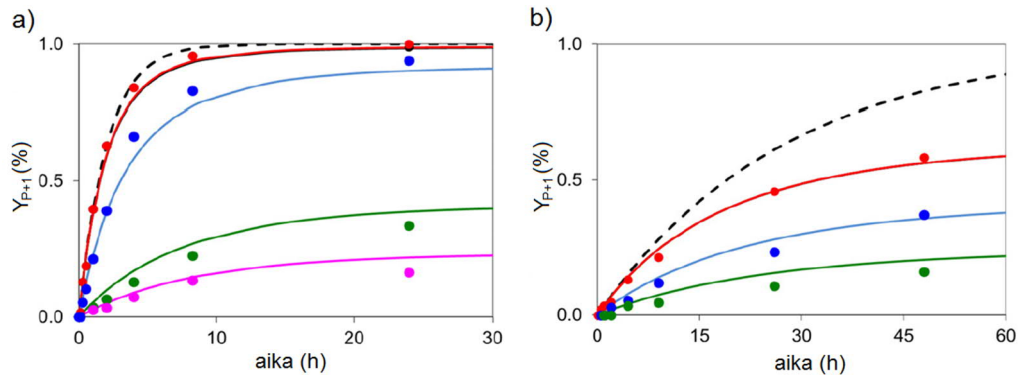
$$Y_{P+1}(t) = 1 - \exp \left[ \frac{-k_{cov}[M]_0}{K_d k_h B} \left( k_h t - \ln \left( \frac{B + Ae^{k_h t}}{B + A} \right) \right) \right] \quad (1)$$

jossa:

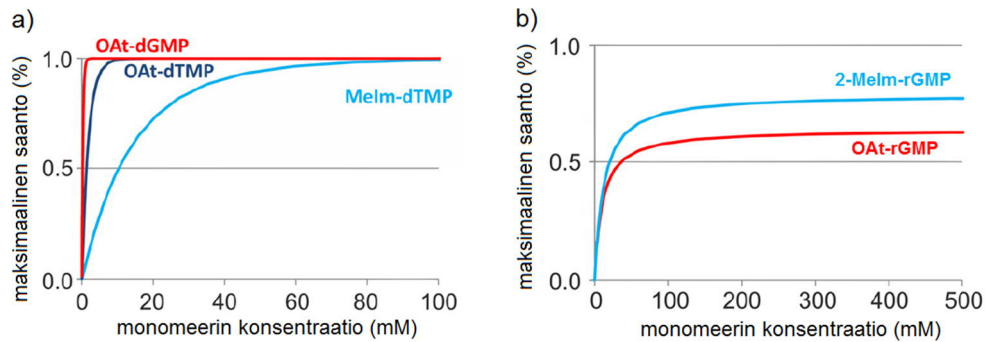
$$A = 1 + \frac{[M]_0}{K_{dh}} \quad \text{ja} \quad B = \left( \frac{1}{K_d} - \frac{1}{K_{dh}} \right) [M]_0 + \varepsilon \rightarrow 0.$$



**Kuva 3**<sup>30</sup> 3'-rC-alukkeen (36 μM) pidentämisen saannot ( $Y_{P+1}$ ) ajan funktiona RNA-templaatilla (36 μM) eri aktivoitujen nukleotidien konsentraatioilla (36 mM, 24 mM, 12 mM). Käyrät ovat peräisin kvantitatiivisen mallin simulaatioista (Kaava 1), kun taas pisteet merkitsevät kokeellisia havaintoja. Katkoviiva merkitsee simulaatiota, jossa hydrolyysiä ei ole huomioitu. a) 2-MeIm-rGMP,  $K_d = 23$  mM  $K_{dh} = 27$  mM,  $k_{cov} = 0,02$  h<sup>-1</sup>,  $k_h = 0,012$  h<sup>-1</sup>. b) OAt-rGMP,  $K_d = 11$  mM,  $K_{dh} = 35$  mM,  $k_{cov} = 0,095$  h<sup>-1</sup>,  $k_h = 0,0147$  h<sup>-1</sup>.<sup>30</sup> Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Oxford University Press luvalla.



**Kuva 4**<sup>30</sup> 3'-amino-dG-alukkeen (36  $\mu\text{M}$ ) pidentämisen saannot ( $Y_{P+1}$ ) ajan funktiona DNA-templaattilla (36  $\mu\text{M}$ ) eri aktivoitujen nukleotidien konsentraatioilla (3,6 mM, 1,8 mM, 0,36 mM, 0,18 mM). Käyrät ovat peräisin kvantitatiivisen mallin simulaatioista (Kaava 1), kun taas pisteet merkitsevät kokeellisia havaintoja. Katkoviiva merkitsee simulaatiota, jossa hydrolyysiä ei ole huomioitu. a) OAt-dAMP,  $K_d = 20 \text{ mM}$ ,  $K_{dh} = 38 \text{ mM}$ ,  $k_{cov} = 3,2 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_h = 0,109 \text{ h}^{-1}$ . b) 2-Melm-dAMP,  $K_d = 37 \text{ mM}$ ,  $K_{dh} = 38 \text{ mM}$ ,  $k_{cov} = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_h = 0,037 \text{ h}^{-1}$ .<sup>30</sup> Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Oxford University Press luvalla.



**Kuva 5** Mallinnus alukkeen pidentämisen maksimaalisesta saannosta aktivoitujen nukleotidin konsentraation funktiona. a) DNA-templaatti 3'-amino-G-alukkeella:  $K_d(\text{OAt-dGMP}) = 26 \text{ mM}$ ,  $K_{dh}(\text{dGMP}) = 27 \text{ mM}$ ;  $k_h = 0,093 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_{cov} = 8,6 \text{ h}^{-1}$ .  $K_d(\text{OAt-dTMP}) = 71 \text{ mM}$ ,  $K_{dh}(\text{dTMP}) = 241 \text{ mM}$ ;  $k_{cov} = 1,69 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_h = 0,044 \text{ h}^{-1}$ .  $K_d(2\text{-Melm-dTMP}) = 236 \text{ mM}$ ,  $K_{dh}(\text{dTMP}) = 241 \text{ mM}$ ;  $k_{cov} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_h = 0,024 \text{ h}^{-1}$ . b) RNA-templaatti 3'-C-alukkeella:  $K_d(2\text{-Melm-rGMP}) = 23 \text{ mM}$ ,  $K_{dh}(2\text{-Melm-rGMP}) = 27 \text{ mM}$ ;  $k_{cov} = 0,020 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_h = 0,013 \text{ h}^{-1}$ .  $K_d(\text{OAt-rGMP}) = 10 \text{ mM}$ ,  $K_{dh}(\text{OAt-rGMP}) = 11 \text{ mM}$ ;  $k_{cov} = 0,095 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_h = 0,013 \text{ h}^{-1}$ .<sup>30</sup> Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan Oxford University Press luvalla.

Kvantitatiivisella mallilla simuloitujen kuvaajien täsmävyys havaintojen kanssa vahvasti Richertin tutkimusryhmän hypoteesin alukkeen pidentämisen merkittävistä tekijöistä (Kaavio 2). Tämän pohjalta ehdotettiin,<sup>25</sup> että alukkeen kvantitatiiviseen pidentämiseen on neljä vaihtoehtoa: (i) *On käytettävä hyvin reaktiivista ja hyvin hybridisoituvaa monomeeriä.* Tämä on hankala ratkaisu, koska nukleotidit A, T ja U hybridisoituvat huonosti. Toisaalta, kuten OAt-nukleotideilla osoitettiin, aktivaatiomenetelmä voi tehostaa näiden hybridisaatiota. Ajatus hybridisaation tehostamisesta sopivalla lähtevällä ryhmällä ei ole siis mahdoton, mutta potentiaalisena ongelmana on heikentynyt spesifisyys. (ii) *Hydrolysoituneiden monomeerien poistaminen systeemistä.* Tämä on mahdollista, jos templaatti–aluke-kompleksi sidotaan kiinteään kantajaan.<sup>28</sup> Kiinteän kantajan käyttö ja huuhteluproseduurit rajoittavat kuitenkin menetelmän

sovellettavuutta. (iii) *Nukleotidien aktivointi in situ*. Aktivoimalla *in situ*, aktivoidut nukleotidit ovat tasapainossa NMP-vastineidensa kanssa. Tällöin hydrolyysi ei efektiivisesti kuluttaisi aktivoituja nukleotideja. (iv) *Käyttämällä 5'-fosfaatissa lähtevää ryhmää, joka reagoi nopeammin alukkeen pidennyksen kuin hydrolyysin suhteen* (eli suurentamalla suhdetta  $k_{cov} / k_h$ ). Tämä olisi potentiaalisesti atomitehokkain ratkaisu (ii–iv), mutta toteutus on vaikeaa, koska alkoholien (alukkeen 3'-OH) nukleofiilisyyden on useimmiten samaa luokkaa veden kanssa. Seuraavissa luvuissa käsitellään esimerkkejä saavutuksista vaihtoehtojen (iii) ja (iv) suhteen.

### 2.3. Imidatsoli ja klassiset tutkimukset aktivoiduilla nukleotideilla

Naylor ja Ginham demonstroivat tiettävästi ensimmäiset nukleinihappotemplatoidut ligaatiot vuonna 1966.<sup>33</sup> Tutkimuksissaan he liittivät kaksi dT<sub>6</sub>-oligonukleotidia toisiinsa dA<sub>12</sub>-templaatin katalysoimana. Oligonukleotidit dT<sub>6</sub> aktivoitiin *in situ* vesiliukoisella karbodiimidillä. Lisäksi he yrittivät dimerisoida myös lyhyempiä dT-oligomeerejä toisiinsa, mutta huomasivat saannon heikkenevän nopeasti oligomeerin pituuden lyhentyessä (dimerisaatioiden saannot: dT<sub>6</sub> 5 %, dT<sub>5</sub> 3 %, lyhyemmillä ei ligaatioita havaittu lainkaan). Spesifisen templaatin katalyysiteho osoitettiin samassa laboratoriossa myös *in situ* -aktivoitujen monomeerien oligomerisaatioissa,<sup>23,34</sup> mutta reaktiot olivat hitaita ja vaativat suuria määriä karbodiimidiaktivaattoria.<sup>35</sup>

Orgel kollegoineen ehdotti, että nukleotidin 5'-fosfaatti voitaisiin esiaktivoida kiinnittämällä siihen imidatsoli, joka toimisi lähtevänä ryhmänä fosfodiesterisidoksen muodostumisessa. Orgelin tutkimusryhmä raportoi adensiinin 5'-fosfaattiimidatsolidimonomeerien ligaatioista poly-rU-templaatin katalysoimana.<sup>35</sup> Reaktioajat olivat pitkiä (kaksi viikkoa), ja ligaatiot jäivät enimmäkseen dimeerisoitumiseen (29–43 %), vaikkakin myös trimeerejä havaittiin (1,0–2,8 %). Kontrollikokeet ilman templaattia osoittivat templaatin katalyyttisen merkityksen selkeästi. Ongelmana imidatsolidien oligomerisaatioissa oli kuitenkin ligaatioiden hitaus, heikko saanto sekä huono regioselektiivisyys, sillä ligatoituineissa ribonukleotideissa ilmeni 2',5'-, 3',5'- ja 5',5'-fosfodiesterisidoksia.<sup>20,35</sup>

Myöhemmin Orgel ja kollegat onnistuivat oligomerisoimaan guanosiinin 5'-fosfaattiimidatsolidimonomeerejä pisimmillään 35 nukleotidin mittaisiksi ketjuiksi (rG<sub>35</sub>) poly-rC-templaatin ja Pb<sup>2+</sup>-ionien katalysoimana.<sup>36</sup> Ilman templaattia oligomeerien pituudet jäivät kahdeksaan nukleotidiin (rG<sub>8</sub>). Tutkimusryhmän työ teki selväksi, että templaattipohjainen polymerisaatio ilman entsyymejä on saavutettavissa. Samalla osoitettiin divalenttien kationien kykyä katalysoida ja ohjata RNA:n ei-

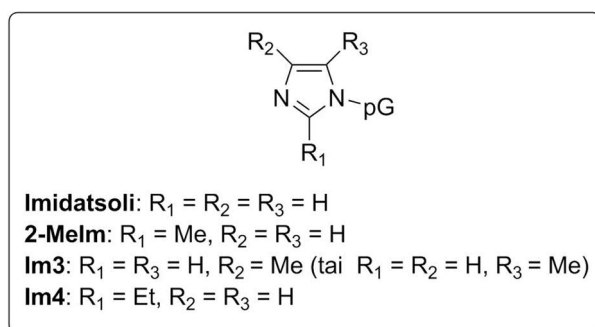
entsyymaattista replikaatiota. Tutkimuksessa havaittiin, että siinä missä  $Zn^{2+}$  indusoi 3',5'-fosfodiesterisidosten muodostumista, syntyi  $Pb^{2+}$ -ionien läsnäollessa pääasiassa 2',5'-fosfaattisiltoja nukleotidien välille.

Koska imidatsoli vaikutti lupaavalta lähtevältä ryhmältä, mutta tuotti pitkiä oligomeerejä hyvällä regioselektiivisyydellä vain  $Zn^{2+}$ - tai  $Pb^{2+}$ -ionien läsnäollessa, lähti Orgelin tutkimusryhmä tutkimaan imidatsolin läheisten analogien käytettävyyttä nukleotidien esiaktivoinnissa. Inoue ja Orgel tutkivat imidatsolin alkyloituja analogeja (Kuva 6) rGMP:n 5'-fosfaatin lähtevänä ryhmänä poly-rC-templatoituissa oligomerisaatioissa.<sup>37</sup> He havaitsivat 2-metyyli-imidatsolin (2-MeIm) tuottavan merkittävästi paremman saannon (89 %), kuin substituomaton imidatsoli (39 %) (Taulukko 1). Lisäksi guanosiinin 5'-fosfaatti-2-metyyli-imidatsolidit (2-MeIm-rG) oligomerisoituivat templaattikatalyysin avulla pidemmiksi, jopa 50-meereiksi ja pääasiassa 3',5'-fosfodiesterisidoksin.

**Taulukko 1** rGMP-nukleotidien oligomeerien saannot (tetrameerit ja sitä pidemmät) erilaisilla imidatsolijohdoksilla 5'-fosfaatin (Kuva 6) lähtevänä ryhmänä.<sup>37</sup>

c(rGMP) / M	Imidatsoli	2-MeIm	Im3	Im4
0,0125	13	46	6	9
0,025	32	74	23	20
0,05	39	89	45	34
0,05 <sup>b</sup>	0	0	0	0

<sup>a</sup> 2,6-lutidiini-HNO<sub>3</sub>-puskuriliuos (pH 7,0), NaNO<sub>3</sub> (0,4 M), Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,8 M). Nukleotidin imidatsolijohdoksen ja poly-CMP-templaatin suhde 1:2. Reaktioaika 14 päivää 0 °C:n lämpötilassa. <sup>b</sup> Ilman templaattia.

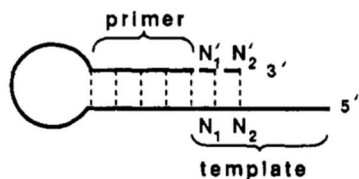


**Kuva 6** Imidatsolin alkyloidut analogit.<sup>37</sup>

Parantunut oligomerisointitehokkuus oli erikoinen tulos, sillä 2-MeIm-nukleotidien (tarkoittaen NMP:tä, jossa 5'-fosfaatin lähtevänä ryhmänä on 2-MeIm) hydrolyysi on hitaampaa kuin heikommin oligomerisaatiota katalysoineiden imidatsoli- tai 4-metyyli-imidatsoli-nukleotidien.<sup>38</sup> Orgel ja Wu päättelivät 2-MeIm:n katalyysitehon liittyvän mekanismiin (viereisen nukleotidin katalyysi), jossa alukkeeseen ligatoituvan 2-MeIm-nukleotidin (+1-nukleotidi) alavirran puolelle



hybridisoitua toinen 2-MeIm-nukleotidi (+2-nukleotidi) kykeni katalysoimaan ligaatiota (Kuva 7), kun taas alavirran puoleinen +2-imidatsolidinukleotidi ei katalysoinut.<sup>39</sup>



**Kuva 7** Alukkeeseen ligatoituvan +1-nukleotidin ( $N_1'$ ) viereen hybridisoitua +2 nukleotidi ( $N_2'$ ) katalysoi (2-MeIm) tai ei katalysoi (imidatsoli) ligaatiota +2-nukleotidin 5'-fosfaatin lähtevästä ryhmästä riippuen. Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.<sup>39</sup>

Lupaavan esiaktivaatiomenetelmän löydyttyä, Orgel kollegoineen selvitti 2-MeIm-nukleotidien käytettävyyden heterosekvenssisen RNA:n replikaatiossa. 2-MeIm-nukleotideilla onnistuttiin replikoimaan useita C-sekvenssejä, joissa oli tyypillisesti A-, T- tai G-tähteitä kolmen C-tähteen välein. Vuoteen 1995 mennessä pisin monomeereillä replikoitu heterosekvenssi oli 14-meerinen 5'-r(CCC GCC CGC CCG CC)-3', kuitenkin vain 2 %:n saannolla.<sup>40,41</sup> Replikaation onnistuminen oli edelleen hyvin sekvenssi-riippuvaista, joista mainittavimpana ongelmana olivat pitkät A-sekvenssit templaattissa, jotka estivät nukleiinihappojen replikaation tyystin.<sup>24</sup> Replikoitumistuotteiden pituutta oli myös vaikea ennustaa, kuten esim. dC<sub>10</sub>-templaattilla saatiin tuoteseos dG-dimeereistä dG-oktameereihin.<sup>42</sup> Stutz ja Richert kvantitoivat replikaaton spesifisyyden 2-MeIm-nukleotideilla.<sup>43</sup> He saivat viitteitä siitä, että DNA-templatoidussa G:C-replikaatiossa virheellisen emäksen mahdollisuus oli 30 % ja A:T-replikaatioissa jopa 50 %.<sup>44</sup> Nämä tulokset osoittivat esiaktivoitujen 2-MeIm-nukleotidien olevan riittämättömiä luotettavaan nukleiinihapon replikointiin monomeerejä käyttäen, ja siten päättivät ensimmäisen aikakauden nukleiinihappotemplatoitun polymerisaation tutkimuksissa.

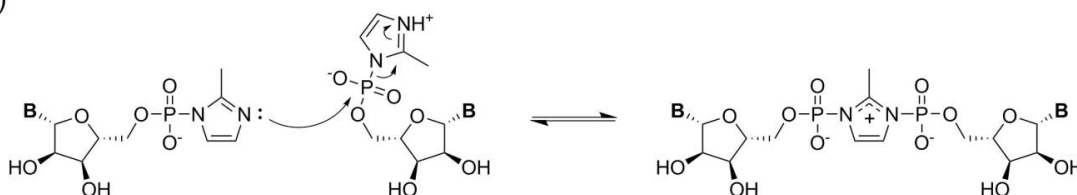
## 2.4. Modernia imidatsolipohjaista esiaktivaatiota

Orgelin tutkimusryhmän 90-luvulla esittämä hypoteesi viereisen 2-MeIm-nukleotidin katalyysistä herätti vuosikymmeniä myöhemmin mielenkiinnon tutkijoiden keskuudessa. Vuonna 2016 Walton ja Szostak saivat viitteitä ilmiön mekanismista. He esittivät, että kaksi vierekkäistä 2-MeIm-nukleotidia muodostavat imidatsolisilloitetun dimeerin (Kaavio 4), joka on reaktiivisempi kuin primäärinen 2-MeIm-katalyyysi.<sup>45</sup> Myös Richertin tutkimusryhmä sai samoihin aikoihin havaintoja tämän imidatsolisilloitetun dimeerin olemassaolosta, ja he laskivat sen ligatoituvan alukkeeseen n. 600-kertaa nopeammin kuin 2-MeIm-nukleotidi.<sup>30</sup> Szostakin ryhmä suunnitteli tämän

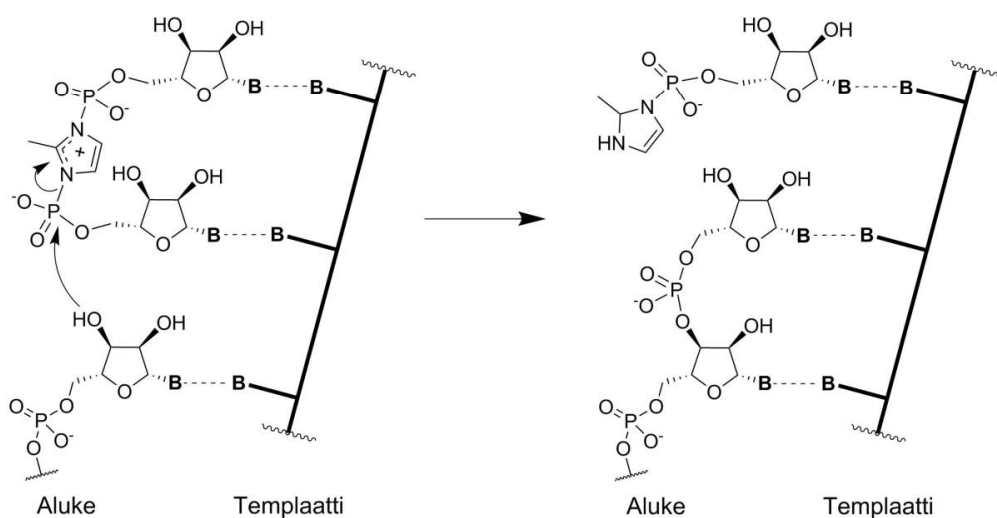
katalysimekanismin pohjalta joukon imidatsolianalogeja (Kuva 8 **1a–k**), joita koejärjestelyissä käytettiin RNA-alukkeeseen ligatoituvan 2-MeIm-nukleotidin (+1-nukleotidi) viereisenä (alavirran puoleisena) nukleotidina (+2-nukleotidi).<sup>46</sup>

Havaittujen reaktionopeuksien (Kuva 8) perusteella pääteltiin,<sup>46</sup> että metyyliä suurempi substituentti imidatsolin 2-asemassa heikensi viereisen +2-nukleotidin katalyysitehoa (vrt. Kuva 8 **1a** vs. **1b–d**). Katalyysiteho oli myös jossain määrin verrannollinen imidatsolianalogin  $pK_a$ -arvoon. Ehkäpä mielenkiintoisimmat havainnot olivat ne, että 1-aseman tyyppien vaihtaminen hiileen poisti katalyysitehon (**1i**), kun taas 2-metyylin vaihtaminen aminoryhmäksi nosti tehoa merkittävästi (**1j**). Nämä olivat vahvoja viitteitä sekundaarisen imidatsoliumsilloitetun dimeeriaktivaation tueksi, sillä 2-aseman aminoryhmä tekee 3-aseman tyyppien nukleofiilisemmäksi, ja toisaalta 1-aseman tyyppien vaihtaminen hiileen osoittaa viereisen nukleotidin lähtevän ryhmän merkityksen. +2-nukleotidin lähtevän ryhmän nukleofiilisyyttä ja ”lähtevyyttä” ovat molemmat tärkeitä tekijöitä katalyysissä, koska imidatsoliumsilloitettu dimeeri voi muodostua +1-nukleotidin hyökkäyksestä +2-nukleotidin fosfaattiin, tai vaihtoehtoisesti toisinpäin (+2-nukleotidin hyökkäys +1-nukleotidin fosfaattiin).

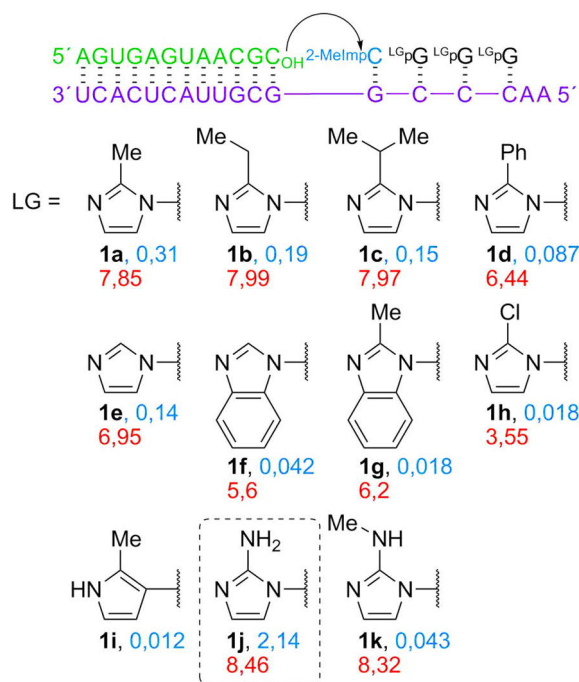
a)



b)

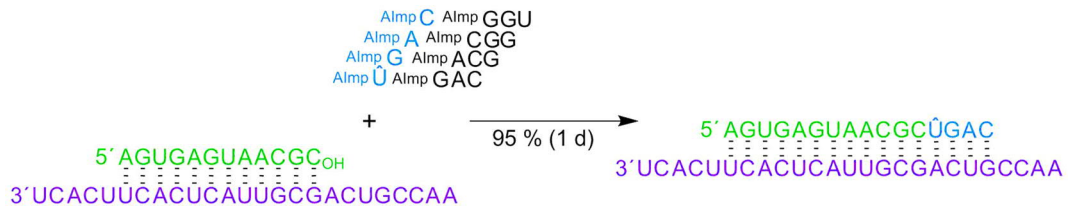


**Kaavio 4** a) Imidatsolisilloitetun dimeerin muodostuminen. b) +2-nukleotidi katalysoi +1-nukleotidin ligaatiota alukkeeseen imidatsolisilloitetulla dimeerillä.<sup>45</sup>



**Kuva 8** RNA-alkueen RNA-templatoitun pidennyksen (+1) koejärjestely ja siinä tutkitut +2-nukleotidin 5'-fosfaatin lähtevien ryhmien imidatsolianalogit. Imidatsolianalogien tuottamat reaktionopeudet (h<sup>-1</sup>) on kirjoitettu sinisellä ja pK<sub>a</sub> punaisella. Ylivoimaisesti nopeimman reaktion aikaansaanut 2-aminoimidatsoli (AIm) on merkitty katkoviivoin. Reaktioiden olosuhteet: templaatti 5 μM, aluke 1,5 μM ja nukleotidimonomeeri 20 mM.<sup>46</sup>

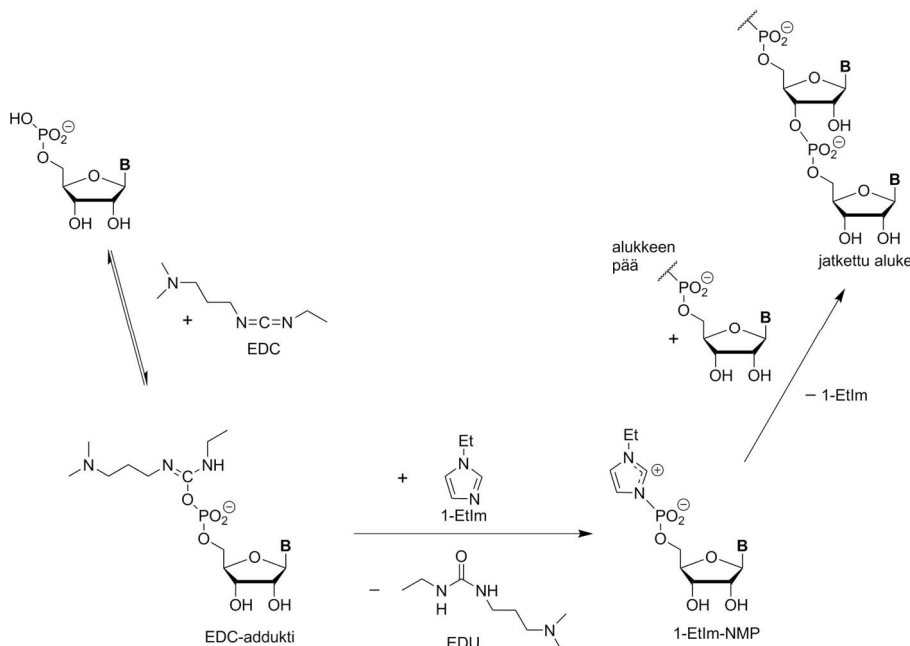
Oli osoitettu, että 2-aminoimidatsoli (AIm) oli tehokkain katalyytti +2-nukleotidin lähtevänä ryhmänä. Seuraavaksi sen tehoa tutkittiin RNA:n monomeerivaiheittaisessa replikaatiossa +1-nukleotidin lähtevänä ryhmänä.<sup>46</sup> Trimeerisiä replikaatiotuotteita koodaavilla templaateilla AIm-nukleotidimonomeerit ligatoituivat alukkeeseen 6–100 kertaa nopeammin (templaateista riippuen) kuin 2-MeIm-nukleotidit. Alukkeen pidennystä tutkittiin myös katalyyttisten +2-AIm-trimeerien avustamana (Kaavio 5). Vuorokauden reaktioajan jälkeen heterosekvenssiä +4-pidennyksiä oli muodostunut 95 % saannolla (lisäksi jopa +7-pidennyksiä havaittiin). AIm-trimeerien avustamana AIm-nukleotidimonomeereilla replikoitiin 5'-r(AUGAGGC)- sekä 5'-r(UAGC)-sekvenssit yli 85 % saannolla (vuorokauden reaktioaika, yksittäisen ligation saanto 97–98 %), jotka sisälsivät 2-MeIm-nukleotideilla mahdottomina pidettyjä r(AU)- sekä r(UA)-sekvenssejä. AIm-trimeerin avustamassa reaktiossa aluketta kyettiin myös jatkamaan r(UU)-sekvenssillä 92 % kokonaissaannolla, kun taas 2-MeIm-nukleotidimonomeereilla ollaan saavutettu tässä systeemissä vain 10 % saanto.<sup>47</sup> Lisäksi AIm-nukleotidit liittyivät alukkeeseen regiospesifisesti 3',5'-fosfodiesterisidoksin. Näiden tutkimusten perusteella AIm on tehokkain tänä päivänä löydetty lähtevä ryhmä RNA:n ei-entsymaattisessa replikaatiossa. Szostakin ryhmä jatkaa parhaillaan (2017) tutkimuksia, kartoittaen tarkemmin AIm-nukleotidien käytettävyyttä erilaisilla RNA-templaateilla.<sup>48</sup>



**Kaavio 5** RNA-alkkeen jatkaminen AIm-trimeerien katalysoimana; sekvenssin 5'-r(GUCA) replikaatio. Kaaviossa on RNA-templaatti (violetti), RNA-alue (vihreä), avustavat AIm-trimeerit (musta) ja AIm-nukleotidimonomeerit (sininen). Ū tarkoittaa 2-tiouridiinia.

## 2.5. Nukleotidien aktivaatio *in situ*

Nukleotidien aktivaatio *in situ* perustuu ideaan, että nukleotidimonofosfaatit olisivat tasapainossa niiden aktivoituneen muodon kanssa. Tällöin oligomerisaatioon on tarjolla vakaa määrä lähtöaineita hydrolyysistä huolimatta, kunhan vain aktivaattori ei loppu kesken. Nukleotidien *in situ* -aktivaatio ei ole uusi idea; käyttivätään jo Naylor ja Ginhm ensimmäisessä DNA-templatoitussa oligomeerien dimerisaatiossa 1-(3-dimetyyliaminopropyli)-3-etyylikarbodiimidihydrokloridia (EDC),<sup>33</sup> ja hieman myöhemmin Sulston ryhmäneen demonstroi samaa aktivaattoria käyttäen nukleotidimonomeerien di- ja trimerisaatiot.<sup>34</sup> Reaktiot olivat kuitenkin hitaita, ja saanto sekä regioselektiivisyys heikkoja. Eräs haaste *in situ* -karbodiimidiaktivoitussa alukkeenjatkossa on optimaalisten olosuhteiden ortogonaalisuus aktivaatiolle ja alukkeenjatkolle. Aktivointi karbodiimidillä etenee parhaiten lievästi happamissa olosuhteissa, mutta hyvällä lähtevällä ryhmällä substituoitu fosfaatti ligatoituu paremmin emäksisissä oloissa. Lisäksi elektrofiilinen aktivaattori on omiaan aiheuttamaan sivureaktioita alukkeessa.<sup>25</sup>



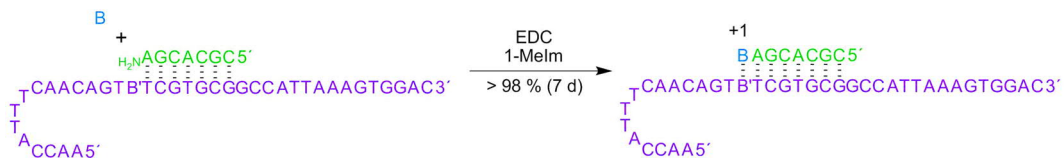
**Kaavio 6** Richertin tutkimusryhmän ehdottama *in situ* aktivaation (EDC) ja organokatalyyysin (1-EtIm) mekanismi.<sup>49</sup>

*In situ* -aktivoidun replikaation regioselektiivisyyttä ja saantoa on parannettu alukkeen 3'-aminosubstituutioilla.<sup>50,51</sup> Röthlingshöfer ja Richert ovat kuitenkin todenneet, että oligomerisaatio *in situ* -aktivaatiolla on ollut tehotonta ja sekvenssiriippuvaista. Vuonna 2010 he tarttuivat ongelmaan, ja testasivat useita heterosyklisiä katalyyttejä EDC-aktivoidussa DNA-templatoidussa 3'-amino-2'-deoksialukkeen jatkamisessa (ehdotettu aktivaation ja katalyyysin mekanismi: Kaavio 6). Erityisesti 1-etyyli-imidatsoli (1-EtIm) ja 1-metyyli-imidatsoli (1-MeIm) osoittautuivat tehokkaiksi katalyyteiksi.<sup>49</sup>

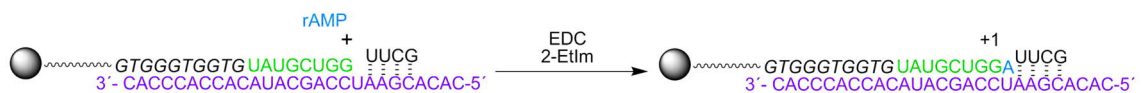
Olosuhteilla oli suuri merkitys. Alukkeenjatkon saanto ja nopeus olivat suoraan verrannollisia EDC:n konsentraatioon (50–400 mM). Katalyytin konsentraatiolla ja reaktioliuoksen happamuudella oli optimikohta. 1-MeIm-katalyytillä alukkeenjatko-reaktio eteni 80 mM katalyyttikonsentraatiolla pH:ssa 7,0.<sup>49</sup> Parhaaksi puskuriksi osoittautui HEPES. Puskurina myös 2,6-lutidiini tuotti hyviä saantoja, mutta reaktio oli kaksi kertaa hitaampi. Lämpötilan laskeminen (25–10 °C) hidasti reaktiota, mutta kasvatti saantoa. Reaktion hidastuminen johtuu EDC-aktivaation hidastumisesta, kun taas saannon kasvu on selitettävissä monomeerien hybridisoitumisen tehostumisella, jolloin alukkeen sivureaktiot vaikeutuvat (sivureaktioina tutkimuksessa havaittiin 3'-aminoalukkeen asetylaatio ja guanidinium-adduktien muodostuminen EDC:n kanssa). Mg<sup>2+</sup>-pitoisuuden laskeminen (80–0 mM) nopeutti reaktiota ja heikensi saantoa pienellä EDC-pitoisuudella (100 mM), mutta suuremmalla EDC-pitoisuudella (400 mM) vaikutus saantoon oli päinvastainen. Tämä viittaa Mg<sup>2+</sup>-ionien heikentävän monomeerien EDC-aktivaatiota, mutta tehostavan alukkeen ligatoitumista aktivoituun monomeeriin.<sup>49</sup> Divalenttisten kationien ja lämpötilan vaikutukset reaktion kulkuun ilmentävät optimaalisten olosuhteiden ortogonaalisuutta *in situ* -aktivaatiossa ja alukkeen pidennyksessä.

Optimoiduissa olosuhteissa kaikilla neljällä monomeerilla (dAMP, dCMP, dGMP tai dTMP; 0,5 mM) saavutettiin 3'-aminoalukkeen Hp-DNA-templatoiduissa (0,01 mM) +1-pidennyksissä > 98 % saannot (viikon reaktioaika, 1-MeIm-katalyytti) (Kaavio 7), mutta monomeerin konsentraation ollessa 0,01 mM, jäivät saannot < 10 %:iin (kahden viikon reaktioaika). Alukkeenjatkon spesifisyys testattiin liuottamalla reaktioliuokseen kaikkia neljää monomeeria samanaikaisesti (0,5 mM), jolloin alukkeenjatko oli Watson–Crick-parin mukainen 97 %:ssa tapauksista.<sup>49</sup> Pienellä monomeerikonsentraatiolla saavutettiin siis lähes kvantitatiivisia ja melko spesifisiä 3'-amino-2'-deoksialukkeen pidennyksiä, kun käytettiin *in situ* EDC-aktivaatiota ja 1-MeIm-katalyyttiä.

DNA-templatoitujen 3'-aminoalukeligaatioiden jälkeen Richterin tutkimusryhmä testasi *in situ* -aktivaation soveltuvuutta RNA:n replikoimiseen (RNA-templatoitu RNA-alukkeen pidennys).<sup>52</sup> RNA:n replikaatiossa 1-EtIm-katalyytin havaittiin olevan tehokkaampi kuin 1-MeIm-katalyytti. RNA-aluketta pidennettiin (+1) *in situ* -EDC-aktivaatiolla monomeereillä rGMP, rCMP ja rUMP, joista huonoiten menestynyt rUMP tuotti sekkin 92 % saannon viiden päivän reaktioajalla (1-EtIm, 0 °C). Sen sijaan rAMP-monomeerit reagoivat +1-pidennysten lisäksi ei-templatoituissa reaktioissa oligoadenylaateiksi. Tämä epäspesifinen oligomerisaatio häiritsi templatoitujen +1-pidennysten saannon määritystä. Spesifisen saannon määrittämiseksi RNA-templaatti kiinnitettiin kiinteään kantajaan, jolloin aluke-templaattikompleksit voitiin erotella epäspesifisesti muodostuneista oligoadenylaateista. Lisäksi käytettiin templaatin overhang-asemaan sitoutuvaa avustavaa RNA-oligomeeriä, joka nopeutti alukkeen pidennystä,<sup>26</sup> mutta toisaalta esti yli +1 alukkeen pidennykset (Kaavio 8). Nyt rAMP:lla saavutettiin lähes kvantitatiivinen alukkeen pidennys viikon reaktioajalla (0 °C). Koe toistettiin kolmella muullakin monomeerillä (rCMP, rGMP ja rUMP), jotka ligatoituivat alukkeeseen myös hyvin, kuten aiempien kokeiden perusteella oli odotettavissakin.<sup>52</sup>



**Kaavio 7** 3'-amino-2'-deoksialukkeenjatko *in situ* -aktivaatiolla ja 1-MeIm-katalyytillä. Kuvassa on Hp-DNA-templaatti (violetti, 0,01 mM), 3'-amino-2'-deoksialuke (vihreä, 0,01 mM) ja nukleotidimonomeeri (dAMP/dCMP/dGMP/dTMP, sininen, 0,5 mM).<sup>49</sup>



**Kaavio 8** Alukkeen pidennys monofosfaatinukleotidilla rA kiinteään kantajaan sidotulla RNA-templaatin ja overhang-aseman avustavan RNA-oligomeerin (UUCG) katalysoimana. Templaatti-alue-kompleksin magneettiseen kantajaan sitova sekvenssi on kursivoitu. Kuvassa on templaatti (violetti), aluke (vihreä), sekvenssi joka sitoo templaatin kantajaan (kursivoitu musta), avustava sekvenssi (musta) ja rAMP (sininen). Optimaalisen puskuriliuoksen koostumus oli 0,8 M EDC, 0,15 M 1-EtIm, 0,08 M MgCl<sub>2</sub> ja 0,5 M HEPES (pH 7,5).<sup>52</sup>

Yllättäen havaittua ei-templatoitua oligomerisaatiota tutkittiin vielä tarkemmin. Monomeerien annettiin reagoida viikon ajan ilman templaattia lämpötilassa 0 °C, jolloin 90 % rAMP-, 75 % rCMP- ja 60 % rUMP-monomeereista (150 mM) olivat oligomerisoituneet eri pituisiksi ketjuiksi.<sup>52</sup> Myös rGMP-monomeerien muodostamat oligoguanylaatit havaittiin selkeästi, mutta oligomerisaatiota ei kyetty kvantitoimaan. Kun rAMP-monomeerit olivat reagoineet kuukauden ajan, ne olivat muodostaneet pisimmillään yhdeksän tähteen pituisia oligomeerejä. Richterin ja kollegoiden *in situ* -

aktivaatiotutkimukset osoittivat, että samanlainen kemiallinen ympäristö voi tuottaa ei-templatoidusti oligomeerejä, ja muodostuneet oligomeerit nopeuttavat niille komplementaarista oligomerisaatiota.<sup>52</sup> Tämä on erittäin mielenkiintoista prebioottisen maailman tutkimuksen kannalta, sillä se on johtolanka siihen, miten ensimmäinen geeni ja sen replikaatio on voinut tapahtua (huomioiden kuitenkin, että EDC:n läsnäolosta prebioottisessa maailmassa ei ole viitteitä).

### **3. Dynaaminen kombinatorinen kemia nukleosidianalogeilla**

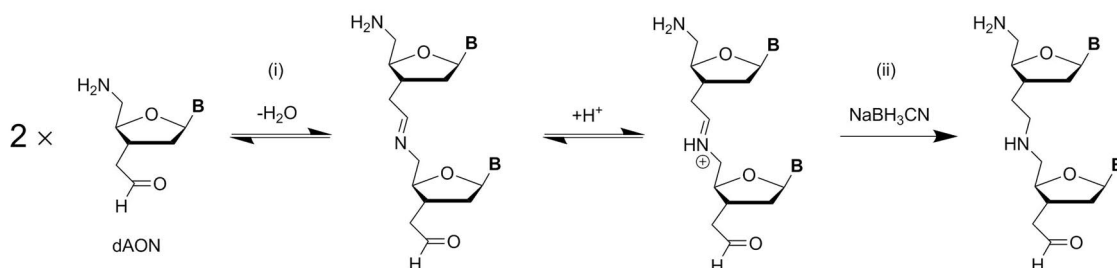
Dynaaminen kombinatorinen kemia (DCC) on konsepti, jossa supramolekulaarinen järjestäytyminen yhdistyy reversiibeleihin ligaatioreaktioihin.<sup>14,53</sup> Supramolekulaarisella järjestäytymisellä viitataan molekyylien välisiin ei-kovalenttisiin vuorovaikutuksiin, joista seuraa hyvin määriteltyjen molekyylikompleksien muodostuminen termodynaamisessa tasapainossa. Mikäli kompleksoituneiden molekyylien välillä on lisäksi reversiibeleitä ligaatioreaktioita, on kompleksi pysyvämpi. Solun rakenteista löytyy paljon esimerkkejä supramolekulaarisesta kemiasta, kuten membraanien fosfolipidikerrokset, nukleoemästen pinoutuminen sekä pariutuminen ja proteiinien laskostuminen. Proteiineissa esiintyvät disulfidisillat ovat sen sijaan luonnon esimerkki DCC:sta. Tuntemme elämä ei olisi mahdollista ilman näitä joustavia molekulaarisia rakenteita ja dynaamisia reaktioita.

Nukleiinihappojen informatiivinen<sup>54</sup> sekvenssi ja spesifinen emäspariutuminen tekee niistä potentiaalisia katalyyttejä eutaktisten polymeerien synteisiin. Polymeerin rakenneyksikköjen reversiibeli ligaatio hyödyntää tehokkaimmin templaattikatalyyysiä, sillä reversiibeliys sallii termodynaamisen tasapainon saavuttamisen laajalla lämpötila-alueella, ja emäspariutumisen mukaiset kytkennät ovat termodynaamisesti suosiollisempia kuin virheelliset. Reversiibeli oligomerisaatio siis vähentää replikaatiovirheitä. Tässä luvussa käsitellään saavutuksia nukleosidianalogien polymerisaatiossa nukleiinihappotemplatoidulla DCC:lla.

#### **3.1. Reduktiivinen aminaatio 5'-amino-2'-deoksi-3'-(2-oksoetyyli)nukleosideilla**

5'-amino-2'-deoksi-3'-(2-oksoetyyli)nukleosidit (dAON) ovat bifunktionaalisia yhdisteitä, jotka voidaan liittää toisiinsa reduktiivisella aminaatiolla. Reduktiivisen aminaation mekanismi sisältää (i) reversiibelin imiinin muodostuksen sekä protonaation iminiumiksi ja (ii) irreversiibelin pelkistykseen amiiniksi (Kaavio 9).<sup>55</sup> Pelkistykseen käytetään yleensä mietoja reagenssia, kuten NaBH<sub>3</sub>CN:ä, jolloin iminium pelkistyy

lievästi happamissa olosuhteissa kemoselektiivisesti. Reversiibeli vaihe edistää termodynaamisesti vakaimpien tuotteiden muodostumista nukleinihappotemplatoidussa oligomerisaatiossa, sillä templaatile ei-komplementaarilla imiinytköksillä on mahdollisuus katketa, ennen kuin ehtivät ligatoitua irreversiibelisti amiineiksi. Tämä vähentää vääriä dAON-kytkentöjä, ja siten edistää templaatin täysimääräistä replikaatiota.



**Kaavio 9** dAON-nukleosidien ligaatio. (i) Reversiibeli imiinin muodostus ja protonoituminen iminiumiksi. (ii) Iminiumin irreversiibeli pelkistys amiiniksi.

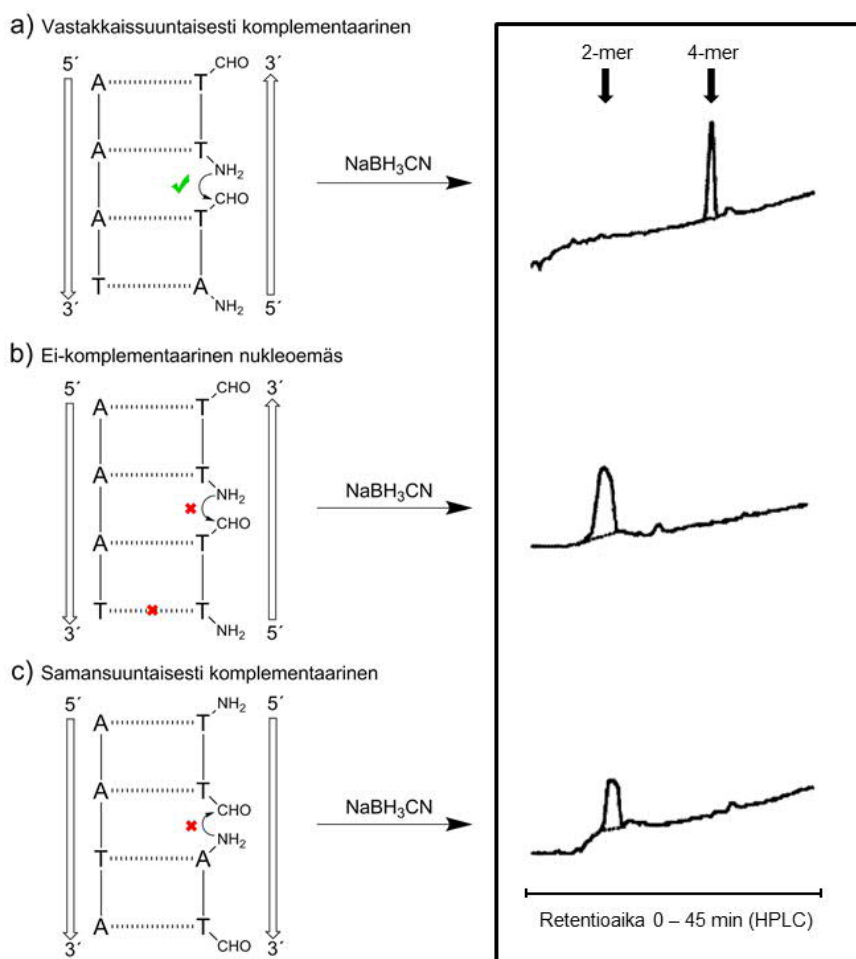
Goodwin ja Lynn esittelivät reduktiivisen aminaation nukleinihappotemplatoidun ligaation yhteydessä vuonna 1992.<sup>56</sup> He valmistivat kaksi monofunktionaalista nukleotiditrimeeriä, joista ensimmäisen 5'-päässä oli 5'-aminoryhmä [3'-d(CGT)-NH<sub>2</sub>] ja toisen 3'-päässä 3'-(2-oksoetyyliryhmä) [OCH-d(TGC)-5']. Nämä monofunktionaaliset trimeerit dimerisoituivat heksameereiksi NaBH<sub>3</sub>CN:n pelkistämänä. Kahden tunnin reaktioajan jälkeen heksameerin saanto oli 30 % ilman templaattia, ja reaktiolämmön laskeminen 0 °C:een tiputti saannon 15 %:iin. Komplementaarisen DNA-templaatin [3'-d(GCAACG)] lisääminen nosti saannon huoneenlämmössä 45 %:iin, kun taas lämpötilassa 0 °C saanto nousi 65 %:iin.<sup>56</sup> Saannon nouseminen reaktiolämmön laskiessa oli selvä merkki hybridisaatiokatalyysistä.

Hybridisaatiokatalyyysin spesifisyyttä tutkittiin lisäämällä reaktioseokseen ei-komplementaarinen 5'-amino-DNA-tetrameeri (3'-d(TTTT)-NH<sub>2</sub>) (1 ekv. komplementaaristen tetrameerien suhteen), joka kilpailisi trimeerien välisistä ligaatioista.<sup>56</sup> Tällöin templaatile komplementaarista heksameeriä muodostui huoneenlämmössä kahden tunnin reaktioajalla kaksinkertainen määrä suhteessa ei-komplementaariseen heptameeriin. Reaktiolämmön laskeminen 0 °C:een nosti komplementaarisen heksameerin saannon yli 30-kertaiseksi ei-komplementaarisen heptameerin suhteen (heptameerin pitoisuus oli käytetyn HPLC-menetelmän detektorajan alapuolella). Havainnot tukivat selkeästi templaatin spesifistä katalyyysiä.

Sekvenssispesifiseen katalyyysiin viittaavia havaintoja tehtiin myös myöhemmässä tutkimuksessa kahden bifunktionaalisen dAON-dimeerin (TT<sub>N</sub>, AT<sub>N</sub>; Kuva 9 s. 23) DNA-templatoidussa dimerisaatiossa: Siinä missä täysin komplementaarisen



tetrameerisen templaatin katalysoima dimerisoituminen oli tapahtunut kvantitatiivisesti (Kaavio 10a), ei-komplementaarisen templaatin läsnäollessa dimerisaation etenemistä ei havaittu samalla reaktioajalla lainkaan (Kaavio 10b). Myöskään templaatin kanssa samansuuntaisesti hybridisoituessa komplementaariset dimeerit (Kaavio 10c) eivät ehtineet muodostaa dimeeriä.<sup>57</sup> Tämä viittasi hybridisaatiokatalyyysin olevan spesifistä vastakkaisuuntaiselle Watson–Crick-pariutumiselle (kuten aktivoituilla nukleotideilla). Liu kollegoineen esitti myöhemmin, että reduktiivinen aminaatio on myös hyvin etäisyysriippuvainen reaktio.<sup>58,59</sup> Tämä tarkoittaa sitä, että ligaation saanto heikkenee voimakkaasti, jos templaatussa on yksi tai useampia ei-komplementaarisia emäksiä ligoituvien sekvenssien välissä. Etäisyysriippuvuus on hyödyllistä replikaation täsmällisyyden kannalta.



**Kaavio 10** HPLC-määritykset DNA-templaatin spesifisyydestä ligaatiossa reduktiivisella aminaatiolla.<sup>57</sup> Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

Lynnin tutkimusryhmä osoitti seuraavina vuosina bifunktionaalisten dAON-nuklesidien olevan varteenotettavia rakennusyksiköjä DNA:n replikaatioon. Kun bifunktionaalisten dAON-tymidiinien (dT<sub>N</sub>) (16 mM) annettiin reagoida oktameerisen DNA-templaatin dA<sub>8</sub> (2 mM) ja NaBH<sub>3</sub>CN:n läsnäollessa, havaittiin reaktion etenevän

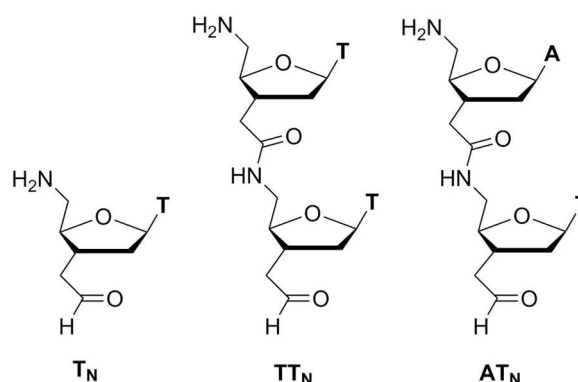
60 tunnin aikana dimeerien kautta tetrameereiksi ja edelleen oktameereiksi 91 %:n saannolla (Taulukko 2).<sup>57</sup> Trimeerivälituotteiden puuttumisen arvioitiin laskennallisesti johtuvan siitä, että monomeerit hybridisoituivat templaattiin paljon nopeammin yksinään tai imiinikytkettynä dimeerinä, kuin mitä niiden pelkistystuotteet amiinikytketyt dimeerit hybridisoituvat. Tällöin monomeerit ligatoituvat amiinikytketyiksi dimeereiksi kvantitatiivisesti, ennen kuin nämä amiinidimeerit ehtivät ligatoitua jäljellä olevien monomeerien kanssa trimeereiksi. Monomeerien loputtua reaktioseoksesta, myöskään penta- ja heptameerit eivät ole mahdollisia. Heksameerien puute johtui analogisesta syystä: dimeerit ehtivät muodostaa kvantitatiivisesti tetrameerejä, ennen kuin tetrameerit ehtivät ligatoitua dimeereihin.<sup>60</sup>

**Taulukko 2** T<sub>N</sub>-monomeerien oligomerisaation saannot reaktion edetessä dA<sub>8</sub>-templaattilla. <sup>60</sup>

Reaktioaika <sup>a</sup>	Monomeerit (T <sub>1</sub> , %)	Dimeerit (T <sub>2</sub> , %)	Tetrameerit (T <sub>4</sub> , %)	Oktameerit (T <sub>8</sub> , %)
0	100	0	0	0
6 h	0	99	0	0
24 h	0	15	80	0
48 h	0	0	22	70
60 h	0	0	0	91

<sup>a</sup> T<sub>N</sub>-monomeerit reagoivat DNA-templaatin (A<sub>8</sub>) ja NaBH<sub>3</sub>CN (20 ekv.) läsnäollessa. Reaktioajan 48 h kohdalla lisättiin ylimääräistä NaBH<sub>3</sub>CN:ä reaktion loppuun saattamiseksi.

Bifunktionaalisten dAON-yksikköjen selkärangan rakenteen merkitystä DNA-templatoitujen reduktiivisen aminaation kulkuun tutkittiin monomeerilla T<sub>N</sub> ja dimeereillä AT<sub>N</sub> sekä TT<sub>N</sub> (Kuva 9), joiden tähteet oli kytketty amidisidoksella toisiinsa. Lähtöaineseokset TT<sub>N</sub> + AT<sub>N</sub> ja T<sub>N</sub> + AT<sub>N</sub> replikoivat molemmat 32-meerisen DNA-sekvenssin [5'-d(AAAAATAA)<sub>4</sub>] lähes kvantitatiivisesti, mutta ensimmäisellä lähtöaineseoksella (TT<sub>N</sub> + AT<sub>N</sub>) replikaatio oli puolitoista kertaa nopeampi kuin jälkimmäisillä lähtöaineilla (T<sub>N</sub> + AT<sub>N</sub>). Vaikka syntyvien replikaatiotuotteiden sekvenssit olivat samoja, oli kahdesta dimeeristä valmistetun jäykkäranskaisemman oligomeerin sulamispiste korkeampi ( $T_m > 87$  °C), kuin monomeerista ja dimeeristä syntyneen enemmän amiinisidoksia sisältävän oligomeerin ( $T_m = 75$  °C). Amidisidokset siis nopeuttivat replikaatiota parantamalla hybridisaatiota templaattiin. Molemmat replikaatit etenivät suoraan 32-meereiksi ilman havaittavia välituotteita, toisin kuin aiemmin dA<sub>8</sub>-templaatin replikaatiossa oltiin havaittu. Templaatin sekvenssi siis näytti vaikuttavan siihen, muistuttaako oligomerisaation eteneminen askelpolymerisaatiota (dA<sub>8</sub>) vai ketjupolymerisaatiota [5'-d(AAAAATAA)<sub>4</sub>]. Erot kahden 32-meerisen replikaation nopeuksissa ja templaatin sekvenssin vaikutus polymerisaation moodiin olivat molemmat liitettävissä eroihin templaattiaffiniteetissa.<sup>60</sup>



**Kuva 9** Bifunktionaalinen dAON-tymidiini ja bifunktionaaliset amidikytketyt dimeerit.<sup>60</sup>

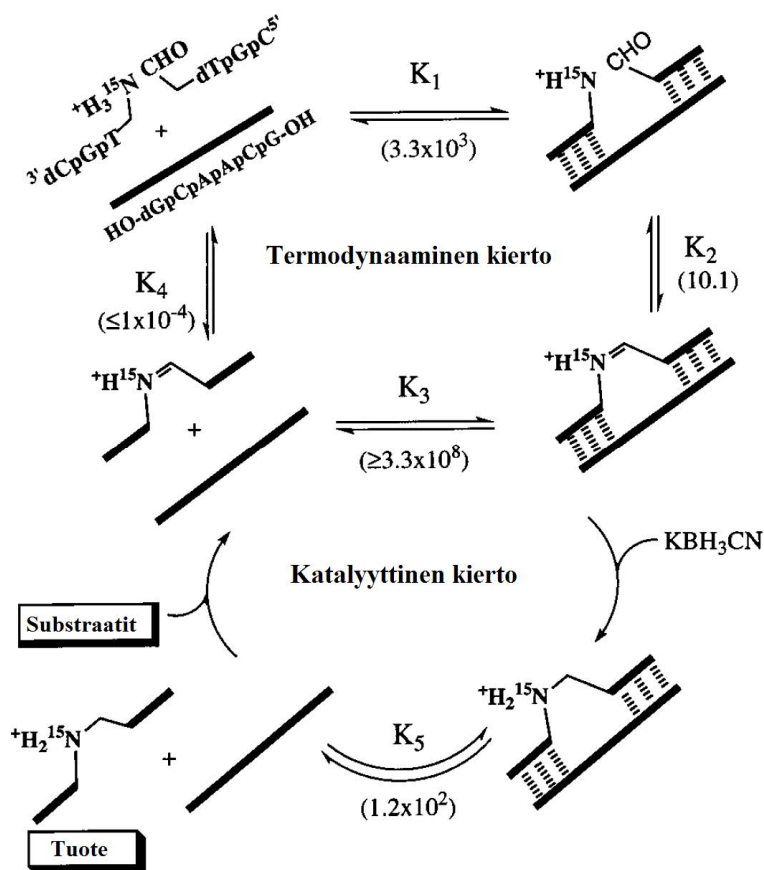
Tilanne, jossa lähtöaineilla on replikaatiotuotetta suurempi affiniteetti templaattiin, on mielenkiintoinen kemiallisen monistusprosessin kannalta. Jos templaatin halutaan toimivan entsyymien tapaan katalyyttisesti, olisi valmiiden tuotteiden irrottava templaattista. Tämä on vaikeaa nukleinihappojen replikaatiossa, koska oligomerisaation edetessä tuotteen affiniteetti templaattia kohtaan kasvaa emäspariutumisen kooperatiivisuuden myötä.

Lynn ja Zhan tutkivat reduktiivisen aminaation käytettävyyttä kemiallisessa DNA:n monistuksessa. He määrittivät termodynaamisen kierron kahden monofunktionaalisen trimeerin väliselle DNA-templatoidulle imiiniligaatiolle ja siihen liitettylle templatoidusta imiinin pelkistyksestä alkavalle katalyyttiselle kierrolle (Kaavio 11). Termodynaamisen kierron tasapainovakiot lähtöaineiden sitoutumiselle templaattiin ( $K_1$ ) ja templatoidulle imiinin muodostukselle ( $K_2$ ) määritettiin NMR-spektroskopisesti (reaktio-olosuhteet: molempia trimeerejä ja komplementaarista DNA-templaattia kutakin 7,5 mM, 500 mM NaCl ja pH 6 lämpötilassa 25 °C). Imiinin muodostumista ei havaittu lainkaan ilman templaattia, ja sen tasapainovakio ( $K_4$ ) määritettiin NMR:n detektioherkkyyden alarajan perusteella. Viimeisenä termodynaamisen kierron parametrinä imiiniligatoituneen heksameerin sitoutuminen templaattiin ( $K_3$ ) laskettiin tasapainovakioiden  $K_1$ ,  $K_2$  ja  $K_4$  perusteella.<sup>55</sup>

Imiinin pelkistyksen ( $\text{KBH}_3\text{CN}$ ) nopeutta seurattiin HPLC:llä eri templaattikonsentraatioissa (0,01–0,1 ekv. lähtöaineiden suhteen). Reaktionopeuksien sekä termodynaamisen kierron tasapainovakioiden perusteella määritettiin amiiniligatoituneen heksameerin templaattihybridisaation tasapainovakio ( $K_5$ ).<sup>55</sup> Vertaamalla tasapainovakioita  $K_5$  ja  $K_1$  voidaan huomata, että trimeeriset lähtöaineet hybridisoituvat templaattiin > 25 kertaa voimakkaammin kuin amiiniligatoitunut heksameeri. Tämä ehkäisee heksameerituotteen katalyyysi-inhibitiota, mikä on yleensä ongelmana DNA:n sisältämän informaation monistuksessa. Tätä ongelmaa ilmentää imiiniligatoituneen heksameerin > 10<sup>5</sup> kertaa voimakkaampi sitoutuminen templaattiin verrattuna

lähtöaineisiin (vrt.  $K_3$  ja  $K_1$ ). Ilman tuoteinhibitiota yksi DNA-templaatti kykenee replikoitumaan useaan otteeseen. Tutkimuksessa inhibiitiota ei havaittu vielä ainakaan tuotteen ja templaatin suhteella 50:1.<sup>55</sup>

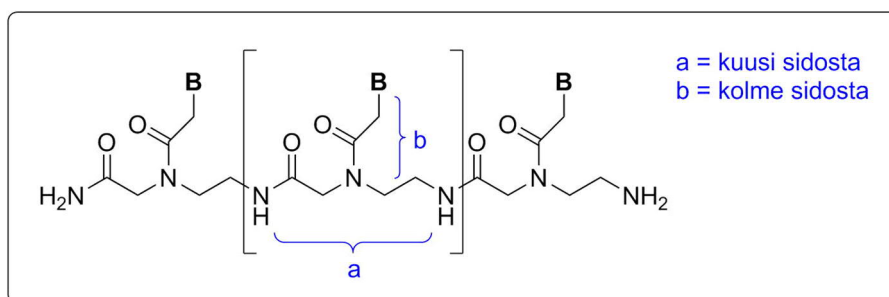
Reduktiivinen aminaatio dAON-nukleosideilla oli ensimmäinen osittain reversiibeliin ligaatiokemiaan pohjautuva nukleiinihappotemplatoitu oligomerisaatio. Lynn kollegoineen osoitti templatoidun reaktion olevan selektiivinen templaatin suhteen ja replikoivan katalyyttisten ribotsyymien<sup>61</sup> pituisia DNA-sekvenssejä.<sup>60</sup> Reduktiivisen aminaation pelkistyksen jälkeinen ligaatiotuotteen lähtöaineita pienempi templaattiaffiniteetti voi osoittautua hyödylliseksi nukleiinihappojen sisältävän informaation monistuksessa. Templaattiaffiniteetti on edelleen säädettävissä, koska reaktion funktionaaliset ryhmät amiini ja aldehydi ovat siirrettävissä monenlaisiin selkärankoihin, kuten esim. PNA:lla on jo demonstroitu.<sup>62</sup> Näiden ominaisuuksien vuoksi reduktiivinen aminaatio oli tärkeä ensiaskel kohti nukleosidianalogien DNA-templatoidua dynaamista kombinatorista kemiaa.



**Kaavio 11**<sup>55</sup> DNA-templatoidun reduktiivisen aminaation termodynaaminen ja katalyyttinen kierto dAON-nukleotideilla. Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.

### 3.2. Peptidinukleiinihappo (PNA)

Peptidinukleiinihapot (PNA) ovat nukleiinihappoanalogeja, joiden selkäranka koostuu pseudopeptidisidoksin toisiinsa kiinnittyneistä *N*-(2-aminoetyyli)glysiiniyksiköistä, joiden glysiinityypen on liitetty asetyylin välityksellä nukleoemäs (Kuva 10). Topologisesti PNA muistuttaa luonnollisia nukleiinihappoja: yksiköiden välissä on kuusi kovalenttista sidosta, ja nukleoemäksen ja selkärangan välillä sidoksia on kolme, aivan kuten DNA:ssa ja RNA:ssa. PNA suunniteltiin vuonna 1991 rakenteeksi, joka muodostaisi kolmoiskierteitä spesifisten DNA–DNA-kaksoiskierteiden kanssa. Tutkimuksissa havaittiin kuitenkin yllättävästi, että kolmoiskierteen muodostumisen sijaan PNA syrjäytti toisen DNA-juosteen, ja muodosti PNA–DNA-hybrididupleksin.<sup>63</sup>

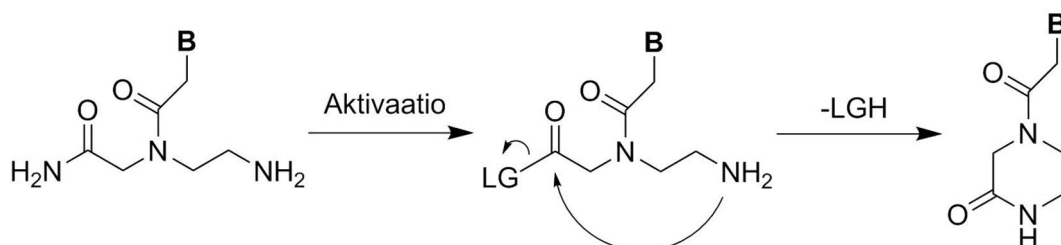


**Kuva 10** Trimeerinen PNA-sekvenssi. Monomeeritähde on merkitty hakasuluin.

PNA muodostaa hyvin pysyviä sekvenssispesifisiä<sup>64</sup> (Watson–Crick) duplekseja itsensä ja luonnollisten nukleiinihappojen kanssa, mikä on osittain seurausta PNA:n varauksettomasta selkärangasta.<sup>65</sup> PNA-dupleksien pysyvyydet noudattavat järjestystä PNA–PNA > PNA–RNA > PNA–DNA (> RNA–DNA > DNA–DNA).<sup>64,66</sup> PNA:n rakenne ei kuitenkaan ole aivan optimaalinen hybrididupleksien muodostukseen, koska PNA–PNA duplekseille ominainen konformaatio, P-kierteinen muoto, eroaa luonnollisille nukleiinihapoille ominaisista A- ja B-kierteisistä muodoista.<sup>67,68</sup> PNA:n hybridisaatio luonnollisiin nukleiinihappoihin voi tapahtua vastakkaisuuntaisesti (aminopäää nukleiinihapon 3'-pään suuntaisesti) tai samansuuntaisesti, joskin vastakkaisuuntainen hybridisaatio on pysyvämpää ( $\Delta T_m = 1\text{--}2$  °C per emäspari).<sup>64</sup> Hybrididupleksien rakenteet sallivat monenlaisten sivuketjujen liittämisen PNA:n selkärankaan, vaikuttamatta juurikaan dupleksien pysyvyyksiin.<sup>69-73</sup> PNA voi myös muodostaa DNA:n<sup>67,74</sup> ja RNA:n<sup>75</sup> kanssa pysyviä kolmoiskierteitä.

PNA:n vahva sekvenssispesifinen hybridisaatio on houkutteleva lähtökohta nukleiinihappotemplatoituun polymerisaatioon ja templaatin informaation replikaatioon. PNA:n monomeerit ovat hankalasti polymerisoitavissa, sillä aktivoituna ne muodostavat nopeasti  $\gamma$ -laktaamirenkaan (Kaavio 12). PNA:n oligomerisaatiosta nukleiinihappotemplaatin katalysoimana raportoitiin ensimmäisen kerran vuonna 1995,

jolloin Orgelin tutkimusryhmä oligomerisoi viisi guaniini-PNA-dimeeriä ( $g_2$ ) toisiinsa RNA-templaatin katalysoimana.<sup>76</sup> Oligomerisaatio käynnistettiin aktivoimalla *in situ* dimeerien karboksyylipää. Aktivaattorina käytettiin 1-(3-dimetyyliaminopropyyli)-3-etyylikarbodiimidihydrokloridia (EDC) 2-MeIm-katalyytin läsnäollessa. Näissä<sup>76</sup> ja myöhemmissä heterosekvenssitemplaateilla toteutetuissa PNA-oligomerisaatioissa<sup>77</sup> täysin replikoituneiden sekvenssien saannot olivat tyypillisesti < 25 %. Lisäksi spesifisyys oli heikkoa, koska oligomerisointumista havaittiin myös ilman templaattia. Näiden tulosten sekä omien DNA-templatoitujen synteetitutkimustensa perusteella<sup>78</sup> Liu kollegoineen totesi PNA:n amidisidoksen muodostumisen olevan välimatkasta riippumaton reaktio templaatilla, ja siksi epäluotettava PNA:n templatoituun oligomerisaatioon.<sup>44,62</sup>

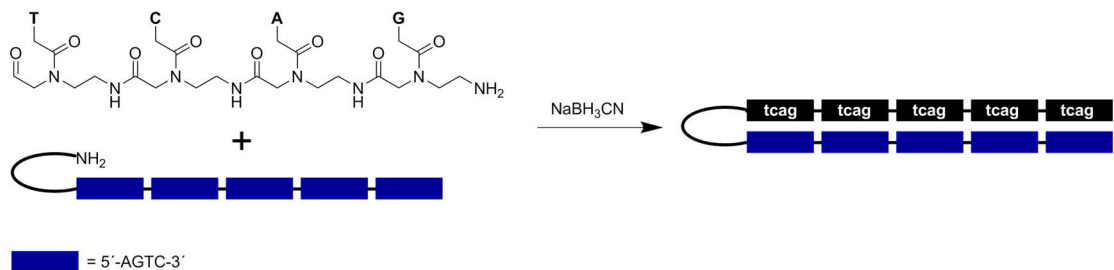


**Kaavio 12** PNA-monomeerin amidiryhmän aktivaatio ja  $\gamma$ -laktaamirenkaan muodostuminen.

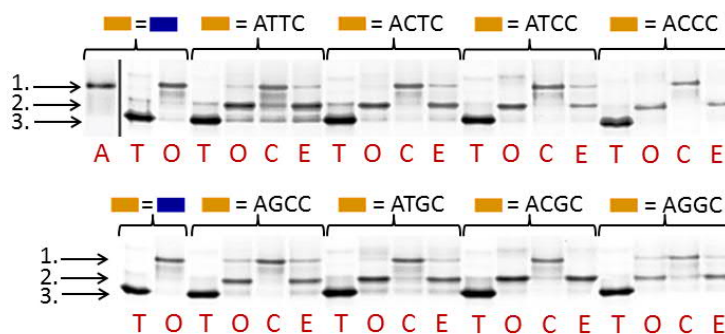
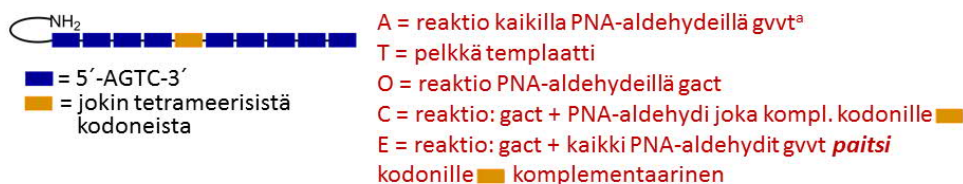
Liun tutkimusryhmä keksi käyttää reduktiivista aminaatiota PNA:n oligomerisaatiossa.<sup>62</sup> Tätä varten he valmistivat heterosekvenssisen PNA-tetrameerin, (gact-CHO) jonka ”karboksyylipää” oli aldehydi (Kaavio 13). PNA-tetrameerien annettiin hybridisoitua komplementaarista ”kodoneista” koostuvan 20-meerisen Hp-DNA-templaatin kanssa  $\text{NaCNBH}_3$ :n läsnäollessa (Kaavio 13). PAGE- ja MS-analyysit osoittivat DNA-templaatin replikoituneen PNA:ksi 90 % saannolla (huom. reduktiivisella aminaatiolla valmistetulla oligo-PNA:lla on amidisidoksen sijaan amiinisidos jokaisessa ligaatiokohdassa).

Koe toistettiin DNA-templaatilla, joissa yksi tetrameerisistä kodoneista oli osittain ei-komplementaarinen (yhden emäksen täsmäämättömyys). Tämän ei-komplementaarisen kodonin (C1) havaittiin estävän PNA-tetrameerien oligomerisaation jatkuminen kyseisessä paikassa. Tuotteena oli tällöin enimmäkseen osittain replikoituneita templaatteja. Esto kumoutui vain, kun joukkoon lisättiin myös toista PNA-tetrameeriä, mikä oli komplementaarinen templaatin kodonille C1 (läpi käytiin yhdeksän erilaisen PNA-tetrameerin lisäystä, joista vain C1:lle komplementaarinen tetrameeri salli oligomerisaation jatkumisen täysimittaiseen replikaatioon). He toistivat kokeet vielä 40-meerisillä templaateilla, joissa oli 10 toistuvaa komplementaarista kodonia. Päätuotteena oli jälleen PNA:ksi replikoitu DNA-sekvenssi, ja kontrollikokeessa ei-

komplementaaristen kodonien havaittiin estävän oligomerisaation jatkuminen kyseisessä kohdassa (Kuva 11). Liun tutkimusryhmä onnistui näin valjastamaan PNA:n voimakkaan ja spesifisen hybridisaation kohti tehokasta ja luotettavaa DNA-templatoitua polymerisaatiota.



**Kaavio 13** PNA-tetrameerin (gact-CHO) oligomerisaatio reduktiivisella aminaatiolla DNA-templaatin katalysoimana.<sup>62</sup>

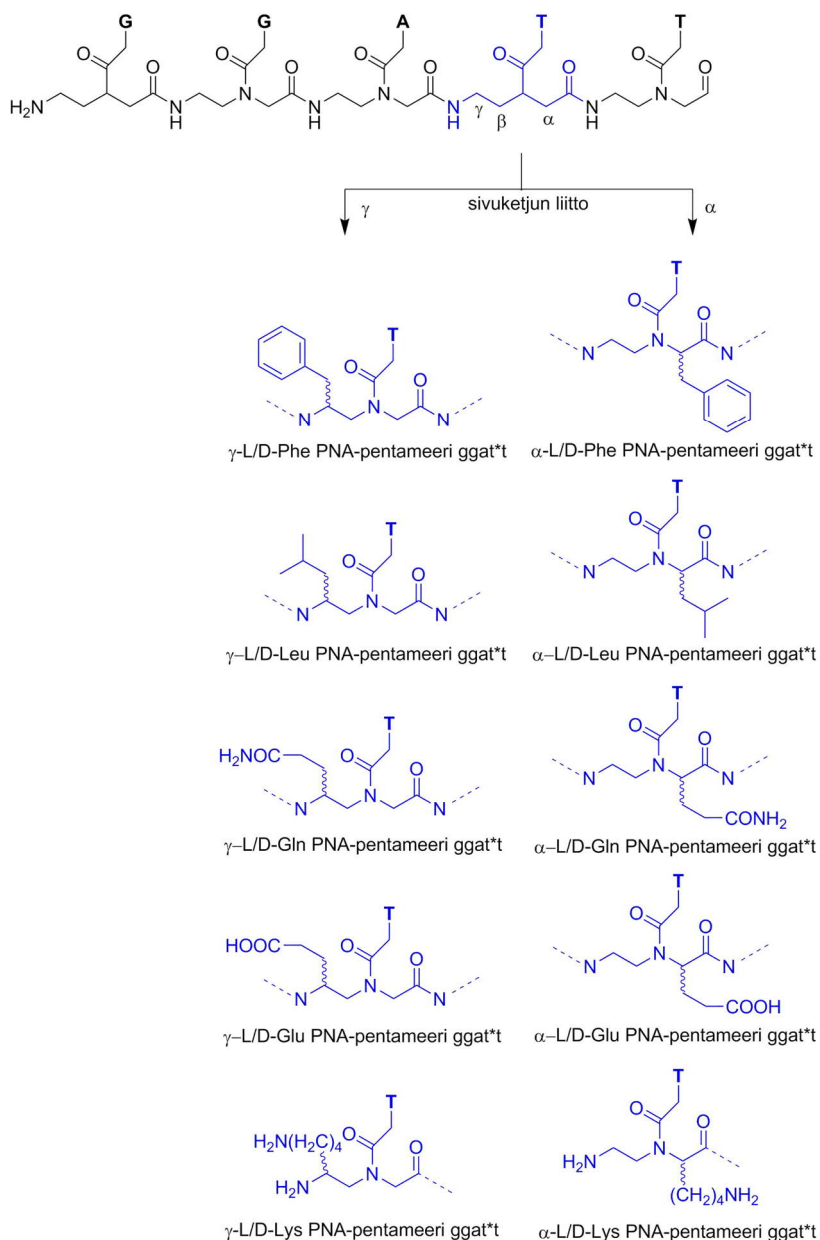


1. Täysimittainen replikaatiotuote
2. Osittain replikoitunut tuote
3. Templaatti

**Kuva 11** PAGE-määritykset PNA-oligomerisaation (reduktiivinen aminaatio) templaattispesifisyydestä. <sup>a</sup>v = jokin PNA-tähde (g/a/c/t). Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.<sup>62</sup>

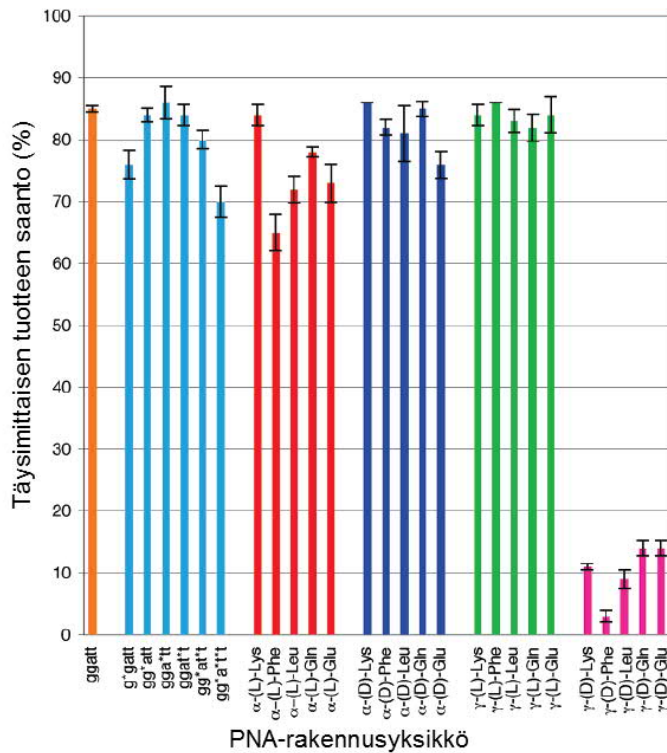
Liu kollegoineen tutkivat PNA:n reduktiivista aminaatiota myös sivuketjullisten PNA-yksikköjen DNA-templatoidussa polymerisaatiossa. Perustavanlaatuisissa tutkimuksissa<sup>73</sup> valmistettiin PNA-pentameerejä (H<sub>2</sub>N-ggatt-CHO), joiden ensimmäisen, toisen, kolmannen tai neljännen tähteen  $\gamma$ -asemaan oli sijoitettu L-lysiinin sivuketju (H<sub>2</sub>N-g\*gatt-CHO, H<sub>2</sub>N-gg\*att-CHO, H<sub>2</sub>N-gga\*tt-CHO ja H<sub>2</sub>N-ggat\*t-CHO) (Kuva 12). Nämä PNA-pentameerit polymerisoituivat spesifisesti 40-meeristen DNA-templaattien katalysoimana 76–85 % saannoilla, mikä oli samaa luokkaa sivuketjuttoman PNA-tetrameerin 85 %:n saannon kanssa (Kuva 13).

Tämän jälkeen syntetisoitiin PNA-pentameerejä, joiden neljännessä tähteessä (H<sub>2</sub>N-ggat\*t-CHO) oli lysiinini, fenyylialaniiniin, leusiiniin, glutamiinihapon tai glutamiiniin sivuketju (Kuva 12). Sivuketjun paikka oli joko  $\alpha$ - tai  $\gamma$ -asemassa, ja läpi käytiin sekä L- että D-konfiguraatiot. PNA-pentameerit joiden sivuketjut olivat  $\alpha$ -L-,  $\alpha$ -D- tai  $\gamma$ -L-sijoiteltuja replikoivat 40-meerisiä DNA-templaatteja 66–86 % saannoilla, mutta  $\gamma$ -D-sivuketjutetut pentameerit tuottivat vain 3–14 % saannot (Kuva 13). Lisäksi he havaitsivat polymerisaation saannon olevan suoraan verrannollinen kunkin PNA–DNA-dupleksin sulamispisteeseen. Tuloksista he päättelivät, että sivuketjullisten PNA-juosteiden polymerisaatio on enemmän riippuvainen sivuketjun sijainnista ja stereokemiasta, kuin sen koosta, hydrofobisuudesta tai varauksesta.<sup>73</sup> Tämä on tärkeä seikka, kun halutaan valmistaa monimuotoisia funktioita sisältäviä polymeerejä.



**Kuva 12** PNA pentameerin ggatt-CHO sivuketjumodifikaatioita neljännessä tähteessä (ggat\*t-CHO).<sup>73</sup>





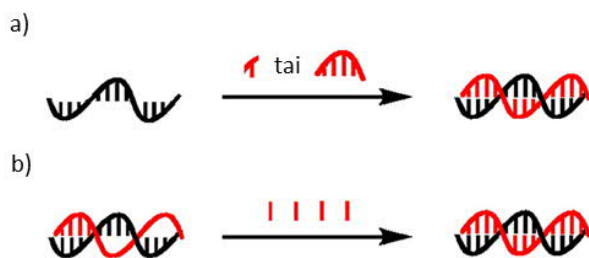
**Kuva 13** Sivuketjullisten PNA-pentameerien saannot 40-meerisen DNA-templaatin katalysoimassa polymerisaatioissa. Vasemmalla olevat vaaleansiniset palkit kuvaavat PNA-pentameerejä, joiden tähteissä (\*) oli L-lysiinin sivuketju. Loput palkit kuvaavat pentameerejä, joiden neljänteen tähteessä (ggat\*t) on tietty sivuketju. Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.<sup>73</sup>

Nielsenin ryhmän alkujaan vuonna 1991 DNA:n kaksoiskierteisiin sitoutuvaksi suunniteltu rakenne oli herättänyt nopeasti mielenkiinnon nukleinihappotemplatoidun oligomerisaation yhteydessä. Liu *et al.* yhdistivät esimerkillisesti havainnot DNA-templatoitujen reaktioiden etäisyysriippuvaisuuksista ja Orgelin tutkimusryhmän aikaansaamat tulokset asyalaatioligaatioihin perustuvista PNA-oligomerisaatioista, ja keksivät käyttää reduktiivista aminaatiota PNA-yksikköjen ligaatioihin. Vuoteen 2007 mennessä PNA:n oltiin osoitettu olevan käyttökelpoinen runko monimuotoisten polymeerien kodonipohjaiseen DNA-templatoituun synteesiin. Tämä tekee PNA:sta lupaavan työkalun ohjattuun molekulaariseen evoluutioon<sup>12,13,79</sup>.

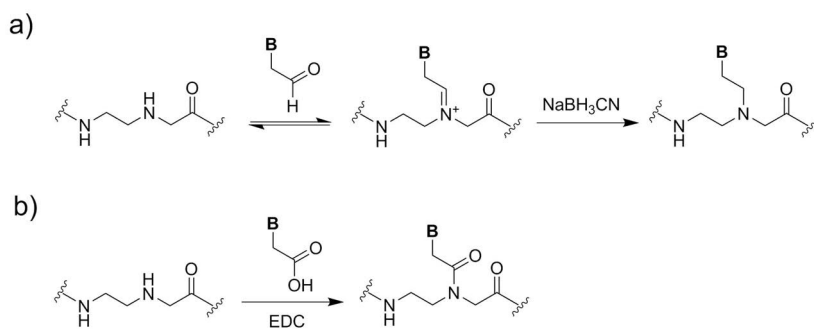
### 3.2.1. PNA ja polymerisaatio emäspaikkauksella

Suurin osa nukleinihappotemplatoiduista polymerisaatioista on toteutettu liittämällä sekä emäsosan että selkärangan sisältäviä monomeerejä tai lyhyitä oligomeerejä toisiinsa. Vaihtoehtoinen keino replikoida nukleinihapon informaatio polymeeriin on emäsosien liittäminen valmiiseen selkärankaan (Kaavio 14). Tätä menetelmää kutsutaan emäspaikkaukseksi (base-filling). Sen eduksi verrattuna perinteiseen polymerisointimenettelyyn on esitetty parempi sekvenssispesifisyys, koska ligaatioreaktiot tapahtuvat mahdollisimman lähellä emäspariutumisen paikkaa.<sup>80</sup>

Liu ja Heemstra ovat tarkastelleet PNA-emäspaikkauksen toimivuutta PNA–DNA-duplekseissa, joissa yhdestä PNA-juosteen tähteestä puuttui nukleoemäs (PNA\*–DNA). Puuttuvan emäksen liittoa (paikkausta) tutkittiin sekä aminaasylaatiolla että reduktiivisella aminaatiolla, joista ensimmäinen tuottaa PNA:n ja jälkimmäinen deoksi-PNA:n (Kaavio 15). Reaktioliuoksessa oli PNA\*–DNA-dupleksin lisäksi kaikkia neljää *N*-modifioitua nukleoemästä (A, G, T, C) läsnä. Paikkauskohdan sijaitessa PNA\*-sekvenssin keskellä, onnistui Watson–Crick-spesifisen nukleoemäksen liitto reduktiivisella aminaatiolla 78–98 % saannolla (lisäksi 2–11 % ei-spesifisiä paikkauksia). Sekvenssin päähän emäspaikkaus onnistui pyrimidiiniemäksillä kohtuullisesti (47–58 %), mutta puriiniemäksillä huonosti (2–7 %). Saannon vaihtelevuus paikkauskohdan sijainnin ja nukleoemäksen tyyppin (pyrimidiini vai puriini) mukaan viittaavat emäspinoitumisen olevan tärkeä katalyyttinen tekijä paikkausreaktiossa. Tutkimuksessa kokeiltiin myös kahden vierekkäisen nukleoemäksen (parit CG ja GA) paikkausta keskelle sekvenssiä, jolloin kahden emäliiton kokonaissaannot olivat reduktiivisella aminaatiolla toteutettuina 21 % ja 38 % (mainitussa järjestyksessä). Aminoasylaatiolla paikkausreaktioiden tulokset olivat vaihtelevia. Yleisesti ottaen saanto ja spesifisyys olivat heikompaa kuin reduktiivisella aminaatiolla.<sup>80</sup>



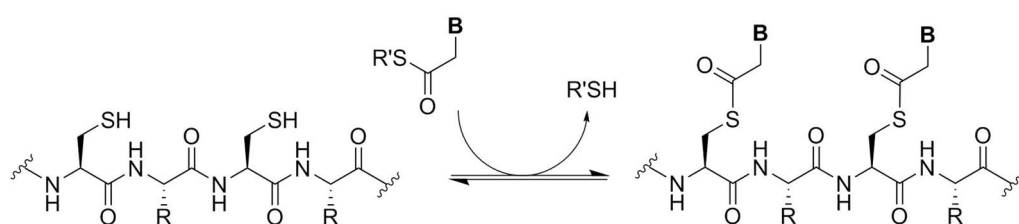
**Kaavio 14**<sup>80</sup> Kaksi vaihtoehtoa nukleinihapon sisältämän informaation replikoimiseen polymeereihin. a) Selkärankatähteitä sisältävien yksiköiden ligaatio. b) Emäspaikkaus valmiiseen selkärankaan. Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.



**Kaavio 15** PNA:n DNA-templatoitu synteesi emäspaikkauksella a) Reduktiivinen aminaatio tuottaa deoksi-PNA:n. b) Aminoasylaatio tuottaa PNA:n.<sup>80</sup>

Emäspaikkausta on tutkittu myös tioesteripeptidinukleiinihapoilla (tPNA). Näiden selkäranka perustuu toistuviin kysteinitähteisiin, joiden määrää ja etäisyyttä toisiinsa säädellään muiden peptiditähteiden inkorporoimisella. Kysteinitähteen sivuketjuun voidaan reversiibelisti transtioesterifikoida nukleoemästioesteri (Kaavio 16). Ghadirin tutkimusryhmä on raportoinut valmistaneensa emäspaikkauksella Watson–Crick-spesifisiä tPNA-polymeerejä 20-meeristen DNA-templaattien (dA<sub>20</sub>, dC<sub>20</sub> ja dU<sub>20</sub>) katalysoimana. He tutkivat useita erilaisia tPNA-selkärankoja, joissa kysteinejä oli tiheimmillään joka toisena tähteenä. Transtioesterifikaatioemäspaikkausreaktiot olivat komplementaarisen DNA-templaatin läsnäollessa (1 ekv.) nopeita (1–4 h) ja monenlaiset peptidiselkärangat olivat sopivia [esim. (GluCys)<sub>10</sub>, (AspCys)<sub>10</sub>, (ArgCys)<sub>10</sub>, (GluCysGlyCys)<sub>5</sub> ja (GlyCysArgCys)<sub>5</sub>]. Emäspaikkauksen onnistuminen havaittiin UV-sulamispistemittauksissa sigmoidisesta PNA/DNA-kaksoiskierteeseen viittaavasta käyrästä.<sup>81</sup>

Kaksoiskierteen muodostumista ei havaittu, mikäli nukleoemästioesterille komplementaarinen templaatti vaihdettiin ei-komplementaariseksi. Kaksoiskierrettä ei myöskään havaittu komplementaarisen templaatin läsnäollessa, mikäli nukleoemästioestereitä oli reaktioliuoksessa yli 20 kertaa vähemmän kuin kysteinitähteitä (selkäranka:templaatti, 1:1, *c/c*).<sup>81</sup> Tämä viittaa nukleoemästen kiinnittymisen kysteinitähteisiin todella olevan tärkeä tekijä tPNA/DNA-kaksoiskierteen muodostumisessa, sillä kun nukleoemäkset jaetaan liian monen selkärangan kesken, jäävät rangat emästen suhteen ”vajaiksi”, eikä niiden affiniteetti templaattia kohtaan riitä hybridisoitumiseen.



**Kaavio 16** Nukleoemäksen transtioesterifikaatio tPNA:n kysteinitähteeseen.<sup>81</sup>

Transtioesterifikaatioemäspaikkauksen toimivuutta tutkittiin myös kahden erilaisen nukleoemästioesterin läsnäollessa. Homosekvenssisen 20-meerisen DNA-templaatin läsnäollessa (GluCysGlyCys)<sub>5</sub>-tPNA:n kysteineihin kiinnittyneistä emäksistä 70–78 % oli templaatille komplementaarisia emäksiä (ja loput ei-komplementaarisia). Tutkimusryhmä arveli heikon spesifisyyden johtuvan reaktion tasapainoluonteesta, eli osa tPNA-selkärangoista ei ollut sitoutuneena templaattiin ja emäspaikkaukset tapahtuivat tällöin epäspesifisesti (ilman templaattia kysteinitähteiden havaittiin paikkaantuvan tasaisesti (50:50) molempien nukleoemästen suhteen). Kun templaatti

biotinyloitiin ja kiinnitettiin streptavidiinikantajaan, voitiin templaattiin sitoutumattomat peptidirangat pestä pois, jolloin komplementaaristen emäspaikkausten osuus nousi 84–89 %:iin.<sup>81</sup> Pesun jälkeinen spesifinen saanto kuvastaa templaattikatalyysin spesifisyyttä, kun taas saantojen ero pesua ennen ja sen jälkeen kertoo templaattiaffiniteetista.

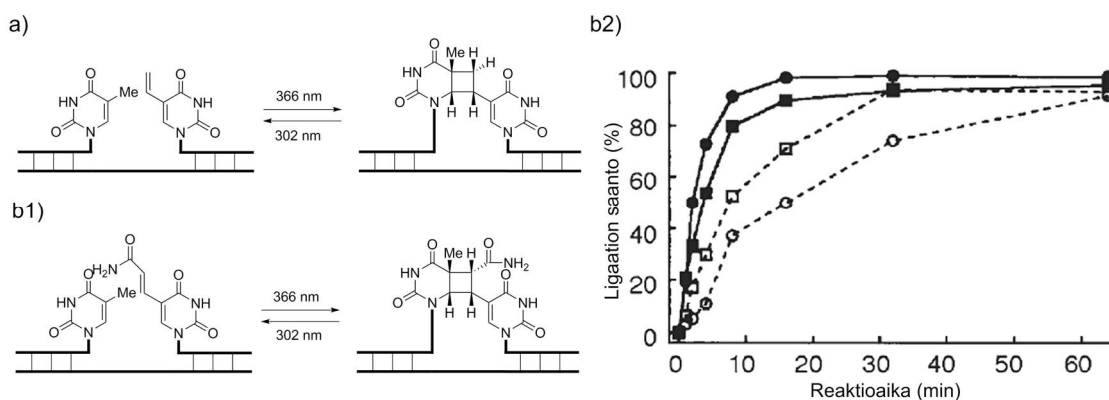
Emäspaikkauksella valmistetun tPNA-polymeerin kykyä mukautua ympäristön muutoksiin testattiin transtioesterifikoimalla ensin (GluCysGlyCys)<sub>5</sub>-tPNA:han adeniiniemäksiä dT<sub>20</sub>-templaatin läsnäollessa (saanto 88 %). Tämän jälkeen reaktioliuokseen lisättiin ylimäärä dA<sub>20</sub>- ja dC<sub>20</sub>-templaatteja sekä 7-deatsaguaniini-tioesteriä. Hypoteesina oli, että dA<sub>20</sub>-templaatti sitoisi dT<sub>20</sub>-templaatin, ja 7-deatsaguaniini korvasi dC<sub>20</sub>-templatoidussa reaktiossa peptidirangan adeniiniemäkset (7-deatsaguaniinia käytettiin guaniinin sijaan G-kvadrupleksien muodostumisen estämiseksi). 7-deatsaguaniinin havaittiin liittyneen 70 %:iin kysteinitähteistä, mikä oli hyvin lähellä aiempaa yksinkertaista dC<sub>20</sub>-templatoitua emäspaikkausreaktiota (76 %).<sup>81</sup>

Transtioesterifikaatio vaikutti lupaavalta reaktiolta templaatin informaation kopiointiin valmiiseen polymeeriselkärankaan. Ongelmana transtioesterifikaatiossa on kuitenkin hydrolyysi (puoliintumisaika A-nukleoemäksen tioestereillä on kahdeksan tuntia huoneenlämpöisessä neutraalissa puskuriliuoksessa), mikä rajoittaa sen käytettävyyttä.<sup>82</sup> Lisäksi emäspaikkausta tapahtui myös ei-templatoituna niin nopeasti, että se ehti näkyä templatoitujen reaktioiden aikana, tuottaen ei-spesifisiä transtioesterifikaatioita. Osoitukset transtioesterifikaation kyvystä replikoida heterosekvenssejä ovat myös puuttellisia. Ghadiri kollegoineen mittasi emäspaikkauksia templaateilla, joissa oli vaihtelevia määriä T- ja C-tähteitä. Spesifisten emäspaikkausten onnistuminen määritettiin tPNA:han kiinnittyneiden 7-deatsaguaniinien ja templaatin C-tähteiden suhteesta (eikä A-tähteiden määrää valmiissa tPNA:ssa huomioitu).<sup>81</sup> Heterosekvenssisen templaatin emäspaikkaustutkimus ilmensi reversiibelisti muodostuneen polymeerin vaikeaa sekvensointia.

### 3.3. Fotoligaatio

Fotoligaatio on luonnollisten nukleotidien ominaisuus, jossa kaksi pyrimidiiniemästä muodostaa syklobutaanin, kun niitä säteilytetään 290 nm aallonpituudella.<sup>83</sup> Sähkömagneettisen säteilyn käyttö DNA-templatoitujen ligaation indusoimisessa on erityislaatuista, koska näin voidaan välttää kemikaalien käyttöä ja hallita ligaatioita tarkasti sekä ajan että paikan suhteen.

Fotoligaation käytöstä DNA-templatoitussa polymerisaatiossa on raportoitu toistaiseksi vain Fujimoton tutkimusryhmä. He pohjasivat työnsä<sup>84</sup> aiempiin tutkimuksiin<sup>83,85,86</sup>, joissa oli ongelmina heikko saanto,<sup>83,86</sup> lyhyen aallonpituuden aiheuttamat sivureaktiot<sup>83,86</sup> ja puute fotoreversiibeliydelle<sup>85,86</sup>. Fujimoton ryhmä syntetisoi 5-vinyyli-2'-deoksiuridiiniin (<sup>V</sup>U), jonka he havaitsivat DNA-templatoitussa reaktiossa muodostavan syklobutaanin viereisen tyymiinin kanssa, kun emäksiä säteilytettiin 366 nm aallonpituudella (Kaavio 17a).<sup>84</sup> He onnistuivat oligomerisoimaan viisi heksameeristä heterosekvenssiä toisiinsa komplementaarisen DNA-templaatin katalysoimana. Ilman templaattia ligaatioita ei havaittu. Lisäksi ligaatiot olivat reversiibeileitä: 30-meeriset polymeerit purkautuivat takaisin heksameereiksi, kun niitä säteilytettiin 302 nm:n aallonpituudella.



**Kaavio 17** DNA-templatoitu fotoligaatio. a) 5-vinyylideoksiuridiini (<sup>V</sup>U) b1) 5-karboksivinyylideoksiuridiini (<sup>CV</sup>U) b2) <sup>CV</sup>U saanto reaktioajan funktiona: RNA-templaatti (musta), DNA-templaatti (valkoinen); <sup>CV</sup>U-fotoligaatiota kokeiltiin tymidiiniin (ympyrät) ja uridiniin (neliöt). Kaavio b2 on uudelleenjulkaistu kustantajan John Wiley and Sons luvalla.<sup>87</sup>

Fujimoton ryhmä herkisti uridiinitähdettä entisestään derivoimalla <sup>V</sup>U:sta 5-karboksivinyyli-2'-deoksiuridiiniin (<sup>CV</sup>U) (Kaavio 17b).<sup>87</sup> Kahden heksameerin DNA-templatoitu <sup>CV</sup>U-välitteinen fotoligaatio (saanto 80 %) saavutettiin tunnissa (Kaavio 17b2), kun taas <sup>V</sup>U:lla ligaatio (saanto 80 %) vaati kuuden tunnin reaktioajan. Vastaavasti RNA-templatoituna reaktiona <sup>CV</sup>U:lla saavutettiin 10 minuutissa 80 %:n saanto, ja 20 minuutissa ligaatio oli kvantitatiivista (Kaavio 17b2). <sup>CV</sup>U-välitteisten fotoligaatioiden nopeudet olivat suoraan verrannollisia dupleksien sulamispisteisiin. Lisäksi yksikin ei-komplementaarinen emäs templaattissa esti 12-meerisen ligaatiotuotteen muodostumisen.<sup>87</sup> Nämä viittaavat siihen, että <sup>CV</sup>U:n fotoligaatio on etäisyydestä riippuvainen templatoitu reaktio.

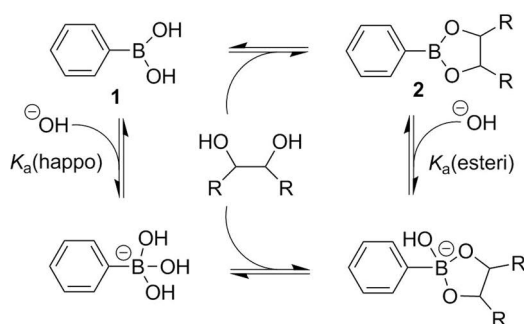
Fujimoton ryhmä kokeili myös karbatsolin käyttöä fotoligaation katalyyttinä.<sup>88</sup> Karbatsoliherkistimellä <sup>CV</sup>U-fotoligaatio voitiin purkaa samalla 366 nm aallonpituudella, millä se saatiin aikaankin. Tämä vaati kuitenkin ligatoituneen oligomeerin ja templaatin erottamisen toisistaan lämpötilaa nostamalla. 366 nm:n

aallonpituus indusoi vähemmän sivureaktioita nukleiinihapoissa kuin 302 nm, ja ligaatio on siten toteutettavissa aidommin reversiibelisti.

Fujimoto *et al.* osoittivat fotoligaation olevan nopea, indusoidessa reversiibeli ja templaatin suhteen spesifinen reaktio,<sup>87,88</sup> sekä sen soveltuvan myös oligomerisaatioon<sup>84</sup>. On oletettavaa, että heidän systeeminsä voitaisiin modifioida myös pyrimidiiniemäksistä eroaviin rakenteisiin, kuten PNA:n sivuketjuihin<sup>73</sup>. Siksi fotoligaatio voisi olla hyödyllinen esimerkiksi syklisten rakenteiden aikaansaamiseksi nukleiinihappotemplatoitujen polymeerien valmistuksessa.

### 3.4. Boronihappoanalogit

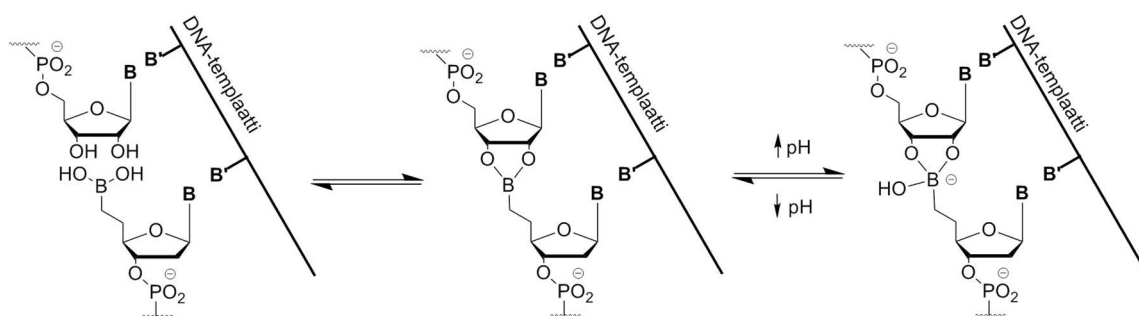
Molekyyliyhdisteissä induktiivisesti neutraali boori (elektronegatiivisuus 2,04) on  $sp^2$ -hybridisoitunut, kolmivalenttinen ja sillä on tyhjä p-orbitaali. Boorin  $sp^2$ -hybridisaatio aiheuttaa kulmajännityksen boronihappoihin, jonka vuoksi pienikokoiset nukleofiilit, kuten hydroksidi-ioni, voivat helposti hyökätä boorin tyhjälle p-orbitaalille. Tällöin boori hybridisoituu  $sp^3$ -muotoon, ja tetraivalenttisen koordinoitumisen myötä kulmajännitykset pienenevät (Kaavio 18). Boronihapot voivat reagoida syklisiksi estereiksi *cis*-diolien läsnäollessa (Kaavio 18). Syklisessä esterissä  $sp^2$ -hybridisaation aiheuttamat kulmajännitykset ovat suurempia kuin happomuodossa. Tämän vuoksi hydroksidi-ionin hyökkääminen sykliseen boronaattiesteriin ja siitä aiheutuva tetraivalenttinen koordinoituminen ( $sp^3$ ) vapauttaa enemmän energiaa kuin happomuodossa. Toisin sanoen, boronaattiesterin  $pK_a$  on pienempi kuin vastaavan boronihapon [vrt. esim. fenyyliboronihappo (**1**,  $pK_a = 8,8$ ) muodostaa glukoosin kanssa boronaattiesterin (**2**,  $pK_a = 6,8$ ).<sup>89</sup> Tämän vuoksi boronaattiestereiden osuus termodynaamisessa tasapainossa kasvaa reaktioliuoksen emäksisyyden kasvaessa.



**Kaavio 18** Boronihapon **1** ja boronaattiesterin **2** väliset tasapainoreaktiot *cis*-diolin ja hydroksidi-ionien läsnäollessa.<sup>89</sup>

Boroniesterifikaatio on mielenkiintoinen nukleosidianalogien reversiibelinä ligaatioreaktiona, koska ribonukleosidien *cis*-dioli on luonnostaan paikassa, jossa mahdollinen boroniesteri voisi toimia fosfodiesterisidoksen isosteerina. Vasseur

kollegoineen on tutkinut nukleosidien 5'-boronihappoanalogien ( $N^{bn}$ ) nukleiinihappo-templatoitua ligaatiota (Kaavio 19) ja polymerisaatiota. Vuonna 2011 demonstroitiin kahden heptameerisen DNA:n boroniesterivälitteinen ligaatio komplementaarisen DNA-templaatin (3'-GGC AGC GA AAA AAA, **ON3**) katalysoimana.<sup>90</sup> Ensimmäisen heptameerin (3'-TTT TTT  $T^{bn}$ , **ON1**) 5'-pään hydroksyyliiryhmä oli korvattu boronihapolla, kun taas toisen heptameerin (rC GCT GCC-5', **ON2**) 3'-pään tähte oli deoksiribonukleotidin sijaan ribonukleotidi.



**Kaavio 19** 5'-boronihapponukleosidin ligaatio 3'-ribonukleosidiin DNA-templaatin katalysoimana.<sup>91</sup>

Kokeet<sup>90</sup> aseteltiin niin, että boronihappoheptameerin ja templaatin välisen dupleksin (**ON1/ON3**) sulamispiste ( $14,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) oli paljon matalampi kuin mitä 3'-ribonukleotidiheptameerin ja templaatin välisen dupleksin (**ON2/ON3**,  $T_m = 48,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tällöin ligaatioreaktiota voitiin seurata UV-sulamispistemittauskäyrän derivaatan ensimmäisen maksimin perusteella, joka määriteltiin boroniesteriligatoituneen dupleksin [**ON3/(ON1 + ON2)**] sulamispisteeksi. Sulamispisteen määrittelyn paikkaansapitävyys varmistettiin PAGE:n avulla. Boroniesteriligatoituneen dupleksin **ON3/(ON1 + ON2)** sulamispiste ( $T_m = 19,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) oli pH:ssa 7,5 merkittävästi suurempi, kuin jos boronihappoheptameerin **ON1** tilalla oli modifioimaton kontrolliheptameeri (3'-TTT TTT T, **ON4**) (Taulukko 3 kirj. 5). Kontrollina tutkittiin myös heptameerin **ON2** 3'-*cis*-diolifunktionaalisuuden tärkeys käyttämällä sen tilalla täysin deoksiribonukleotideista koostuvaa heptameeria (3'-C GCT GCC, **ON5**). Ligaatiota ei tällöin havaittu (Taulukko 3 kirj. 7). Hypoteesin mukaisesti pH:n nosto ( $7,5 \rightarrow 9,5$ ) stabiloi boroniesteridupleksia ( $\Delta T_m = 7,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), mutta ei kontrollidupleksia (**ON4 + ON2**). Myös syanidi-ionin havaittiin stabiloivan boronaattiliitosta, sillä NaCN:n lisäys (3 mM) nosti boroniligatoituneen dupleksin sulamispisteen pH:ssa 7,5 jopa korkeammalle mitä se oli pH:ssa 9,5 ilman syanidi-ioneja ( $T_m = 30,3$  vs.  $26,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tämä viittaa siihen, että syanidi-ionit kykenivät hyökkäämään boorin tyhjälle p-orbitaalille hydroksidi-ionien tapaan. Heptameerien **ON1** ja **ON2** ligaatiota tutkittiin myös komplementaarisen RNA-

templaatin katalysoimana, jolloin havaittiin stabiilimman dupleksin muodostus kuin DNA-templaattilla, mutta pH-riippuvuus ei ollut suuri (vrt. Taulukko 3 kirj. 1 ja 6).<sup>90</sup>

Boronaattiliitos oli selkeästi kaksoiskierteisen DNA:n pysyvyyttä laskeva, sillä 14-meerisen DNA-kaksoiskierteen (**ON3/ON8**) sulamispiste oli reilusti korkeampi kuin boronaattiligatoituneen 14-meerisen dupleksin [**ON3/(ON1 + ON2)**] ( $T_m = 63,6$  °C vs. 19,1 °C, pH 7,5). Reaktion templaattispesifisyys selvitettiin sijoittamalla heptameeriseen 3'-ribonukleotidisekvenssiin ei-komplementaarinen emäs joko boroniliitoskohdan 3'-riboositähteeksi (rU GCT GCC-5', **ON6**) tai keskelle heptameeristä sekvenssiä (rC GAT GCC-5', **ON7**). Sulamispistemittausten perusteella ei-komplementaarinen tähte boronaattiliitoskohdassa häiritsi liitoksen muodostusta, mutta pH:n nosto sai ligaation kuitenkin tapahtumaan (vrt. Taulukko 3 kirj. 6 ja 8). Sen sijaan ei-komplementaarisuus keskellä heptameeristä sekvenssiä ei vaikuttanut reaktion etenemiseen (vrt. Taulukko 3 kirj. 6 ja 9).<sup>90</sup>

**Taulukko 3** Tulokset boronihapponukleotidien ligaatioreaktioiden UV-sulamispistemäärityksistä **ON3**-templaatin<sup>a</sup> läsnäollessa.<sup>90</sup>

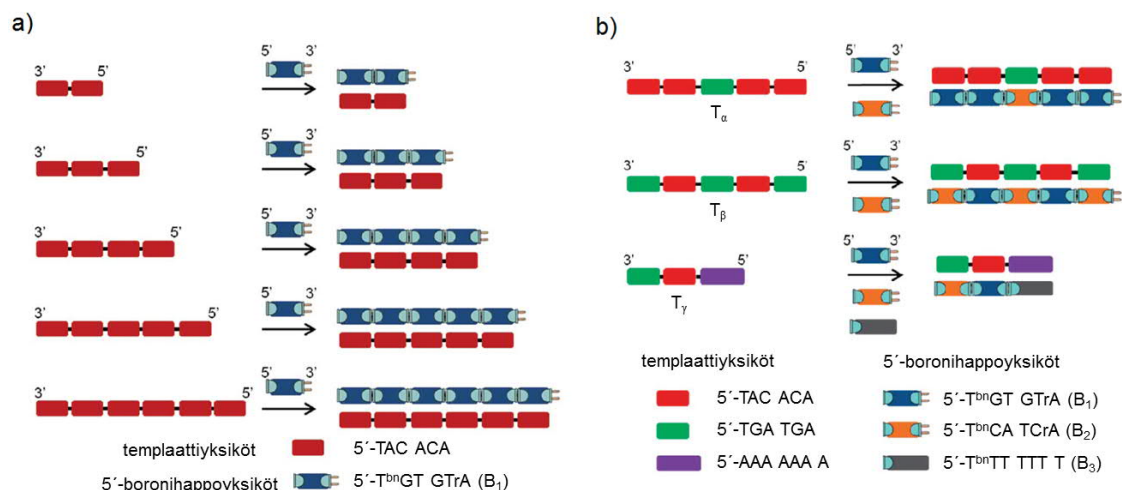
Kirjaus	Sekvenssit <sup>b</sup>	$T_m$ <sup>c</sup> (°C)		
		pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5
1	<b>ON8</b> 3'-TTTTTTTCGCTGCC	63,6	63,5	62,7
2	<b>ON4</b> 3'-TTTTTTT	15,1	15,1	14,9
3	<b>ON2</b> CGCTGCC-5'	48,5	48,5	47,8
4	<b>ON1</b> 3'-TTTTTTT <sup>bn</sup>	14,9	14,9	13,9
5	<b>ON4 + ON2</b> 3'-TTTTTTT CGCTGCC-5'	12,3	12,2	11,0
6	<b>ON1 + ON2</b> 3'-TTTTTTT <sup>bn</sup> CGCTGCC-5'	19,1	23,8	26,7
7	<b>ON1 + ON5</b> 3'-TTTTTTT <sup>bn</sup> GCTGCC-5'	12,8	12,8	11,9
8	<b>ON1 + ON6</b> 3'-TTTTTTT <sup>bn</sup> CGCTGCC-5'	10,8	15,4	19,8
9	<b>ON1 + ON7</b> 3'-TTTTTTT <sup>bn</sup> CGATGCC-5'	22,1	24,5	26,9
10 <sup>d</sup>	<b>ON1 + ON2</b> 3'-TTTTTTT <sup>bn</sup> CGCTGCC-5'	30,3	–	–

<sup>a</sup> Templaatin **ON3** sekvenssi 3'-GGCAGCGAAAAAAA <sup>b</sup> T<sup>bn</sup> tarkoittaa boronotymiiniä. Ribonukleotidit on merkitty sinisellä (muut ovat deoksiribonukleotideja). Templaatile ei-komplementaariset emäkset on alleviivattu. <sup>c</sup> Sulamislämpötilat tarkoittavat kyseisten sekvenssien sulamista templaatin **ON3** kanssa. Ne ovat UV-sulamiskäyrän ensimmäisen derivaatan maksimeja (260 nm detektioaallonpituus). Oligonukleotidien konsentraatiot olivat 3 µM. <sup>d</sup> Sulamispiste määritettiin NaCN (3 mM) läsnäollessa.

Boronaattiesteriligaatiokemian osoitettiin myöhemmin soveltuvan myös oligomerisaatioon. Vasseurin tutkimusryhmä valmisti heksameerisiä bifunktionaalisia deoksiribonukleotideja, joiden 5'-pään tähte oli T<sup>bn</sup>, ja 3'-päänä ribonukleotidi [5'-T<sup>bn</sup>GTGTrA, **B<sub>1</sub>**]. **B<sub>1</sub>**-heksameerien oligomerisaatiota tutkittiin eri pituisten DNA-templaattien [(5'-TAC ACA)<sub>n</sub>, **T<sub>n</sub>**, n = 2–6] katalysoimana (Kaavio 20a). UV-sulamispistemittausten perusteella **B<sub>1</sub>/T<sub>n</sub>**-dupleksien pysyvyys kasvoi pH:ssa 7,5 kontroleihin nähden (modifioimattomat templaatile komplementaariset DNA-heksameerit) vain kolmeen templaattiyksikköön saakka (n = 3, Kuva 14a). Toisaalta **B<sub>1</sub>**-templaatti -dupleksien absoluuttiset sulamispisteet nousivat viiteen templaatti-



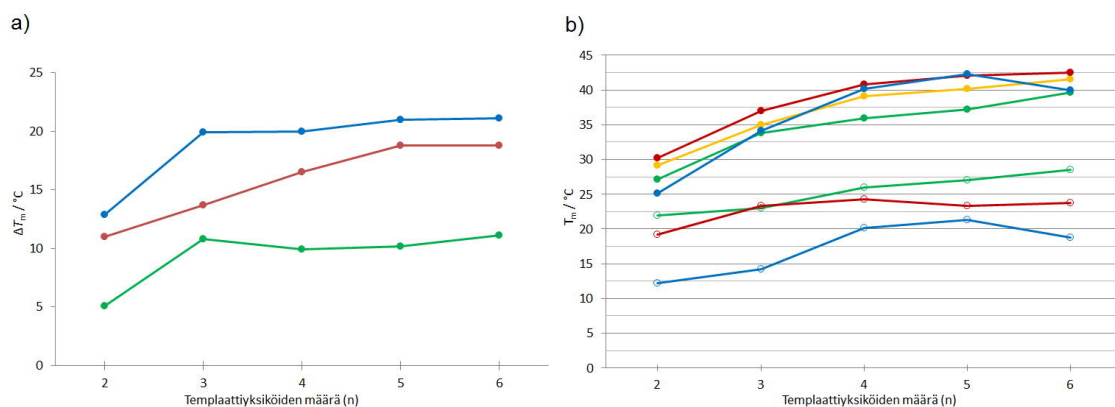
yksikköön saakka ( $n = 5$ , Kuva 14b).<sup>91</sup> Sen sijaan pH:ssa 9,5  $B_1/T_n$ -dupleksien sulamispisteet nousivat kuuteen templaattiyksikköön saakka ( $n = 6$ ) ja kontrolleihin nähden viiteen ( $n = 5$ ). Lisäksi dupleksien sulamispisteet olivat pH:ssa 9,5 korkeampia kuin pH:ssa 7,5. Nämä olivat selkeitä viitteitä hydroksidi-ionien oligomerisaatiota tehostavasta vaikutuksesta. Hydroksidi-ionien vaikutuksen osoitettiin olevan täysin reversiibeliä laskemalla ja nostamalla pH:ta muutamia syklejä. Myös NaCN:n lisääminen (3 mM) pH:ssa 7,5 nosti  $B_1/T_n$ -dupleksien sulamispisteet samalle tasolle kuin ne olivat pH:ssa 9,5 ilman syanidi-ioneja. PAGE-määrittelyksillä varmistettiin, että sulamispisteen nousu templaatin pituuden johdosta viittasi oligomeerien keskipituuden kasvuun. Kun oligomerisaatiota katalysoitiin RNA-templaattilla, havaittiin tehokkaampi oligomerisaatio kuin DNA-templaattilla, mutta reaktioliuoksen happamuudella ei ollut juurikaan vaikutusta oligomerisaatioreaktion tasapainon asemaan.<sup>91</sup> Tulokset täsmäsivät siis hyvin aiempaan<sup>90</sup> yksittäisen ligaatioreaktion tutkimukseen.



**Kaavio 20** a) Boronihappoyksiköiden  $B_1$  oligomerisaatio eripituisten DNA-templaattien katalysoimana ( $T_n$ ,  $n = 2-6$ ). b) Erilaisten boronihappoyksiköiden ( $B_1$ ,  $B_2$  ja  $B_3$ ) oligomerisaatio erilaisista templaattiyksiköistä koostuvien DNA-templaattien katalysoimana.<sup>91</sup> Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan The Royal Society of Chemistry luvalla.

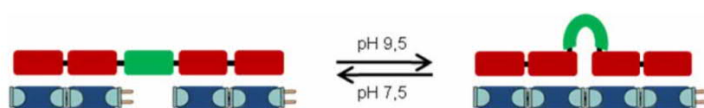
Vasseurin tutkimusryhmä selvitti, kuinka pitkiä bifunktionaalisten boronihappoyksiköiden piti olla, jotta hybridisaatiokatalyysi olisi riittävä oligomerisaatioon. Tällöin valmistettiin bifunktionaaliset boronihappoyksiköt, jotka olivat tri-, tetra tai pentameerisiä ( $B_{Tr}$ ,  $B_{Te}$  ja  $B_{Pe}$ ). Komplementaarisen DNA-templaatin läsnäollessa tetra- ja pentameerisillä yksiköillä havaittiin dupleksin sulamispisteen nousu modifioimattomiin kontrolliyksikköihin nähden, mutta trimeeriset boronihappoyksiköt eivät vaikuttaneet oligomerisoituvan. Tetra- ja pentameeristen yksikköjen oligomerisaation aste oli lähes lineaarinen niiden konsentraatioon nähden (1-6 ekv. templaattiin nähden, Kuva 15b s. 41). Myös alukkeen vaikutus oligomerisaatioon tutkittiin. Tällöin käytettiin DNA-templaattia, jonka 3'-päähän

hybridisoitui aluke (5'-GG(TCA)<sub>2</sub>TCrA), ja alukkeen vieressä overhang-asemassa oli boronihappoyksikön (**B<sub>Tr</sub>**, **B<sub>Te</sub>** tai **B<sub>Pe</sub>**) trimerisaatiolle komplementaarinen templaattisekvenssi. Alukkeen havaittiin kasvattavan oligomerisaation astetta kaikilla boronihappoyksiköillä (Kuva 15b s. 41). Nyt myös trimeerinen **B<sub>Tr</sub>**-yksikkö vaikutti oligomerisoituvan.<sup>92</sup>



**Kuva 14** Dupleksien **B<sub>1</sub>/T<sub>n</sub>** sulamispisteet ja niiden erot kontrolleihin nähden templaattiyksiköiden ( $n$ ) funktiona eri olosuhteissa (pH 7,5; pH 8,5; pH 9,5;  $\text{CN}^-$  (3 mM)). a) Dupleksien **B<sub>1</sub>/T<sub>n</sub>** sulamispisteiden ero kontrolleihin nähden ( $\Delta T_m$ ). b) Dupleksien **B<sub>1</sub>/T<sub>n</sub>** sulamispisteet. Täytetyt ympyrät kuvaavat bifunktionaalisia boronihapponukleotideja ja tyhjä ympyrät modifioimattomia kontrollinukleotideja.<sup>91</sup>

Boronihappoanalogien oligomerisaation templaattispesifisyyttä, etäisyysriippuvuutta ja toimivuutta erilaisten komponenttien seoksessa tarkasteltiin koejärjestelyissä, joissa templaatit koostuivat vaihtelevista heksameerisistä (X ja Y) tai heptameerisistä (Z) DNA-yksiköistä (**T<sub>α</sub>** = 3'-XXYXX; **T<sub>β</sub>** = 3'-YXYXY ja **T<sub>γ</sub>** = 3'-XYZ) (Kaavio 20b). Kun templaatti **T<sub>α</sub>** reagoi stoikiometrisessä suhteessa komplementaaristen boronihappoyksiköiden kanssa (**B<sub>1</sub>** ja **B<sub>2</sub>**), oli muodostuvien dupleksien sulamispisteet lähes samoja, kuin mitä aiemmin **B<sub>1</sub>/T<sub>5</sub>**-dupleksilla oltiin havaittu (vrt. Kuva 14b  $n = 5$  ja Taulukko 4 kirj. 3).<sup>91</sup> Mielenkiintoista kyllä, kun templaatin **T<sub>α</sub>** keskimmaiselle yksikölle (Y) komplementaarinen **B<sub>2</sub>** poistettiin seoksesta, laskivat sulamispisteet vain vähän etenkin pH:ssa 9,5, jossa  $\Delta T_m = -1,8$  °C (vrt. Taulukko 4 kirj. 1 ja 3). Nämä sulamispisteet olivat myös korkeampia kuin mitä **B<sub>1</sub>/T<sub>2</sub>**-dupleksilla oltiin havaittu (vrt. Kuva 14b  $n = 2$  ja Taulukko 4 kirj. 1). Tämä viittaa boroniesteriligaation tapahtuvan kokonaisen templaattihexameerin yli, aiheuttaen pullistuman templaattiin, ja tämä ”ylitseligaatio” oli voimakkaampi korkeammassa pH:ssa (Kaavio 21).<sup>91</sup>



**Kaavio 21** Emäksisyyden indusoima etäisyysriippumaton ligaatio ja pullistuma templaattissa.<sup>91</sup> Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan The Royal Society of Chemistry luvalla.

Boronaattiesterifikaatio vaikutti siis olevan pH:n nostolla indusoitavissa etäisyydestä riippumattomaksi reaktioksi. Kun templaatin  $T_{\alpha}$  keskimmäisen heksameerisen yksikön (Y) keskelle asetettiin neljän nukleotidin ei-komplementaarinen alue, muodosti templaatti  $T_{\alpha}^*$  (\* merkitsee ei-komplementaarisia tähteitä sisältävää templaattia) komplementaaristen  $B_1$ - ja osittain komplementaarisen  $B_2$ -boronihappoyksiköiden läsnäollessa ligatoituneen dupleksin, jonka sulamispiste oli pienempi kuin pelkkien  $B_1$ -yksiköiden läsnäollessa muodostuneella dupleksilla (pH 7,5: 28,3 vs. 31,1 °C; pH 9,5: 34,3 °C vs. 39,3 °C).<sup>91</sup> Ligaatio pullistuvan templaatin yli ( $B_1B_1-B_1B_1$ , jossa viiva merkitsee oletettavasti heikointa boronaattiesterisidosta) oli siis energeettisesti suosiollisempaa, kuin mitä väliin kiilautuvan osittain komplementaarisen yksikön  $B_2$  ligatoituminen ja  $B_1B_1-B_2-B_1B_1$ -oligomeerin hybridisaatio templaattiin. Vain kahden ei-komplementaarisen emästähteen sijoittaminen templaatin yksikköön Y tuotti likimäärin samat tulokset.

Sen sijaan jos templaattissa  $T_{\alpha}^*$  oli vain yksi ei-komplementaarinen tähte, joka sijaitsi boronaattiliitoksessa (keskimmäisen yksikön Y reunassa), nousi dupleksin  $B_1B_1-B_2-B_1B_1/T_{\alpha}^*$  sulamispiste suuremmaksi kuin mitä se dupleksissa  $B_1B_1-B_1B_1/T_{\alpha}^*$  oli ollut pH:ssa 7,5 ( $T_m = 33,7$  °C vs. 31,1 °C), mutta pH:ssa 9,5 sulamispiste jäi edelleen pienemmäksi ( $T_m = 36,7$  °C vs. 39,3 °C).<sup>91</sup> Nämäkin havainnot tukevat sitä, että hydroksidi-ionit tekevät boronaattiesterifikaatiosta vähemmän etäisyydestä riippuvaisen reaktion. Toisaalta voidaan huomata, että tässä ligaatiolle suosiollisimmassakin yhden emäksen ei-komplementaarisuudessa havaitaan sulamispisteessä ero täysin komplementaariseen oligomeeriin ( $B_1B_1B_2B_1B_1/T_{\alpha}$ ) nähden pH:ssa 9,5 ( $T_m = 36,7$  °C vs. 41,1 °C), mutta sen sijaan ero on pH:ssa 7,5 pieni ( $T_m = 33,7$  °C vs. 35,2 °C) (Taulukko 4 kirj. 3).<sup>91</sup> Tämä mahdollistaa yhden emäksen muutoksen havaitsemisen boronaattiligaatiolla (pistemutaation osoitus).<sup>93</sup>

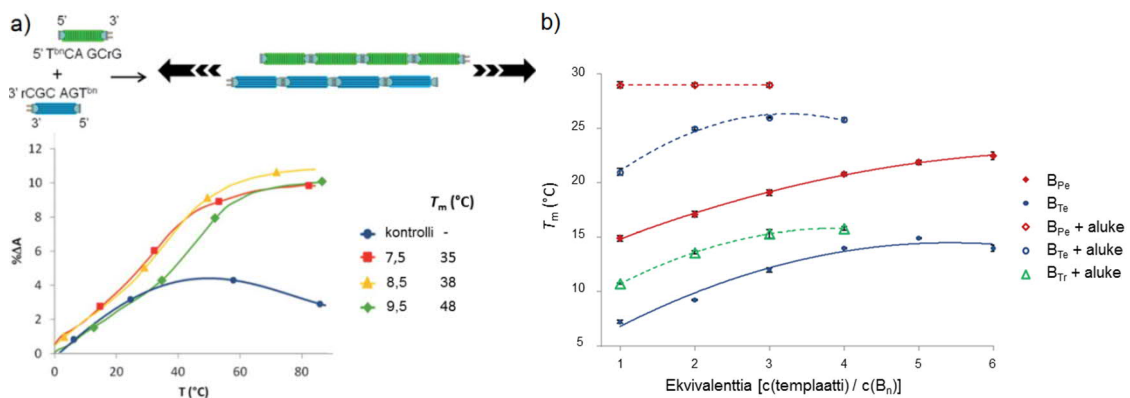
Boronihapponukleotideilla todettiin myös kyky oligomerisoitua itsetemplatoidussa reaktiossa. Tällöin käytettiin kahta heksameeristä yksikköä [ $3'$ -rCGCAGT<sup>bn</sup> ja  $5'$ -T<sup>bn</sup>CAGCrG], joissa oli päissä kolmen emäksen komplementaarisuudet (Kuva 15a). Kun heksameerit liuotettiin veteen stoikiometrisin suhtein 10 °C lämpötilassa, havaittiin oligonukleotidin B-kierteiselle dupleksille tyypillinen CD-spektri. Duplexiin viittaava spektri katosi lämmittäessä reaktioliuos 20 °C:een pH:ssa 7,5, mutta pH:ssa 9,5 B-dupleksi oli edelleen havaittavissa. Tämä viittasi itsetemplatoidun oligomerisaationkin olevan tehokkaampaa emäksisissä olosuhteissa. Dupleksien tarkat sulamispisteet eri pH:issa määritettiin UV-spektroskopisesti (Kuva 15a).<sup>91</sup>

**Taulukko 4** Boronihappoyksiköiden **B<sub>1</sub>**, **B<sub>2</sub>** ja **B<sub>3</sub>** tuottamien dupleksien sulamispisteet erilaisten DNA-templaattien katalysoimissa oligomerisaatioreaktioissa (ks. Kaavio 20b).<sup>91</sup>

Kirj.	Templaatti	Sekvenssi(t) <sup>a</sup>	Templaatti/ sekvenssit <sup>c</sup>	$T_m^b$	
				pH 7,5	pH 9,5
1	3'-CC(ACACAT) <sub>2</sub> AGTAGT(ACACAT) <sub>2</sub> CC	5'-TGTGTA 5'-T <sup>bn</sup> GTGTA	1/4 1/4	25,0 31,1	22,9 39,3
2	3'-CC(ACACAT) <sub>2</sub> AGTAGT(ACACAT) <sub>2</sub> CC	5'-TCATCA 5'-T <sup>bn</sup> CATCA	1/1 1/1	< 5 < 5	< 5 < 5
3	3'-CC(ACACAT) <sub>2</sub> AGTAGT(ACACAT) <sub>2</sub> CC	5'-TGTGTA + 5'-TCATCA 5'-T <sup>bn</sup> GTGTA + 5'-T <sup>bn</sup> CATCA	1/4/1 1/4/1	25,0 35,2	24,3 41,1
4	3'-CCAGTAGT(ACACATAGTAGT) <sub>2</sub> CC	5'-TGTGTA 5'-T <sup>bn</sup> GTGTA	1/2 1/2	< 5 < 5	< 5 < 5
5	3'-CCAGTAGT(ACACATAGTAGT) <sub>2</sub> CC	5'-TCATCA 5'-T <sup>bn</sup> CATCA	1/3 1/3	< 5 < 5	< 5 < 5
6	3'-CC(AGTAGT(ACACATAGTAGT) <sub>2</sub> CC	5'-TGTGTA + 5'-TCATCA 5'-T <sup>bn</sup> GTGTA + 5'-T <sup>bn</sup> CATCA	1/2/3 1/2/3	17,5 31,2	14,0 35,4
7	3'-CCAGTAGTACACATAAAAAAACC	5'-TCATCA 5'-T <sup>bn</sup> CATCA	1/1 1/1	< 5 < 5	< 5 < 5
8	3'-CCAGTAGTACACATAAAAAAACC	5'-TGTGTA 5'-T <sup>bn</sup> GTGTA	1/1 1/1	< 5 < 5	< 5 < 5
9	3'-CCAGTAGTACACATAAAAAAACC	5'-TTTTTT 5'-T <sup>bn</sup> TTTTT	1/1 1/1	13,9 12,0	12,7 9,8
10	3'-CCAGTAGTACACATAAAAAAACC	5'-TGTGTA + 5'-TCATCA 5'-T <sup>bn</sup> GTGTA + 5'-T <sup>bn</sup> CATCA	1/1/1 1/1/1	13,9 22,8	13,8 25,7
11	3'-CCAGTAGTACACATAAAAAAACC	5'-TCATCA + 5'-TTTTTT 5'-T <sup>bn</sup> CATCA + 5'-T <sup>bn</sup> TTTTT	1/1/1 1/1/1	13,8 12,7	12,6 23,6
12	3'-CCAGTAGTACACATAAAAAAACC	5'-TGTGTA + 5'-TTTTTT 5'-T <sup>bn</sup> GTGTA + 5'-T <sup>bn</sup> TTTTT	1/1/1 1/1/1	17,9 22,0	17,8 27,7
13	3'-CCAGTAGTACACATAAAAAAACC	5'-TGTGTA + 5'-TCATCA + 5'-TTTTTT 5'-T <sup>bn</sup> GTGTA + 5'-T <sup>bn</sup> CATCA + 5'-T <sup>bn</sup> TTTTT	1/1/1/1 1/1/1/1	17,9 26,7	16,9 30,9

<sup>a</sup> T<sup>bn</sup> tarkoittaa boronotymidiiniä. Ribonukleotidit on merkitty sinisellä (muut ovat deoksiribonukleotideja). <sup>b</sup> Sulamislämpötilat ovat UV-sulamiskäyrän ensimmäisen derivaatan maksimeja (260 nm detektioallonpituus). Templaatin konsentraatio 3 μM. <sup>c</sup> Templaatin ja oligoyksiköiden ainemäärien suhteet (mainitussa järjestyksessä).

Vasseur tutkimusryhmineen demonstroi monilla tavoin harvinaislaatuisten nukleiinihappotemplatoidun oligomerisaation. Ainutlaatuista oli oligomerisaation perustuminen täysin reversiibeihin kovalenttisiin sidoksiin ilman ylimääräisten reagenssien kulutusta. Systemi oli siis täysin dynaamista kombinatorista kemiaa. Lisäksi oligomerisaation keskimääräistä astetta voitiin kontrolloida pienillä olosuhteiden muutoksilla (lämpötila, pH ja CN<sup>-</sup>-ionien läsnäolo). Myöskin boronihappoesterifikaation etäisyysriippuvuus oli pH:n avulla kontrolloitavissa. Boroninukleotidien kyky itsetemplatoitua oligomerisaatioon on itsejärjestäytymistä puhtaimmillaan, mikä on todella mielenkiintoista niin prebioottisen maailman kuin sovellustenkin kannalta.



**Kuva 15** a)<sup>91</sup> Nukleosidien boronihappoanalogien itsetemplatoitun oligomerisaation UV-sulamispistemittaukset eri pH-arvoissa. b)<sup>92</sup> Trimeeristen (**B<sub>Tr</sub>**), tetrameeristen (**B<sub>Te</sub>**) ja pentameeristen (**B<sub>Pe</sub>**) boronihappoyksiköiden sulamispisteet eri konsentraatioissa ja alukkeen läsnäollessa. Kuva on uudelleenjulkaistu kustantajan The Royal Society of Chemistry luvalla.

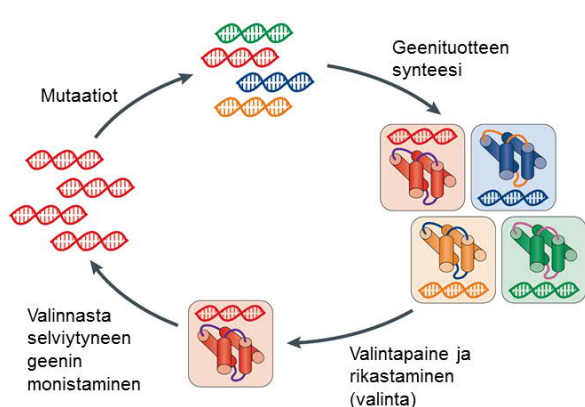
## 4. Sovellukset

Vaikkakin tutkielmassa kuvatut nukleiinihappotemplatoidut polymerisaatioreaktiot ovat pohjimmiltaan perustutkimusta, on osa niiden sovelluspotentiaalista jo nähtävissä. Esimerkiksi ”entsyymitön PCR” on mahdollinen sovellus aktivoituille nukleotideille. RNA:n amplifikaatio PCR:llä vaatii nykypäivänä sen replikoimisen ensin käänteiskopioijaentsyymien avulla komplementaariseksi DNA-juosteeksi (cDNA), jonka jälkeen cDNA voidaan monistaa RNA:ksi. Käänteiskopioijaentsyymi vaatii 25–30 emästähteen pituisen cDNA-alukkeen voidakseen aloittaa replikaation.<sup>94</sup> Näin pitkä aluke luonnollisesti hankaloittaa tuntemattomien RNA-sekvenssien kopiointia. Se myös asettaa minimipituuden kopioitavalle RNA:lle. ”Ei-entsyymattisen PCR-monistuksen” lisäksi potentiaalisia tulevaisuuden sovelluksia nukleiinihappotemplatoiduille polymerisaatioreaktioille ovat mm. pistemutaatioiden<sup>95</sup> osoitus<sup>27,93,96</sup>, DNA-tietokoneet,<sup>97</sup> itsejärjestäytyvät materiaalit<sup>98-100</sup>, polymeerien ohjattu evoluutio ja synteettinen elämä. Seuraavissa luvuissa käsitellään kahta viimeiseksi mainittua yksityiskohtaisemmin.

### 4.1. Polymeerien ohjattu evoluutio

Luonnon polymeerit DNA, RNA ja proteiinit ovat kehittyneet evolutiivisessa prosessissa kykeneväisiksi toimintoihin, jotka ovat monimutkaisuudessaan tarjonneet loputtomia haasteita ja kysymyksiä niin kemian kuin biologiankin kannalta. Molekulaarinen evoluutio luonnossa perustuu geneettisen koodin sattumanvaraisiin mutaatioihin. Mutaatio voi johtaa uusien geenituotteiden biosynteesiin (proteiinit), mutta myös geneettinen materiaali itsessään voi saada uusia funktioita (ribosyymit). Mutaatiot ovat hyödyllisiä, mikäli ne edistävät organismin selviytymistä. Hyödylliset

mutaatiot edistävät mutatoituneen geenin replikaatiota ja säilymistä. Tämä johtaa ajan myötä mutatoituneen geenin rikastumiseen. Valintapaineen ollessa riittävän suuri, voi mutatoitunut geeni syrjäyttää alkuperäisen huonompaan kelpoisuuteen johtavan geenin populaatiosta täydellisesti. Koska evolutiivinen prosessi säilyttää hyödyllisen informaation, on hyödyllisten funktioiden kehittyminen nopeampaa kuin ”muistittomassa” sattumanvaraisessa kehitysprosessissa.<sup>12</sup>

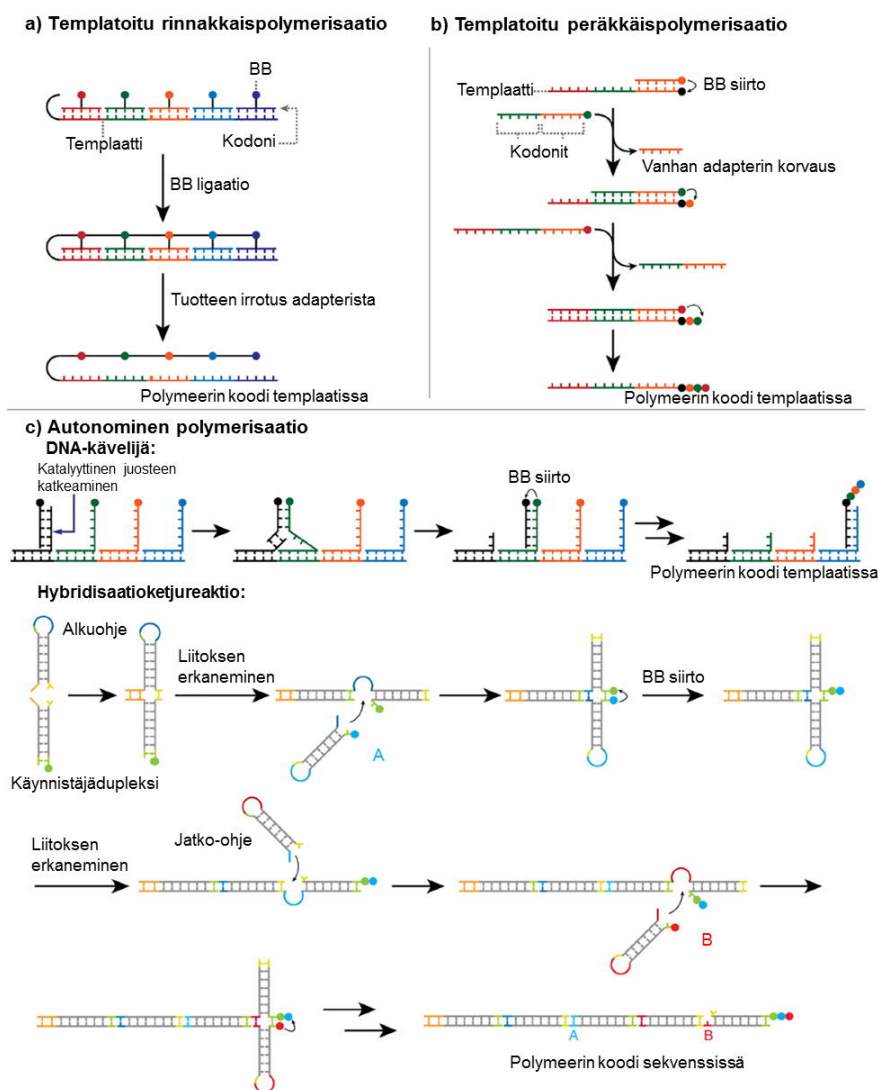


**Kaavio 22** Ohjatun (proteiini)evoluution periaate. Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan Springer Nature luvalla.<sup>101</sup>

Molekulaarista evoluutiota on käytetty tarkoitushakuisesti sekä nukleiinihappojen<sup>102</sup> että proteiinien<sup>101</sup> funktioiden kehittämiseen halutun kaltaisiksi (Kaavio 22). Nämä luonnolliset polymeerit voidaan syntetisoida joko entsymaattisesti (tai ribosomaalisesti) tai soluviljelmissä. Niin ikään valintapaine voidaan toteuttaa suoraan soluviljelmissä yksilöiden selviytymisen perusteella,<sup>103-107</sup> taikka haluttuja polymeerejä voidaan rikastaa myös affiniteettiseulonnalla.<sup>108-111</sup> Solujen selviytymiseen perustuvassa valintapaineessa on se etu, että hyödyllisen funktion toimintamekanismia ei tarvitse tällöin ymmärtää. Varjopuolena kaikissa soluviljelyyn perustuvissa menetelmissä on niiden rajallinen kapasiteetti polymeerikirjastojen laajuuksien suhteen.<sup>112</sup> Proteiinien kehittämistä ollaan toteutettu soluviljelmissä myös jatkuvatoimisena, jolloin prosessin eri vaiheet eivät tarvitse erillisiä toimenpiteitä.<sup>113</sup> Jatkuvatoimisessa evoluutiossa haasteena on kuitenkin mutaatioiden kohdentaminen vain haluttuihin geeneihin. Mikäli jotkin muut kuin tarkastelun alaisena olevat geenit mutatoituvat, voi solun kelpoisuus parantua epäolennaisesta syystä. Tällöin mielenkiinnon kohteena olevan polymeerin valintapaine vääristyy.

DNA-templatoitujen ligaatiomenetelmien kehittymisen myötä myös ei-luonnolliset polymeerit (sekä pienmolekyylit<sup>114</sup>) alkavat olla relevantteja tutkimuskohteita evolutiivisessa polymerisaatiossa.<sup>12,13</sup> Synteettiset polymeerit (erityisesti ei-entsymaattisesti replikoitavat) ovat mielenkiintoisia, koska niiden fysikaalis-kemialliset

ominaisuudet ovat vapaammin räätälöitävissä kuin luonnollisten nukleiinihappojen tai proteiinien. Tämä laajentaa niiden sovellusmahdollisuuksia, joita ovat mm. lääkkeet, sensorit, katalyytit ja materiaalit.<sup>12</sup> Nukleiinihappoja muistuttamattomien (ts. nukleoemäksiä sisältämättömien) polymeerien DNA-templatoituun synteesiin on useita menetelmiä<sup>13</sup> (Kaavio 23). Nämä kaikki perustuvat adaptereina toimiviin nukleiinihappoihin tai niiden analogeihin, jotka asettavat polymeerin rakenneyksiköt templaatin määräämään järjestykseen. Rakenneyksiköiden polymerisoimiseen on olemassa laaja joukko potentiaalisia ligaatioreaktioita.<sup>44</sup> Polymerisaation jälkeen valmis polymeeri voidaan irrottaa nukleoemäsadaptereista<sup>13</sup>



**Kaavio 23** Menetelmiä nukleiinihappotemplatoituihin polymeerisynteesiin. (a) Templatoitu rinnakkaispolymerisaatio: rakennusyksiköt (BB) liittyvät samassa vaiheessa toisiinsa. (b) Templatoitu peräkkäispolymerisaatio: BB:t liittyvät toisiinsa vaiheittain, kun asteittain lisätyt pidemmät adapterisekvenssit syrjäyttävät vanhat adapterit. (c) Autonominen polymerisaatio. DNA-kävelijä: Ribotsyymikatalyyysi katkaisee vaiheittain adapterisekvenssejä, mikä saa aikaan uusia adapterihybridisaatioita ja rakennusyksiköiden liittymisiä. Hybridisaatioketjureaktio: adapterisekvenssien ohjelmoitu polymerisaatio saa aikaan vaiheittaisen rakennusyksiköiden liittymisen toisiinsa. Kaavio on uudelleenjulkaistu kustantajan American Chemical Society luvalla.<sup>13</sup>



Yksinkertaisimmillaan polymeerin rakenneyksiköitä kantavat adapterit hybridisoituvat templaattiin samanaikaisesti, mikä indusoi polymerisoitumisen ja polymeerin ligatoitumisen templaatin päähän. Tämän jälkeen adapteri irrotetaan valmiista polymeeristä (Kaavio 23a).<sup>9,73,115</sup> Tämä on potentiaalisesti atomitehokkain ratkaisu templatoituun polymeerien tuottoon. Toisessa yksinkertaisessa menettelyssä polymerisaatio tapahtuu vaiheittain templaatin päähän. Tämä toteutetaan lisäämällä reaktioastiaan yhä pidempiä polymeerin palasia kantavia adapterisekvenssejä, jotka syrjäyttävät niitä edeltävän lyhyemmän adapterin templaattista (Kaavio 23b).<sup>116</sup> Polymerisaatio ollaan toteutettu myös DNA-kävelijällä<sup>117</sup> ja hybridisaatioketju-reaktiolla<sup>118</sup> (Kaavio 23c). Näiden etuna on minimaaliset manuaaliset vaiheet itse polymerisaatiossa: ne vaativat vain templaatin ja polymeerien palasia kantavien adapterisekvenssien lisäämisen polymerisaation käynnistämiseksi. Kaikille menetelmille on yhteistä, että syntyvän polymeerin rakenne on tunnistettavissa ja monistettavissa siihen liitetystä DNA-templaatin sekvenssistä. Tämä mahdollistaa laajojen polymeerikirjastojen luomisen ja hyödyllisten polymeerien valinnan yhdessä astiassa.<sup>13</sup>

Vaikkakin DNA-templaatti on ideaalinen merkkaurakenne sen helpon monistettavuuden ja sekvensoinnin kannalta, templaatti-polymeeri -rakenteella on aina pelkästä polymeeristä eroavat ominaisuudet. Esimerkiksi laskostuminen, liukoisuus ja affiniteetti muita molekyyliä kohtaan voi muuttua, mikä aiheuttaa epätarkkuutta valintaprosessiin. Siitä huolimatta, DTS-kirjastoista ollaan affiniteettivalinnalla jo eristetty biologisten kohteiden inhibiittoreita<sup>119-121</sup> sekä antagonisteja<sup>122</sup> ja nukleiinihappojen replikaatiota katalysoivia ribotsyymejä<sup>111</sup>. Epätarkkuustekijän merkittävyys on siis tilannekohtaista, ja kirjastojen laajuus kompensoi ongelmaa. Tarkempien sekä monimutkaisempien funktioiden seulomiseksi olisi kuitenkin hyödyllistä, jos templaatti voitaisiin irrottaa polymeeristä jo ennen valintavaihetta.

Templaatin ja tuotteen välinen yhteys tulisi kuitenkin jotenkin säilyttää reaktioastiassa, missä on useita rinnakkain kehitettäviä polymeerejä, sillä satunnaisten (ja ei-luonnollisten) polymeerien rakenteen selvitys on muuten hyvin vaikeaa. Toki eri polymeerit voidaan syntetisoida erillisissä reaktioastioissa,<sup>123</sup> mutta tämä on yhden astian syntetiikkaa hitaampaa. Laajojen kirjastojen tuotto usean astian ohjatulla evoluutiolla vaatisi tehoseulontamenetelmistä<sup>124</sup> käytettyjä laitteistoja, eikä se siten hyödyntäisi DNA-templatoidun polymerisaation potentiaalia täysimääräisesti. Toisaalta



erilliset astiat voisivat olla parhaimmillaan keinotekoisia soluja, joilla valintapaine voitaisiin toteuttaa yksilöiden selviytymiseen pohjautuvana.

Varsinaista evoluutiosykliä ei ole vielä toteutettu ei-luonnollisten polymeerien DNA-templatoidussa synteesissä. Puuttuva palanen on valinnasta selviytyneen polymeerin ”geneettisen koodin” mutatoiminen ja toisen sukupolven kirjaston luominen.<sup>13</sup> Ottaen huomioon proteiinien evoluutiossa käytettyjen mutageneesimenetelmien laajan kirjon<sup>101</sup>, demonstroitaneen ei-luonnollisen polymeerin täysi evoluutiosykli lähivuosina. Vaikkakin DNA-templatoituun polymeerisynteesiin on jo kehitetty menetelmiä, vaatii vesiliukoisten rakennuspalojen (adapterien) kehitys vielä työtä, jotta laajoja polymeerikirjastoja voitaisiin kehittää.<sup>13</sup> Vesiliukoisuus on välttämätöntä, kun kehitetään biologisiin systeemeihin vaikuttavia polymeerejä. Nukleiinihappoanalogien tutkiminen on tässä mielessä tärkeää perustutkimusta. PNA on jo osoittautunut lupaavaksi adapteriksi, koska siihen voidaan liittää monenlaisia sivuketjuja jotka eivät häiritse PNA:n DNA-templatoitua polymerisaatiota.

## 4.2. Synteettiset solut

Synteettisen solujen luominen on mielenkiintoista alkukantaisen elämän prosessien ja kehityksen sekä myöskin nykyisten solujen toiminnan ymmärtämisen vuoksi. Synteettisillä soluilla on myös lukuisia potentiaalisia teknologisia sovelluskohteita. Esimerkiksi geenimanipulatiivisesti muokattuja mikrobeja käytetään jo erilaisten yhdisteiden tuotannossa. Geeniteknologian kehittymisen myötä myös geenimanipulatiivinen sairauksien hoito on relevantti lääketieteen tutkimuskohde. Nämä tavat muokata solun toimintaa ylhäältä alaspäin (top-down) ovat jo realisoineet osan synteettisen elämän mahdollisuuksista.

Solujen valmistamista voidaan lähestyä myös alhaalta ylöspäin (bottom-up), jolloin elävä solu rakennetaan *de novo* elottomista komponenteista. Tämä menettely sopii toimivan solun minimaalisten rakenteiden tutkimiseksi. Protosolut, joissa on solun toiminnan kannalta minimaaliset rakenteet, ovat erityisen mielenkiintoisia prebioottisen maailman ja varhaisen evoluution tutkimuksessa. Toisaalta solujen toimintaa mallintamalla voitaisiin kehittää itseään korjaavia nanokoneistoja, jotka suorittavat erityisiä tehtäviä.<sup>125</sup> Lisäksi ne voisivat optimoida itseään evolutiivisesti. Synteettisistä soluista on povattu suoranaisia lääkehoidon mullistajia, jossa ne ihmiselimistöön injektoiduna tunnistaisivat spesifisen kohteen sekä tuottaisivat ja vapauttaisivat lääkeaineen *in situ*.<sup>126</sup> Niiden on ajateltu myös kykenevän säätämään solusignaalintia tai jopa korvaamaan solujen normaalia toimintaa (esim. synteettiset punasolut<sup>127</sup>).

Toimivista soluista ei olisi myöskään pitkä matka kudoksiin ja elimiin<sup>128</sup>, jotka voisivat suorittaa tehtäviä laajemmassa ja suuremmassa skaalassa. Nämä ovat eittämättä futuristisia visioita, mutta viimeaikaiset saavutukset protosolujen rakentamisessa viittaavat niiden olevan realistisia. Yksinkertaisimmillaan Darwinistiseen evoluutioon kykenevä protosolu koostuu jonkinlaisen kalvon sisään suljetusta replikoitumaan kykenevästä geneettisestä materiaalista, jonka informaation pohjalta valmistuu funktionaalisia polymeerejä (taikka geneettinen materiaali on toiminnallinen itsessään). Geneettisen materiaalin replikaation täytyy olla jossain määrin virhealtista, jotta evoluutio olisi mahdollista. Lisäksi tällaisen solun olisi tuotettava jälkeläisiä, eli kyetä replikoitumaan useammaksi yksiköksi.<sup>129</sup>

Sopivan itsenäisesti replikoituvan geneettisen materiaalin löytäminen on yksi suurimmista haasteista sellaisten protosolujen kehityksessä, jotka mallintaisivat elämää ennen proteiinien olemassaoloa. RNA:n funktionaalisuuden vuoksi on ehdotettu, että RNA olisi toiminut prebioottisessa maailmassa yksin sekä geneettisenä materiaalina että funktiona.<sup>8,130,131</sup> RNA:n polymerisaatioon tunnetaan useita prebioottisesti relevantteja nukleotidien aktivaatiomenetelmiä,<sup>35,46,48,132,133</sup> mineraalikatalyyttejä<sup>134-136</sup> ja mikro- ympäristöjä<sup>137-139</sup>, mutta lisäksi on ehdotettu, että RNA:ta olisi edeltänyt jokin alkukantainen helpommin polymerisoituva yhdiste.<sup>140</sup> PNA on mielenkiintoinen kandidaatti prebioottiseksi<sup>141</sup> geneettiseksi materiaaliksi, johtuen sen proteiineja muistuttavasta rakenteesta ja kyvystä replikoida itseään.<sup>142,143</sup> Myös boronihappoanalogien on todettu kykenevän itsenäiseen replikaatioon,<sup>91</sup> ja booriyhdisteiden on ehdotettu nopeuttaneen RNA:han tarvittavaa riboosin muodostusta prebioottisessa maailmassa.<sup>144</sup> Nämä RNA:lle vaihtoehtoiset geneettiset materiaalit, joiden kemialla ei rajoita luonnon polymeerien ominaisuudet, ovat mielenkiintoisia myös teknologisesti sovellettavien synteettisten solujen kannalta.

RNA:n sekä muiden geneettisten materiaalien monomeerivaiheittaisessa ei-entsymaattisessa polymerisaatiossa ja replikaatiossa kehitys on ollut viime vuosikymmenten aikana huomattavaa, mutta menetelmät eivät ole vielä tarpeeksi tehokkaita useita genejä sisältävän sekvenssin replikaatioon. Lisäksi suuri ongelma RNA:n ei-entsymaattisessa replikoimisessa on tuotteen erottaminen templaatista, sillä yksinkertaisimmatkin ribotsyymit ovat vähintään 30 nukleotidia pitkiä,<sup>61,145</sup> ja tämän pituisten RNA-dupleksien sulamispisteet ovat jo yli 100 °C.<sup>146</sup> Lämpötilan noston lisäksi myös reaktioliuoksen viskositeetin kasvu saa templaatti-tuote-dupleksin dissosioitumaan.<sup>147</sup>

Toinen vaikeus protosolujen rakentamisessa on solukalvon kontrolloitu kasvu ja jakaantuminen, jonka pitäisi vielä toimia samoissa olosuhteissa kuin RNA:n replikaatio (tai muun geneettisen materiaalin). Nykysolujen fosfolipidit ovat vaikeita protosolujen kalvorakenteina, sillä ne eivät päästä varautuneita pienmolekyylejä, kuten nukleotideja, kalvon ulkopuolelta sisälle. Fosfolipidien tapaan myös rasvahapot muodostavat vedessä suljettuja kaksoiskalvorakenteita ja pystyvät varastoimaan sisälleen oligonukleotideja.<sup>148</sup> Lisäksi rasvahapoista muodostuneet vesikkelit kykenevät kasvamaan ja jakaantumaan menettämättä sisällään olevia oligonukleotideja ympäristöön.<sup>149</sup> Rasvahapot muodostavat heikompia vesikkeleitä kuin fosfolipidit, mutta päästävät sisäänsä sokereita, monofosfaatinukleotideja sekä myös aktivoituja 2-MeIm-nukleotideja. Rasvahappovesikkelin sisään suljettu poly-dC-templaatti ollaan onnistuttu replikoimaan vesikkelin ympäristöstä diffusoituneilla 2-MeIm-3'-aminonukleotideilla.<sup>150</sup> Huomattavaa on, että rasvahappovesikkelit ovat lähtökohtaisesti huonosti yhteensopivia nukleinihapon replikaation kanssa, sillä nukleinihapon replikaatiota edistävät  $Mg^{2+}$ -ionit saostavat rasvahappoja.<sup>129</sup> Tässä vuonna 2008 onnistuneessa replikaatiossa  $Mg^{2+}$ -ionit kelatoitiin bisiinillä.<sup>150</sup>

On mielenkiintoista nähdä, miten protosolujen kehitys jatkuu tehokkaamman aktivaation (AIm) ja varauksettomien nukleosidianalogien (boronihappoanalogit) löytämisen myötä. Vesikkeleitä on valmistettu fosfolipidien ja rasvahappojen lisäksi myös monista muista materiaaleista, joilla on saavutettu kasvamaan tai jakaantumaan kykenemättömiä, mutta toisaalta hyvin pysyviä rakenteita.<sup>151-153</sup> Tällaiset rakenteet ovat omiaan, mikäli halutaan ”konemaisia” soluja teknologisiin sovelluksiin, joissa vaaditaan rakenteellista kestävyyttä, eikä solun jakaantuminen tai koon kasvu ole toivottua.

## 5. Yhteenveto ja päätelmät

Ei-entsymaattisen nukleinihaptemplatoidun polymerisaation tutkimus alkoi 50 vuotta sitten, kun kaksi oligodeoksinukleotidia liitettiin toisiinsa DNA-templaatin katalysoimana. Pian tästä eteenpäin, nukleinihappojen ei-entsymaattisen replikaation paradigmaksi muodostui 2-MeIm, jota käytettiin alukkeeseen liitettävän nukleotidin 5'-fosfaatin lähtevänä ryhmänä. Lähtevänä ryhmänä 2-MeIm osoittautui kuitenkin riittämättömäksi esiaktivaatioksi, sillä A- ja U/T-tähteet eivät liittyneet alukkeeseen toivotulla nopeudella ja spesifisyydellä. Näitä tähteitä onnistuttiin myöhemmin liittämään paremmin OAt-nukleotideina, mutta etenkin vastikään (2017) julkaistu AIm vaikuttaa lupaavalta lähtevältä ryhmältä. Myös tuoret (2010) *in situ* -

aktivaatiomenetelmät osoittavat, että nukleiinihappojen ei-entsymaattisen replikaation tavoittelu on yhä tänäkin päivänä perusteltua.

Dynaaminen kombinatorinen kemia nukleosidianalogeilla sai alkunsa vuonna 1992 reduktiivisen aminaation hyödyntämisellä. Reduktiivinen aminaatio on erittäin etäisyydestä riippuvainen reaktio nukleiinihappotemplaattilla, mikä tekee siitä loistavan reaktion templaattispesifiin oligomerisaatioreaktioihin. Lisäksi reduktiivisella aminaatiolla demonstroititiin yhä tänäkin päivänä harvinaislaatuinen ominaisuus: templaatin irtoaminen replikaatiotuotteesta (turnover). Samaan aikaan kun reduktiivista aminaatiota tutkittiin oligomerisaatioreaktiona, kehitettiin nukleiinihappojen kanssa tehokkaasti ja spesifisesti hybridisoituva PNA. Pian PNA:sta kehitettiin versio, jonka yksiköt voitiin ligatoida reduktiivisella aminaatiolla toisiinsa. Tetrameeristen PNA-yksiköiden oligomerisaatio onnistui DNA-templatoituna reaktiona 40-meereiksi asti. Oligomerisaatio onnistui edelleen loistavasti, vaikka PNA-yksikköihin liitettiin erityyppisiä aminohappojen sivuketjuja. Tämän vuoksi PNA vaikuttaa erittäin lupaavalta rakenteelta monimuotoisten polymeerien templaatoituun valmistukseen.

Nukleosidien boronihappoanalogit ovat uusin idea DNA:n informaation replikointiin. Se ei sisällä reduktiiviselle aminaatiolle ominaista irreversiibeliä vaihetta, ja lienee siten ainut täysin dynaamiseen kombinatoriseen kemiaan perustuva DNA-sekvenssin replikointimenetelmä (pl. emäspaikkausmenetelmät tPNA:lla). Reversiibelin boronihappoligaation tasapainon asemaa voidaan hallita pelkästään reaktioliuoksen happamuutta säätämällä (pH 6,5–9,5). Happamuus vaikutti myös boronihappoligaation etäisyysriippuvuuteen ja siten templaattispesifisyyteen. Lisäksi boronihappoanalogien havaittiin myös kykenevän katalysoimaan toistensa oligomerisaatiota. Nämä ovat merkittäviä perustutkimuksellisia saavutuksia, mutta boronihappoanalogueilla on myös selkeästi sovellettavuutta mm. pistemutaatioiden osoituksessa.

Nämä kaikki saavutukset ovat olleet merkittäviä edistysaskeleita prebioottisen geenimaailman mallinnukseen, joka antaa vihjeitä alkuperästämmme, mutta on myös relevanttia maan ulkopuolisen elämän etsinnässä. Lisäksi protosolujen tutkimus voi tuottaa tietoa terveyteemme liittyvistä tekijöistä, ja synteettisillä soluilla voitaisiin myös mahdollisesti vaikuttaa siihen. Dynaamiseen kombinatoriseen kemiaan perustuvat polymeerit ja molekyylien ohjattu evoluutio ovat vihjeitä orgaanisen kemian uusista tuulista; ajasta jolloin biokemiallisten ilmiöiden monimutkaisuuteen yltyvien toiminnallisten molekyylien valmistaminen on arkipäivää. Tämän eteen on epäilemättä tehtävä vielä paljon perustason tutkimusta, mutta on jännittävää nähdä mitä seuraavat 50 vuotta nukleiinihappotemplatoidun polymerisaation parissa tuovat tullessaan.

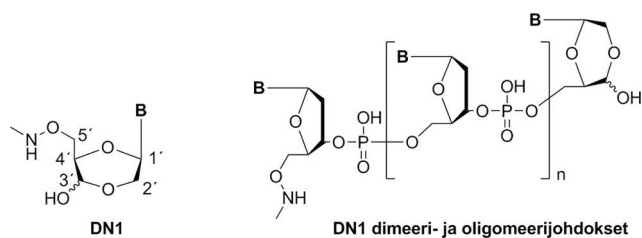
**KOKEELLINEN OSA:**

**Nukleiinihappotemplatoitu oligomerisaatio nukleosidien  
dioksaanianalogeilla**

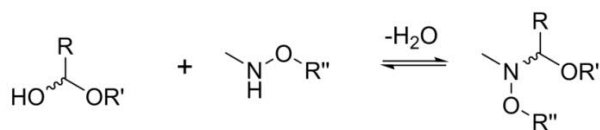
## 1. Johdanto

Erikoistyön tavoitteena oli muokata nukleosideista dioksaanianalogeja (Kuva 16), jotka soveltuisivat DCC-kirjastojen rakenneyksiköiksi (kuten boronihappoanalgit<sup>91</sup>). Tarkoituksena oli tutkia näiden rakenneyksiköiden ligaatio- ja oligomerisaatio-reaktioiden kinetiikkaa ja pH-riippuvuutta sekä myös DNA-templaatin vaikutusta reaktionopeuteen. Oligomerisaation oli tarkoitus tapahtua *N*(Me)-alkoksiamiinin ja hemiasetaalin välisellä kondensaatioreaktiolla (Kaavio 24).

Tämä idea on peräisin aiemmasta tutkimuksesta<sup>154</sup>, jossa 5'-*O*-(metyyliamino)-tymidiinin (**16**) havaittiin muodostavan *N*-glykosidisen sidoksen D-glukoosin kanssa. Tutkimuksen mukaan *N*-glykosylaation nopeus ja tasapainosaanto kasvoivat spesifisen DNA-templaatin katalysoimana. Lisäksi reaktion nopeus oli verrannollinen liuoksen happamuuteen (pH-alueella 4–7). Lievästi happamassa puskuriliuoksessa (pH 4–6) reaktiolla oli dynaaminen tasapainotila *N*-glykosidisen sidoksen muodostumisen suhteen, mutta neutraaleissa oloissa ja DNA-templaatin läsnäollessa muodostunut *N*-glykosidinen sidos oli pysyvä.



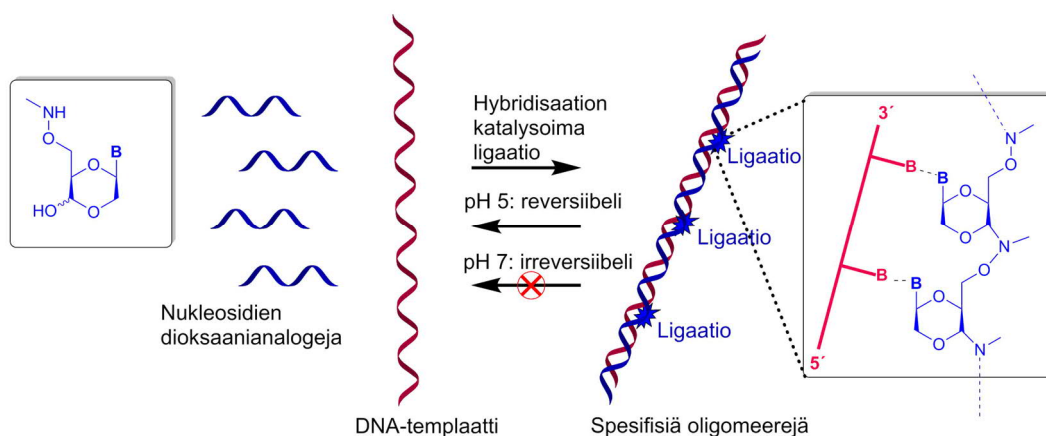
**Kuva 16** Erikoistyön kohdemolekyylit; nukleosidien ja oligonukleotidien dioksaanianalogit. Huom. dioksaanirenkaan numerointi noudattaa tässä erikoistyseselostuksessa luonnollisen nukleosidin sokerirenkaan numerointia (pl. nimeäminen, joka suoritetaan IUPAC-suositusten mukaisesti).



**Kaavio 24** *N*(Me)-alkoksiamiinin ja hemiasetaalin välinen kondensaatioreaktio.

Tässä erikoistyössä pyrittiin jalostamaan yllä kuvaillusta yksittäisestä DNA:n katalysoimasta *N*-glykosylaatiosta oligomerisaatioon johtava ligaatioiden sarja, joka käyttäytyisi sekä pH- että DNA-templaattiriippuvaisesti. Oligomerisaatioprosessin toivottiin siis olevan reversiibeli lievästi happamissa oloissa, mutta pH:n noston neutraaliksi pysäyttävän ligaatioreaktion etenemisen molempiin suuntiin. Lisäksi DNA-templaatin toivottiin katalysoivan oligomerisaatiota saattamalla ligatoituvat molekyylit toistensa läheisyyteen Watson–Crick-pariutumisen ja täten suosivan spesifisten oligomeerien rakentumista (Kaavio 25).

Suunnitellun lugaatioreaktion funktionaaliset ryhmät hemiasetaali ja *N*(Me)-alkoksiamiini jättävät tilaa laajalle joukolle difunktionaalisia nukleosidijohdoksia, jotka ovat potentiaalisia rakenteita DNA-templatoidulle oligomerisaatiolle. Synteettisen suoraviivaisuuden vuoksi erikoistyon kohderakenteeksi valittiin dioksaanianalogi **DNI** sekä sen dimeeri- ja oligomeerijohdokset (Kuva 16). Oligomeerien käyttöä tutkimuksessa puoltaa ajatus siitä, että suurempi määrä Watson–Crick-pareja per lugaatio edistäisi DNA-templaatin kykyä katalysoida ja ohjata oligomerisaatiota, jolloin DNA-katalysin teho olisi helpommin havaittavissa.



**Kaavio 25** DNA-templatoitu polymerisaatio nukleosidien dioksaanianalogeilla

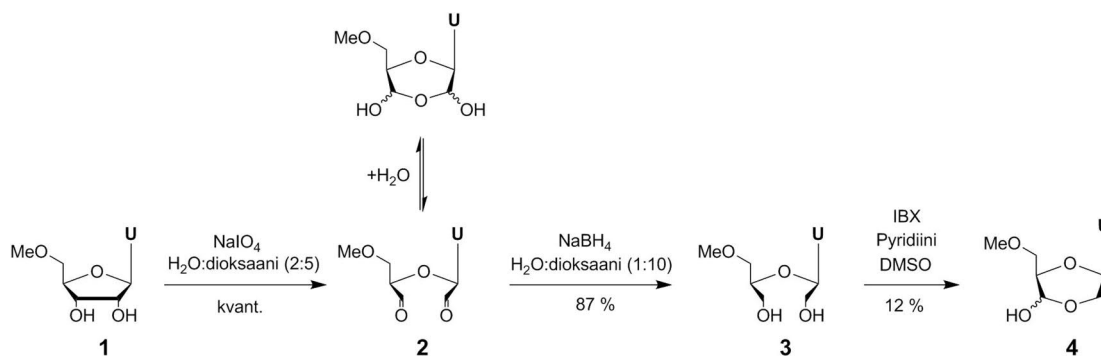
Oligomerisaatioon vaadittava difunktionaalisuus mahdollistaa myös kohderakenteiden intramolekulaariset reaktiot, mikä voi vaikeuttaa oligomerisaatio-reaktion etenemistä ja tulkintaa. Tämän vuoksi alkuun tutkittiin monofunktionaalisen dioksaanianalogin **4** heterobimolekulaarista dimerisaatiota nukleosidijohdokseen **16** (Kaavio 30 s. 53). Tästä saadut tulokset olivat vertailukelpoisia aiemmin tutkitun D-glukoosin *N*-glykosidaation kanssa. Työssä testattiin myös lyhyesti 2',3'-dialdehydiukleosidianalogin **2** lugaatiota 5'-*O*-metyyliaminotymidiiniin. Tämän ideana oli selvittää, voitaisiinko luonnollinen oligonukleotidi hapettaa 3'-päästä, ja sitten liittää siihen *N*(Me)-alkoksiamiinifunktiolla varustettu nukleosidijohdos tai muu konjugaatti.

## 2. Tulokset ja niiden tarkastelu

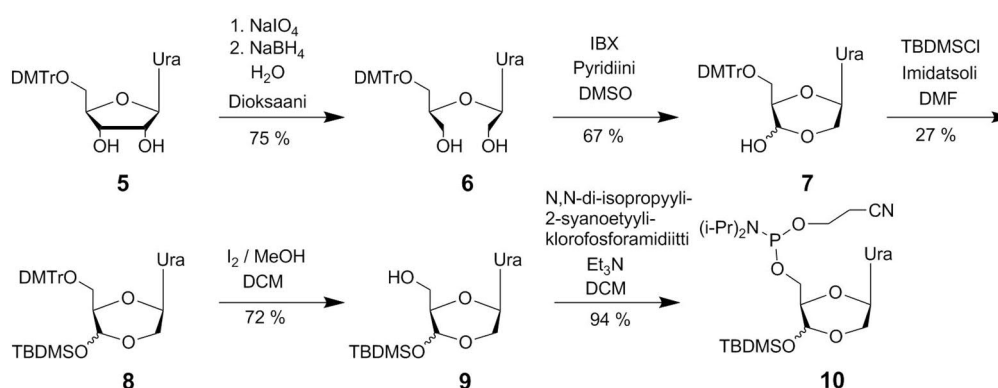
### 2.1. Nukleosidijohdosten synteetit

Työssä suoritettiin kolme erillistä monomeerien synteetiketjua. Ensimmäisessä ketjussa valmistettiin monofunktionaalinen dioksaanianalogi **4** (Kaavio 26) heterobimolekulaarisia dimerisaatioreaktioita varten. Toisessa monomeerisynteetiketjussa valmistettiin dioksaanipohjainen fosforamidiitti **10** (Kaavio 27) oligonukleotidijohdos-

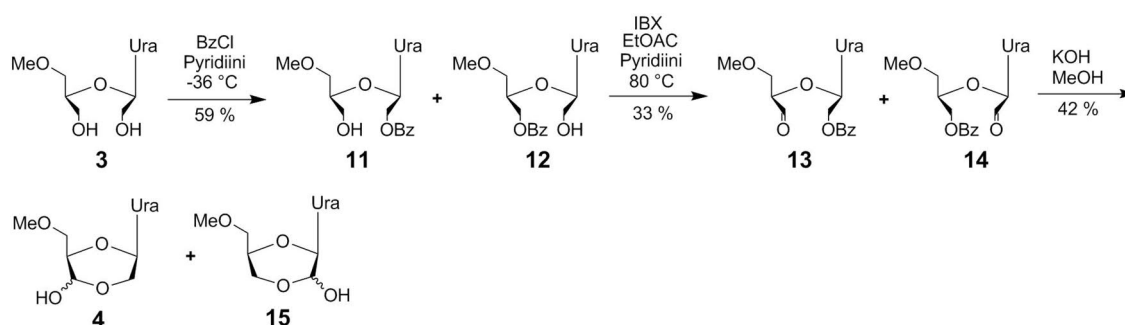
synteesien tarpeisiin. Kolmannessa ketjussa valmistettiin dioksaaninukleosidianalogin **4** hemiasetaalisen hydroksyyliiryhmän paikkaisomeeri **15**, joka on myös relevantti rakenne tutkittavaksi DNA-templatoidussa ligoatiossa (Kaavio 28).



**Kaavio 26** Monofunktionaalisen dioksaanianalogin **4** synteesiskeema.



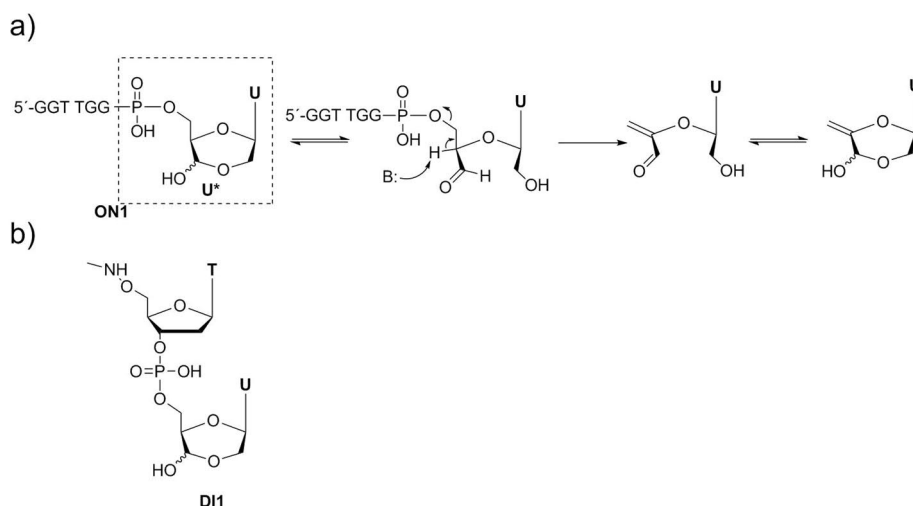
**Kaavio 27** Dioksaaninukleosidianalogin 5'-fosforamidiitin **10** synteesiskeema.



**Kaavio 28** Monofunktionaalisen dioksaanianalogin **15** synteesiskeema.

DNA-templatoituja ligoatioita varten valmistettiin 7-tähteinen oligonukleotidijohdos (5'-GGT TGG U\*, **ON1**), jonka 3'-päänä oli dioksaanipohjainen nukleotidi U\* (Kaavio 29a). Oligonukleotidin **ON1** todettiin kuitenkin hajoavan veteen liuotettuna, eikä sen DNA-templatoitua heterobimolekulaarista ligoatioseuranta 5'-päissä **NT1**:ä sisältävän oligonukleotidin kanssa toteutettu. Hajoamisen todettiin johtuvan dioksaanianalogin U\* spontaanista β-eliminaatiosta.





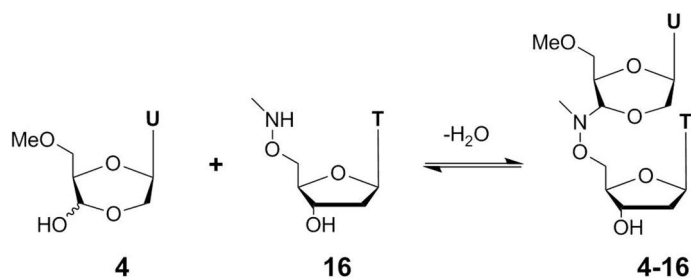
**Kaavio 29** a) Oligonukleotidi **ON1** ja dioksaanianalogin **U\***  $\beta$ -eliminaatio. b) Difunktionaalinen dimeeri **DII**.

Lopuksi valmistettiin difunktionaalinen dimeeri **DII** (Kaavio 29b). Dimeerillä **DII** spontaanin  $\beta$ -eliminaation kautta tapahtuvan hajoamisen osuus oli huomattavasti vähäisempi kuin oligonukleotidilla **ON1**, jonka vuoksi dimeerin **DII** katsottiin soveltuvan DNA-templatoitujen ligoation tutkimiseen.

## 2.2. Heteromolekulaariset ligoatioreaktiot

Ensimmäinen tarkasteltu ligoatioreaktio tapahtui nukleosidijohdosten **2** ja **16** välillä. Reaktiossa havaittiin muodostuvan useiden tuotteiden seos (Kaavio 34, s. 66), jonka koostumus jäi ajan puutteen vuoksi selvittämättä.

Toinen tarkasteltu ligoatioreaktio oli nukleosidijohdosten **4** ja **16** välinen dimerisaatio (Kaavio 30). Tällöin havaittiin yksi selkeä päätuote, joka eristettiin HPLC:llä (Kaavio 35, s. 67) ja karakterisoitiin massaspektrometrisesti ja NMR:n avulla kondensoituneen dimeerin **4-16**  $\beta$ -anomeeriksi (Kuva 20 s.67). Reaktiolle määritettiin puoliintumisajat ( $t_{1/2}$ ), tasapainosaannot ja tasapainovakiot ( $K$ ) pH:issa 4, 5 ja 6 (Taulukko 5). Tällä pH-alueella kaikki kolme määritettyä parametria olivat verrannollisia reaktioliuoksen emäksisyyteen.



**Kaavio 30** Nukleosidijohdosten **4** ja **16** välinen kondensaatioreaktio.

**Taulukko 5** Nukleosidijohdosten **4** ja **16** välisen dimerisaatioreaktion kineettiset parametrit [puoliintumisaika ( $t_{1/2}$ ), tasapainosaanto, tasapainovakio ( $K$ )] pH:issa 4, 5 ja 6.

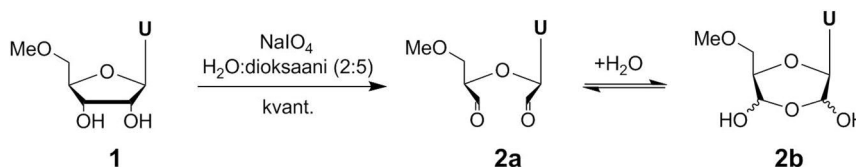
pH	$t_{1/2}$ / min	Tasapainosaanto / %	$K$ / mol <sup>-1</sup>
6	600	11	64
5	30	8,9	43
4	5	8,1	37

## 2.3. Kokeelliset menetelmät

### 2.3.1. Yleiset menetelmät

Vedettömissä synteesissä käytetyt liuottimet kuivattiin molekyyliaseuloilla ja astiat kuivattiin liekittämällä. HPLC-ajoissa käytettiin analyttistä käänteisfaasiakolonnia (C-18, 250 × 4,6 mm, 5 μm), virtausnopeutta 1,0 ml min<sup>-1</sup> ja detektioaallonpituutta 260 nm. NMR-spektrit mitattiin 500 MHz tai 600 MHz -laitteistolla (Bruker). Massaspektrit mitattiin Bruker ESI-microTOF-Q -massaspektrometrillä. UV-spektrofotometriset mittaukset tehtiin Jenway Genova Nano -laitteella.

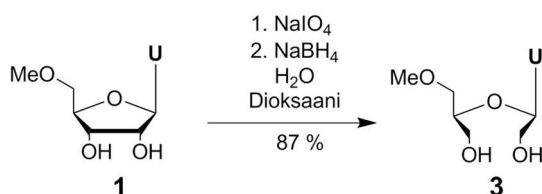
### 2.3.2. 5'-*O*-metyyliuridiinin NaIO<sub>4</sub>-hapetus (**2a**, **2b**)



**1** (0,5 g, 1,94 mmol) liuotettiin veden (2,5 ml) ja dioksaanin (12,5 ml) seokseen. Joukkoon lisättiin veteen (2,5 ml) liuotettu NaIO<sub>4</sub> (0,42 g, 1,94 mmol). Tunnin kuluttua reaktioseokseen oli muodostunut valkoinen sakka. Seokseen lisättiin dioksaania (10 ml) ja sen annettiin sekoittua vielä 15 min. Seos suodatettiin, ja suodatimeen kertynyttä valkoista sakkaa huuhdeltiin pienellä määrällä dioksaania. Suodos haihdutettiin kuiviin alipaineessa ja jäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (10 % MeOH, DCM). Tuote oli väritön viskoosi öljy (0,67 g, kvantitatiivinen saanto). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8,22 (br, 0,4H, NH), 7,90–7,83 (m, 1,7H), 7,80 (d, 0,5H,  $J = 8,4$  Hz), 5,94 (m, 2,3H), 5,87 (m, 1,2H), 5,63 (d, 0,4H,  $J = 8,4$  Hz), 5,55 (d, 0,5H,  $J = 7,2$  Hz), 5,43 (d, 0,4H,  $J = 7,8$  Hz), 5,32–5,27 (m, 0,8H), 5,25 (d, 1H,  $J = 4,2$  Hz), 5,21 (d, 0,6H,  $J = 7,8$  Hz), 5,14 (d, 1H,  $J = 4,2$  Hz), 5,10 (d, 0,7H,  $J = 7,8$  Hz), 4,98 (dd, 0,3H,  $J = 6,0$  & 2,4 Hz), 4,60 (t, 0,3H,  $J = 4,8$  Hz), 4,32 (m, 1,3H), 4,24–4,18 (m, 0,2H), 4,10–4,05 (m, 0,3H), 4,00–3,96 (m, 0,6H), 3,89–3,80 (m, 3H), 3,79 (s, 11H), 3,78–3,65 (m, 5H), 3,63–3,43 (m, 4,3H), 3,41 (d, 2,8H,  $J = 4,8$  Hz), 3,38 (s, 6,3H), 3,27 (s, 3,3H). <sup>13</sup>C NMR

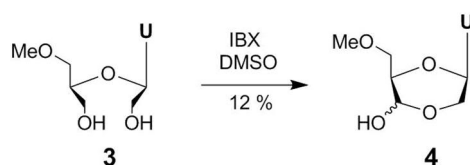
(150 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  166,3, 165,8, 163,9 152,2, 151,6, 151,5, 143,5, 142,8, 141,9, 141,8, 102,9, 102,9, 101,5, 101,3, 98,2, 91,1, 91,0, 90,6, 90,0, 89,0, 88,9, 87,0, 86,2, 82,1, 81,2, 81,6, 79,8, 79,3, 78,3, 76,9, 71,4, 70,5, 70,2, 70,1, 69,4, 69,2, 66,0, 65,6, 65,5, 65,5, 62,3, 62,3, 62,1, 60,0, 59,4, 58,8, 58,8, 58,5, 58,3, 48,9. ESI-MS (M+H<sup>+</sup>):  $m/z$  257,0 & 275,0; lasketut 257,07 & 275,23.

### 2.3.3. 5'-*O*-metyyli-2',3'-*seco*-uridiini (3)



**1** (200 mg, 0,78 mmol) liuotettiin veden (1,0 ml) ja dioksaanin (5,0 ml) seokseen. Joukkoon lisättiin veteen (1,0 ml) liuotettu NaIO<sub>4</sub> (182 mg, 0,85 mmol) ja reaktion annettiin edetä tunnin ajan. Tämän jälkeen reaktioseokseen lisättiin vielä dioksaania (4,0 ml) ja sen annettiin sekoittua 15 min. Seos suodatettiin, ja suodattimeen kertynyttä valkoista sakkua huuhdottiin kylmällä dioksaanilla (2 × 5 ml). Suodokseen lisättiin NaBH<sub>4</sub> (116 mg, 3,06 mmol). Puolen tunnin kuluttua reaktioseos neutraloitiin puskuriliuoksella (pyridiini:AcOH, 1:1, v/v). Seos suodatettiin ja liuottimet haihdutettiin pois alipaineessa. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (5 % H<sub>2</sub>O, MeCN). Tuote oli kirkas, väritön ja lasimainen aine (177 mg, 87 %).  $R_f = 0,31$  (5 % H<sub>2</sub>O, MeCN). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  7,83 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H6), 5,97 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz, H5), 5,95 (t,  $J = 5,5$  Hz), 3,91–3,76 (m, 7,5H), 3,74–3,66 (m, 6H), 3,52 (m, 2H), 3,29 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  166,3, 152,1, 142,5 (C6), 101,9 (C5), 84,6, 79,3, 71,9, 71,6, 62,5, 61,8, 60,7, 60,5, 58,2 (OCH<sub>3</sub>). ESI-MS (M+Na<sup>+</sup>):  $m/z$  283,0899; laskettu: 283,0906.

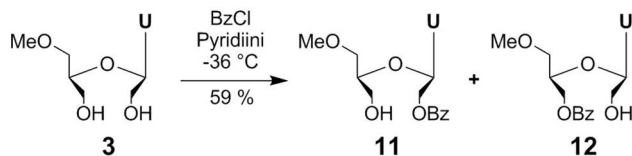
### 2.4.4. (2*R*/*S*,3*R*,5*R*)-3-(metoksimetyyli)-2-hydroksi-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (4)



IBX (102 mg, 0,36 mmol) suspensioitiin kuivaan DMSO:hon (1,0 ml). Suspension joukkoon lisättiin kuivaan DMSO:hon (2,5 ml) liuotettu **3** (176 mg, 0,68 mmol). Kahden tunnin kuluttua reaktioseokseen lisättiin vettä (4 ml), ja seoksen annettiin sekoittua 15 min. Seos suodatettiin ja suodos konsentroidtiin haihduttamalla liuottimet

alipaineessa. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (5 % H<sub>2</sub>O, MeCN). Tuote oli kirkas, väritön ja lasimainen kiinteä aine (70 mg, 39 %). Tuote puhdistettiin vielä HPLC:llä [semipreparatiivinen käänteisfaasikolonne (C-18, 250 × 10 mm, 8 μm), gradientti 0–100 % MeCN 50 mM TEAA (pH 7) 0–20 min]. Kahden puhdistuksen jälkeinen saanto (21,5 mg, 12 %) määritettiin UV-spektrofotometrisesti detektioaallonpituudella 260 nm.  $R_f = 0,52$  (5 % H<sub>2</sub>O, MeCN). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7,74 (m, 3,6H), 5,92 (t, 0,8H,  $J = 5,4$  Hz), 5,83 (m, 6H), 5,02 (d, 0,7H,  $J = 4,8$  Hz), 4,99 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz), 4,82 (1,4H,  $J = 7,8$  Hz), 4,19 (m, 1H), 3,98 (m, 2,5H), 3,84–3,75 (m, 3,8H), 3,74–3,45 (m, 10,4H), 3,41 (m, 1H), 3,33 (s, 4,8H), 3,32 (s, 3H), 3,30 (s, 0,7H), 3,16 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 166,3 166,0, 152,2 ,151,2, 151,1, 142,7, 141,9, 141,8, 102,8, 102,5, 102,4, 101,9, 92,2, 91,4, 89,0, 87,1, 85,6, 81,4, 78,7, 78,3, 78,1, 77,1, 75,2, 71,4, 70,7, 70,5, 70,2, 65,9, 65,2, 61,6, 58,8, 58,2, 58,6, 58,5, 58,3. ESI-MS (M+Na<sup>+</sup>):  $m/z$  281,0756; laskettu: 281,0750.

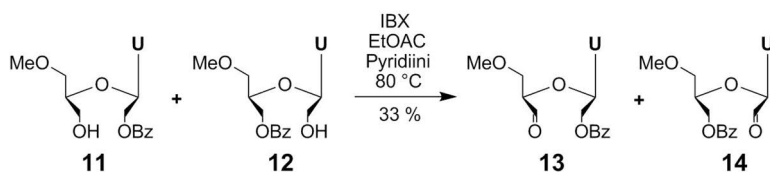
### 2.3.5. 2'- ja 3'-bentsooyli-5'-*O*-metyyli-2',3'-*seco*-uridiini (11, 12)



**3** (0,49 g, 1,88 mmol) kuivattiin haihduttamalla siitä kahdesti kuivaa pyridiiniä (10 ml) ja pitämällä haihdutusjäännöstä yön yli vakuumissa fosforipentoksidin päällä. Kuivattu **3** liuotettiin kuivaan pyridiiniin (50 ml) ja seos jäähdytettiin –36 °C:een. Seokseen lisättiin tipoitain pyridiiniin (5 ml) liuotettua bentsooylikloridia (240 μl, 2,07 mmol). Tunnin kuluttua reaktioseokseen lisättiin uudelleen tipoitain pyridiiniin (2 ml) liuotettua bentsooylikloridia (43 μl, 0,37 mmol). Puolen tunnin kuluttua jäähdytys poistettiin ja reaktioseokseen lisättiin etanolia (10 ml). Seoksen saavutettua huoneenlämmön, se konsentroidiin haihduttamalla liuottimet alipaineessa. Haihdutusjäännös liuotettiin DCM:iin (100 ml). Orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:n vesiliuksella (2 × 35 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin NaSO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Haihdutusjäännös haihdutettiin toluenista (2 × 10 ml) pyridiinin poistamiseksi, ja puhdistettiin sitten silikageelikromatografisesti (5 % MeOH, EtOAc). Tuote oli NMR:n perusteella paikkaisomeerien **11** ja **12** seos (2'OBz : 3'OBz, 2,5 : 1) ja olemukseltaan kellertävä ja viskoosi öljy (0,40 g, 59 %).  $R_f = 0,33$  (5 % MeOH, EtOAc). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,61 (br, 0,4H, NH<sub>3</sub>'O), 9,53 (br, 1H, NH<sub>2</sub>'O), 7,97 (dd, 0,8H,  $J = 8,4$  & 1,2 Hz, Bz<sub>3</sub>'O), 7,90 (dd, 2H,  $J = 8,4$  & 1,2 Hz, Bz<sub>2</sub>'O), 7,50–7,47 (m, 2H, H6 & Bz<sub>2</sub>'O),

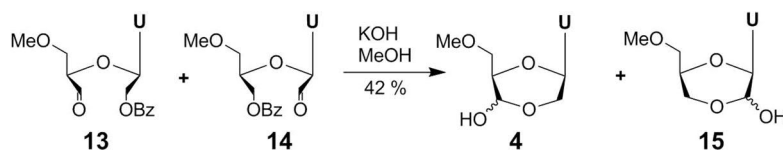
7,50–7,47 (m, 0,4H, Bz<sub>3'</sub>O), 7,43 (d, 0,4H, *J* = 8,4 Hz, Bz<sub>3'</sub>O), 7,40–7,34 (m, 2H, Bz<sub>2'</sub>O), 7,40–7,34 (m, 0,8H, Bz<sub>3'</sub>O), 6,21 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz, H1'<sub>2'</sub>O), 5,98 (t, 0,4H, *J* = 5,4 Hz, H1'<sub>3'</sub>O), 5,70 (dd, 1H, *J* = 8,4 & 1,2 Hz, H5<sub>2'</sub>O), 5,67 (dd, 0,4H, *J* = 8,4 & 1,2 Hz, H5<sub>3'</sub>O), 4,54 (dd, 0,4H, *J* = 12 & 3,6 Hz, H3'<sub>3'</sub>O), 4,48–4,42 (m, 2H, H2'<sub>2'</sub>O), 4,28 (dd, 0,4H, *J* = 12 & 5,4 Hz, H3'<sub>3'</sub>O), 3,99 (m, 0,4H, H4'<sub>3'</sub>O), 3,80 (m, 1H, H4'<sub>2'</sub>O), 3,72–3,58 (m, 2H, H3'<sub>2'</sub>O), 3,72–3,58 m (m, 1,2H, H2'<sub>3'</sub>O, 2'-OH<sub>3'</sub>O), 3,40 (dd, 0,8H, *J* = 5,4 Hz, H5'<sub>3'</sub>O), 3,33 (m, 2H, H5'<sub>2'</sub>O), 3,21 (s, 1,2H, OMe<sub>3'</sub>O), 3,18 (s, 3H, OMe<sub>2'</sub>O), 2,83 (br, 1H, 3'-OH<sub>2'</sub>O). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 166,4 (Bz<sub>3'</sub>O), 165,9 (Bz<sub>2'</sub>O), 163,7 (C4<sub>3'</sub>O), 163,5 (C4<sub>2'</sub>O), 151,4 (C2<sub>3'</sub>O), 151,0 (C2<sub>2'</sub>O), 140,6 (C6<sub>3'</sub>O), 140,1 (C6<sub>2'</sub>O), 133,5 (Bz<sub>2'</sub>O), 133,4 (Bz<sub>3'</sub>O), 129,7 (Bz<sub>2'</sub>O), 129,5 (Bz<sub>3'</sub>O), 129,0 (Bz<sub>2'</sub>O), 128,6 (Bz<sub>2'</sub>O), 128,5 (Bz<sub>3'</sub>O), 102,4 (C5<sub>2'</sub>O), 102,2 (C5<sub>3'</sub>O), 84,2 (C1'<sub>3'</sub>O), 82,2 (C1'<sub>2'</sub>O), 80,5 (C4'<sub>2'</sub>O), 77,2 (C4'<sub>3'</sub>O), 72,5 (C5'<sub>2'</sub>O), 72,1 (C5'<sub>3'</sub>O), 64,0 (C2'<sub>2'</sub>O), 63,6 (C3'<sub>3'</sub>O), 63,3 (C2'<sub>3'</sub>O), 62,1 (C3'<sub>2'</sub>O), 59,1 (OMe<sub>3'</sub>O, OMe<sub>2'</sub>O). ESI-MS (M+Na<sup>+</sup>): *m/z* 387,1183; laskettu: 387,1169.

### 2.3.6. 2'- ja 3'-bentsoyyli-5'-*O*-metyyli-2',3'-*seco*-uridiinin IBX-hapetus (13, 14)



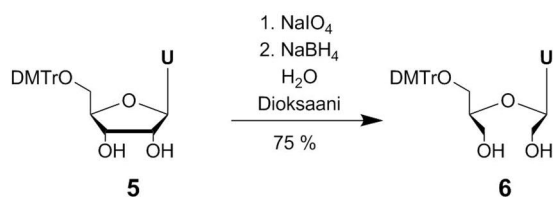
IBX (0,28 g, 1,0 mmol) suspensoitiin kuivaan etyyliasetaattiin (35 ml), jossa oli pyridiiniä (220 µl), ja seos kuumennettiin 80 °C:een. Seokseen lisättiin etyyliasetaattiin (10 ml) liuotettu paikkaisomeerien **11** ja **12** seos (202 mg, 1,11 mmol). Reaktioseoksen lämmitystä ylläpidettiin 5 tuntia, jonka jälkeen se jäähdytettiin 0 °C:een. Seos suodatettiin, ja suodattimeen kertynyttä kellertävää sakkua huuhdottiin kylmällä etyyliasetaatilla (2 × 10 ml). Suodos haihdutettiin kuiviin ja puhdistettiin silikageelikromatografisesti (5 % MeOH, EtOAc). Tuote oli kirkas, väritön ja lasimainen aine (135 mg, 33 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10,0 (br, 0,4H), 9,68 (br, 0,2H), 8,08 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 8,06–7,87 (m, 1,4H), 7,64–7,48 (m, 1,7H), 7,47–7,32 (m, 2,5H), 6,33 (m, 0,2H), 6,25 (t, 0,2H, *J* = 5,4 Hz), 5,82 (d, 0,2H, 7,8 Hz), 5,78 (t, 0,2H, *J* = 8,4 Hz), 4,73–4,35 (m, 1,5H), 4,30 (m, 0,2H), 3,85–3,16 (m, 3,4H), 2,16 (s, 0,4H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 207,4, 198,2, 197,8, 171,0, 165,7, 163,8, 151,1, 139,8, 133,6, 133,5, 130,2, 129,8, 130,2, 129,8, 129,8, 129,8, 129,7, 128,9, 128,6, 128,6, 128,6, 128,5, 128,5, 128,5, 128,5, 128,4, 103,4, 103,0, 102,0 97,1, 83,4, 82,3, 81,1, 71,7, 70,7, 70,7, 63,4, 59,5, 59,3, 58,9, 55,1, 30,9. ESI-MS (M+Na<sup>+</sup>): *m/z* 385,1011; laskettu: 385,1012.

**2.3.7. (2*R*/3*R*,5*R*)-2-hydroksi-3-(metoksimetyyli)-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani ja (3*R*/5*R*,3*R*,5*R*)-2-hydroksi-5-(metoksimetyyli)-3-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (4, 15)**



Paikkaisomeerien **13** ja **14** seos (60 mg, 0,16 mmol) liuotettiin kuivaan metanoliin (2,0 ml) ja liuos viilennettiin 0 °C:een. Liuoksen joukkoon lisättiin kuivaan metanoliin (9,0 ml) liuotettu KOH (82 mg, 1,46 mmol). Tunnin kuluttua reaktioseokseen lisättiin kylläistä NH<sub>4</sub>Cl:n vesiliuosta (2,3 ml) ja sen annettiin sekoittua vielä 10 min. Seokseen lisättiin kylläistä NaCl:n vesiliuosta (6,0 ml), ja tuotteet uutettiin DCM:iin (3 × 30 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:llä, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Pieni osa haihdutusjäännöksestä puhdistettiin HPLC:llä. Kokonaissaanto (18 mg, 42 %) määritettiin puhdistuksen HPLC-kromatogrammista. NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7,79 (m, 1H), 7,74–7,68 (m, 1,5H), 7,47 (m, 0,6H), 7,40 (t, 0,4H, *J* = 7,2 Hz), 5,92 (t, *J* = 5,4 Hz), 5,86–5,78 (m, 2,8H), 5,01 (d, 0,3H, *J* = 4,8 Hz), 4,99 (d, 0,4H, *J* = 1,8 Hz), 4,90 (m, 0,4H), 4,82 (d, 0,6H, *J* = 8,4 Hz), 4,2 (m, 0,6H), 4,02–3,84 (m, 2,3H), 3,82–3,35 (m, 8,4H), 3,31 (m, 3,5H), 3,17–3,09 (m, 12,6H), 2,99 (m, 1H), 1,84 (s, 3,7H), 1,20 (t, 18H, *J* = 7,8 Hz), 0,92–0,83 (m, 0,8H). ESI-MS (M+Na<sup>+</sup>): *m/z* 281,0790; laskettu: 281,0750.

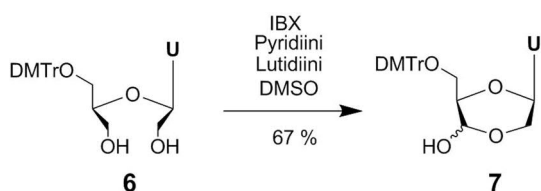
**2.3.8. 5'-O-(4,4'-dimetoksitrityyli)-2',3'-seco-uridiini (6)**



**5** (7,56 g, 13,8 mmol) liuotettiin veden (40 ml) ja dioksaanin (190 ml) seokseen. Joukkoon lisättiin veteen (40 ml) liuotettu NaIO<sub>4</sub> (3,24 g, 15,2 mmol). Reaktioon annettiin edetä kahden tunnin ajan, jolloin seokseen muodostui valkoinen sakka. Reaktioseokseen lisättiin vielä dioksaania (150 ml) ja sen annettiin sekoittua 15 min. Seos suodatettiin, ja suodatimeen kertynyttä sakkaa huuhdottiin kylmällä dioksaanilla (3 × 40 ml). Suodokseen lisättiin NaBH<sub>4</sub> (2,09 g, 55,0 mmol). Puolen tunnin kuluttua reaktioseos neutraloitiin puskuriliuoksella (pyridiini:AcOH, 1:1, v/v). Seos suodatettiin ja suodos konsentroidiin haihduttamalla liuottimet alipaineessa. Haihdutusjäännös uutettiin etyyliasetaattiin (160 ml) ja orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:n vesiliuoksella (2 × 50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja

haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (5 % MeOH, 0,5 % TEA, EtOAc). Tuote oli valkoinen vaahto (5,85 g, 77 %).  $R_f = 0,28$  (5 % MeOH, EtOAc).  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  11,34 (br, NH), 7,64 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, H6), 7,32–7,26 (m, 4H, Ar), 7,22–7,16 (m, 5H, Ar), 6,87–6,84 (m, 4H, Ar), 5,82 (t, 1H,  $J = 5,4$  Hz, H1'), 5,53 (dd, 1H,  $J = 7,8$  & 1,8 Hz, H5), 5,13 (t, 1H,  $J = 6,0$  Hz, OH-2'), 4,74 (t, 1H,  $J = 6,0$  Hz, OH-3'), 3,73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,68 (m, 1H, H4'), 3,60 (m, 2H, H2'), 3,41 (t, 2H,  $J = 5,4$  Hz, H3'), 3,00 (dd, 1H,  $J = 10,2$  & 7,2 Hz, H5'), 2,94 (dd, 1H,  $J = 10,2$  & 3,6 Hz, H5'').  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  170,8, 163,4, 158,5, 151,9, 145,3, 141,6 (C6), 136,0, 130,0 (Ar), 128,2 (Ar), 128,1 (Ar), 127,1 (Ar), 113,6 (Ar), 102,2 (C5), 85,8, 84,2 (C1'), 79,8 (C2'), 64,1 (C5'), 61,7 (C2'), 61,1 (C3'), 55,5 (OCH<sub>3</sub>). ESI-MS (M–H):  $m/z$  547,2; laskettu: 547,2079.

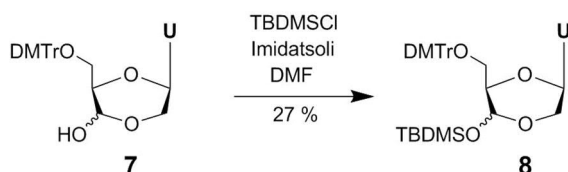
### 2.3.9. (2*R*/*S*,3*R*,5*R*)-3-(4,4'-dimetoksitriptyylioksimetyyli)-2-hydroksi-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (7)



**6** (1,00 g, 1,82 mmol) kuivattiin haihduttamalla siitä kahdesti kuivaa pyridiiniä (2 × 5 ml). Kuivattu **6** liuotettiin kuivaan DMSO:hon (5 ml). Joukkoon lisättiin pyridiiniä (160  $\mu\text{l}$ , 1,98 mmol) ja IBX:a (0,26 g, 0,94 mmol). 10 min kuluttua reaktioseoksen pH oli 4. Seos neutraloitiin pyridiinillä (160  $\mu\text{l}$ , 1,98 mmol). Kolmen tunnin kuluttua reaktioseokseen lisättiin uudelleen pyridiiniä (320  $\mu\text{l}$ , 3,96 mmol) ja IBX:a (0,23 g, 0,82 mmol). Kahden tunnin kuluttua reaktioseokseen lisättiin lutidiinia (460  $\mu\text{l}$ , 4,0 mmol) ja IBX:a (0,45 g, 1,64 mmol) ja reaktion annettiin edetä yön yli. Reaktioseokseen lisättiin vettä (40 ml). Seos suodatettiin imun avulla seliitin läpi ja seliitin pinnalle kertynyttä sakkaa huuhdottiin dikloorimetaanilla (100 ml) ja vedellä (60 ml). Faasit eroteltiin, ja vesifaasiin jääneet reaktiotuotteet uutettiin DCM:iin (2 × 150 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:n vesiliuksella (2 × 150 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Haihdutusjäännöksestä haihdutettiin kahdesti toluenia (2 x 10 ml) ja se puhdistettiin sitten silikageelikromatografisesti (2,5 % MeOH, 0,5 % TEA, DCM:EtOAc, 1:1, v/v). Tuote oli NMR:n perusteella hemiasetaalin **7** epimeerinen seos (5*R*:5*S*, 1,4:1) ja olemukseltaan valkoinen vaahto (0,67 g, 67 %).  $R_f = 0,77$  (10 % MeOH, DCM).  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  11,45 (br, 1,7H, NH),

7,74 (d, 0,7H,  $J = 8,4$  Hz, H<sub>6S</sub>), 7,64 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, H<sub>6R</sub>), 7,43–7,15 (m, 18H, Ar<sub>S</sub> & Ar<sub>R</sub>), 6,98 (dd, 0,7H,  $J = 6,6$  Hz, 3'-OH<sub>S</sub>), 6,88 (m, 8H, Ar<sub>R</sub>, Ar<sub>S</sub>), 6,68 (d, 1H,  $J = 6,6$  Hz, 3'-OH<sub>R</sub>), 5,76 (d, 0,7H,  $J = 8,4$  Hz, H<sub>5S</sub>), 5,76–5,71 (m, 1,7H, H<sub>1'R</sub>, H<sub>1'S</sub>), 5,71 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, H<sub>5R</sub>), 4,86 (dd, 1H,  $J = 6,6$  & 1,8 Hz, H<sub>3'R</sub>), 4,76 (m, 0,7H, H<sub>3'S</sub>), 4,13 (m, 1H, H<sub>4'R</sub>), 3,89 (dd, 0,7H,  $J = 12$  & 3,0 Hz, H<sub>2'S</sub>), 3,83 (t, 1H,  $J = 11,4$  Hz, H<sub>2'R</sub>), 3,76 (m, 0,7H, H<sub>2'S</sub>), 3,69 (m, 0,7H, H<sub>4'S</sub>), 3,53 (dd, 1H,  $J = 11,4$  & 3,0 Hz, H<sub>2'R</sub>), 3,15–3,09 (m, 1,4H, H<sub>5'S</sub>), 3,09–2,98 (m, 2H, H<sub>5'R</sub>). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):  $\delta$  170,8, 163,4, 163,4, 158,5, 158 150,6, 150,4, 145,3, 145,2, 141,0, 140,9, 136,0, 136,0 136,0, 130,3, 130,2, 130,2, 128,3, 128,2, 128,2, 127,2, 127,1, 120,4, 113,7, 113,6, 113,6, 102,6, 102,4, 92,2, 87,6, 87,6, 86,0, 85,8, 79,1, 78,3, 78,0, 77,9, 65,2, 63,4, 63,3, 60,2, 59,1, 59,1, 55,5, 24,4, 21,2, 14,6. ESI-MS (M+K<sup>+</sup>):  $m/z$  585,1616; laskettu: 585,1634.

### 2.3.10. (2R,3R,5R) 2-O-(tert-butyylidimetyylisilyyli)-3-(4,4'-dimetoksitriptyylioksimetyyli)-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (8)

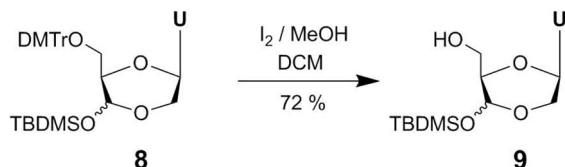


**7** (0,65 g, 1,19 mmol) kuivattiin haihuttamalla siitä kahdesti kuivaa etyyliasetaattia (10 ml). Kuivattu **7** liuotettiin kuivaan DMF:iin (15 ml). Joukkoon lisättiin imidatsolia (130 mg, 1,79 mmol) ja TBDMSCl:a (270 mg, 1,79 mmol), jonka jälkeen seos kuumennettiin 50 °C:een. Neljän tunnin kuluttua reaktioseos jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi. Jäähdyneeseen reaktioseokseen lisättiin etyyliasetaattia (100 ml), ja orgaanista faasia pestiin kylläisillä NaHCO<sub>3</sub>:n (2 × 25 ml) ja NaCl:n (2 × 25 ml) vesiliuoksilla. Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (25–50 % EtOAc, 0,5 % TEA, tolueni). Tuote oli valkoinen vaahto (216 mg, 27 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,89 (br, 1H, NH), 7,65 (d, 1H,  $J = 7,8$  Hz, H<sub>6</sub>), 7,50–7,18 (m, 16H, Ar), 6,83 (m, 6H, Ar), 5,95 (dd, 1H,  $J = 7,8$  & 2,4 Hz, H<sub>1'</sub>), 5,81 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 4,97 (d, 1H,  $J = 7,8$  Hz, H<sub>3'</sub>), 4,14 (m, 1H, H<sub>2'</sub>), 3,81 (s, 6H, OMe), 3,73 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 3,56 (dd, 1H,  $J = 12$  & 8,4 Hz, H<sub>2''</sub>), 3,37 (dd, 1H,  $J = 10$  & 1,8 Hz, H<sub>5'</sub>), 3,24 (dd, 1H,  $J = 10$  & 4,2 Hz, H<sub>5''</sub>), 0,77 (s, 9H, Si-tBu), 0,09 (s, 6H, Si-Me), ylimääräisiä TBDMS-johdannaisia havaittavissa. <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  139,9 (C<sub>6</sub>), 130,1 (Ar), 128,1 (Ar), 127,8 (Ar), 126,7 (Ar), 113,5 (Ar), 102,6 (C<sub>5</sub>), 92,9 (C<sub>3'</sub>), 79,4 (C<sub>4'</sub>), 78,6 (C<sub>1'</sub>),



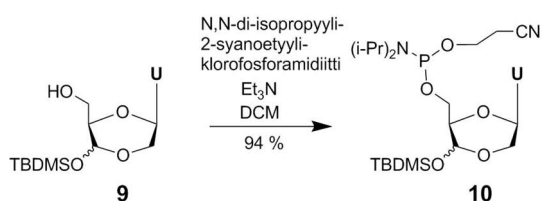
65,7 (C2'), 62,7 (C5'), 55,3 (OMe), 25,5 (Si-tBu), -3,8 (Si-Me). ESI-MS (M+Na<sup>+</sup>): *m/z* 683,2789; laskettu: 683,2765.

### 2.3.11. (2*R*,3*R*,5*R*) 2-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-3-(hydroksimetyyli)-5-(urasil-1-yyli)-1,4-dioksaani (9)



**8** (214 mg, 0,32 mmol) liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (1,0 ml) ja joukkoon lisättiin metanoliin (5,0 ml) liuotettua jodia (50 mg, 0,20 mmol). Tunnin kuluttua reaktioseokseen lisättiin dikloorimetaania (50 ml), ja orgaanista faasia pestiin Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>:n 10 %:lla vesiliuoksella (2 × 20 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin alipaineessa kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (5 % MeOH, DCM). Tuote oli kirkas, väritön ja lasimainen aine (83 mg, 72 %). *R<sub>f</sub>* = 0,40 (5 % TEA, EtOAc). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,53 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H6), 5,93 (dd, 1H, *J* = 7,8 & 3 Hz, H1'), 5,76 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H5), 4,85 (d, 1H, 7,2 Hz, H3'), 4,07 (dd, 1H, *J* = 12 & 3 Hz, H2'), 3,86 (dd, 1H, *J* = 12 & 3 Hz, H5'), 3,76 (dd, 1H, *J* = 12 & 5,4 Hz, H5''), 3,64 (m, 1H, H4'), 3,57 (dd, 1H, *J* = 12 & 8,4 Hz, H2''), 0,92 (s, 9H, Si-tBu), 0,15 (d, 6H, *J* = 5,4 Hz, Si-Me). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 140,0 (C6), 102,6 (C5), 93,1 (C3'), 80,4 (C4'), 78,5 (C1'), 65,6 (C2'), 61,1 (C5'), 25,7 (Si-tBu), -5,0 (Si-Me). ESI-MS (M+K<sup>+</sup>): *m/z* 397,1209; laskettu: 397,1197.

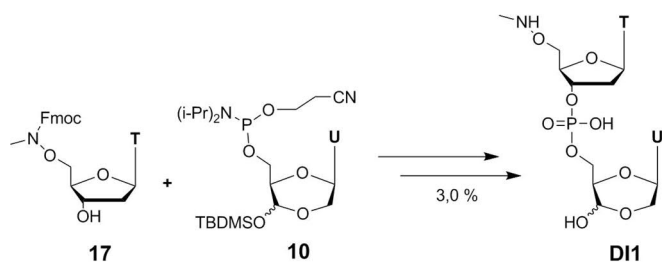
### 2.3.12. Uridiinin dioksaanianalogin fosforamidiitti 10



**9** (80 mg, 0,22 mmol) kuivattiin yön yli vakuumissa fosforipentoksidin päällä. Kuivattu **9** liuotettiin dikloorimetaaniin (2,0 ml), ja joukkoon lisättiin kuivaa trietyyliamiinia (153 µl, 1,10 mmol). Seokseen lisättiin *N,N*-(di-isopropyyli)-(2-syano)etyyli-klorofosforamidiittia (58 µl, 0,26 mmol) typpikaasun alaisena. Tunnin kuluttua reaktioseos puhdistettiin silikageelikromatografisesti (5 % TEA, EtOAc). Tuote oli kirkas, väritön ja lasimainen aine (116 mg, 94 %). *R<sub>f</sub>* = 0,59 (5 % TEA, EtOAc). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7,56 (m, 1H, H6), 5,89 (dd, 1H, *J* = 7,8 & 1,8 Hz, H4'), 5,74 (dd, 1H, 13,2 & 7,8 Hz, H5), 4,89 (dd, 1H, *J* = 16,8 & 7,2 Hz, H3'), 4,07 (d, 1H, *J* = 12 Hz, H2') 3,93–

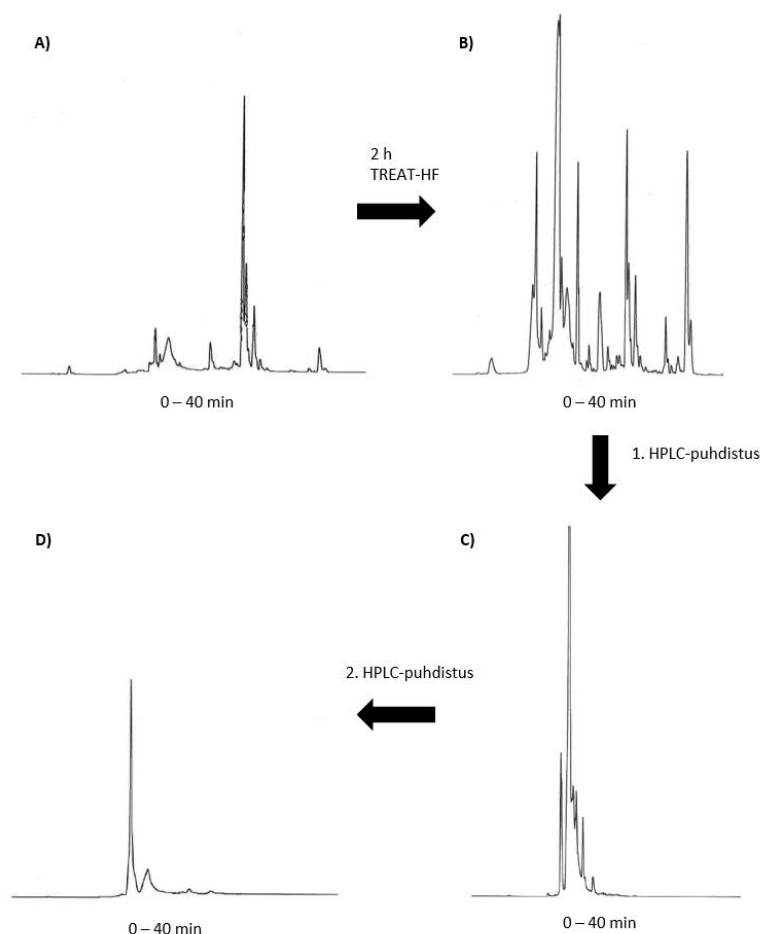
3,76 (m, 4H, H5', P-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 3,68–3,56 (m, 4H, 2 x H4', 2 x N-iPr), 3,51 (m, 1H, H2'), 2,64 (m, 2H, P-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1,19 (m, 12H, N-iPr), 0,91 (s, 9H, Si-tBu), 0,14 (m, 6H, Si-Me<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163,2 (C4), 150,0 (C2), 139,9 (C6), 117,5 (CN), 102,5 (C5), 92,6 (C3'), 79,5 (C4'), 79,4 (C1'), 65,4 (C2'), 61,9 (C5'), 43,0 (N-iPr), 25,6 (Si-tBu), 24,6 (N-iPr), -4,1 (Si-Me<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 149,2, 149,1. ESI-MS (M+Na<sup>+</sup>): *m/z* 581,2554; laskettu: 581,2537.

### 2.3.13. Difunktionaalinen dimeeri DI1



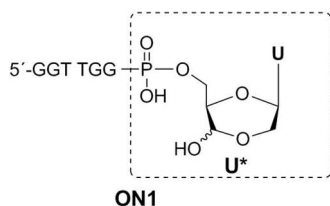
5'-*O*-[*N*-(9-fluorenyylimetoksikarbonyyli)metyyliamino]tymidiini (**17**, 18 mg, 36 μmol) ja **10** (20 mg, 36 μmol) liuotettiin kuivaan MeCN:iin (1,0 ml). MeCN haihdutettiin alipaineessa, ja haihdutusjäännös kuivattiin vakuumieksikkaattorissa fosforipentoksidin päällä yön yli. Kuivatut lähtöaineet liuotettiin kuivaan MeCN:iin (360 μl) typpikaasun alla. Joukkoon lisättiin asetonitriiliin liuotettua (0,25 M) 5-(bentsyylitio)-1*H*-tetratsolia (160 μl, 40 μmol). Tunnin kuluttua reaktioseokseen lisättiin hapetinta [jodi:pyridiini:H<sub>2</sub>O, jossa *c*(I<sub>2</sub>) = 0,02 M], kunnes jodin keltainen väri oli pysyvä, ja reaktioseoksen annettiin vielä sekoittua 5 min. Reaktioseokseen lisättiin pelkistintä (trimetyylifosfiitti:dioksaani, 1:10, *v/v*), kunnes jodin väri hävisi. Seos haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Haihdutusjäännös liuotettiin dioksaaniin (1,0 ml), ja joukkoon lisättiin DBU:ta (50 μl). Neljän tunnin kuluttua reaktioseos haihdutettiin kuiviin alipaineessa.

Osa (10 %) TBDMS-suojatusta raakatuotteesta liuotettiin veteen (0,2 ml). Joukkoon lisättiin trietyyliamiiniritrihydrofluoridia (TREAT-HF, 2 μl, 12 nmol). Tunnin kuluttua joukkoon lisättiin uudelleen TREAT-HF (8 μl, 48 nmol). Kahden tunnin kuluttua reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä (gradientti 0–50 % MeCN, 50 mM TEAA, 0–30 min). HPLC-kromatogrammit TBDMS-poiston ja puhdistuksen eri vaiheista on esitetty kaaviossa 31. Dimeerin kokonaissaanto (680 μg, 3,0 %) määritettiin UV-spektrofotometrisesti detektioaallonpituudella 260 nm oligonukleotidien laskettuja absorptiokertoimia<sup>155</sup> käyttäen, ja ekstrapoloimalla kymmenkertaiseksi siitä osuudesta, josta TBDMS poistettiin. ESI-MS (M-H<sup>+</sup>): *m/z* = 576,1297; laskettu 576,1348.



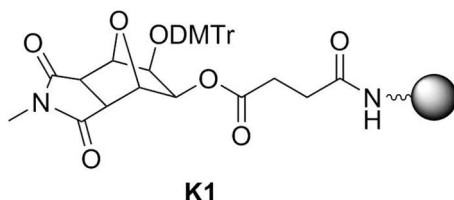
**Kaavio 31** Dimeerin **DI1** HPLC-kromatogrammit. A) Raakatuote ennen TBDMS-poistoa B) Raakatuote TBDMS-poiston jälkeen C) 1. HPLC-putsaus TBDMS-poiston jälkeen D) 2. HPLC-putsaus TBDMS-poiston jälkeen.

#### 2.3.14. Oligonukleotidi 5'-GGT TGG U\* (ON1)

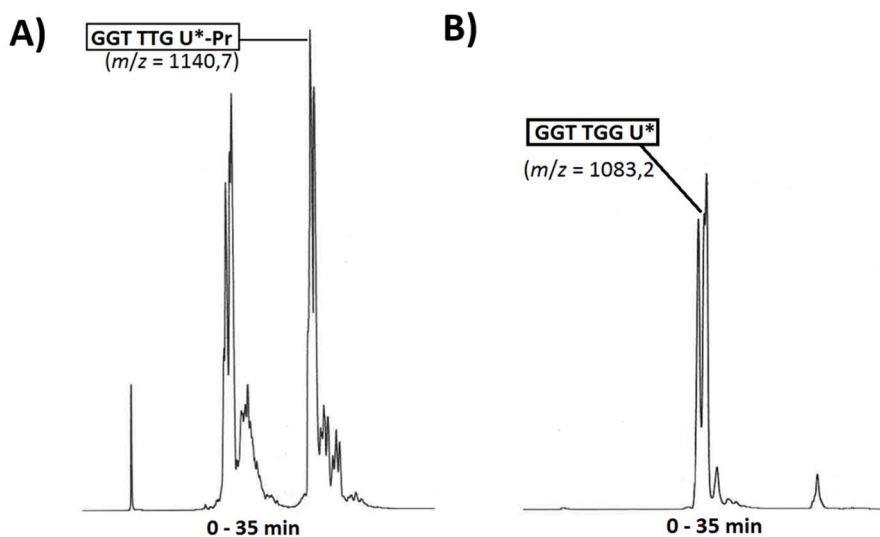


**ON1** valmistettiin automatisoidulla DNA/RNA-syntetisaattorilla 1,0 mikromoolin skaalassa käyttäen käänteisiä G/T-fosforamidiittiyksiköitä (5'-O-fosforamidiitit), fosforamidiittia **10** ja universaalia kantajaa **K1** (Kuva 17). Aktivaattorina käytettiin 5-(bentsyylitio)-1*H*-tetratsolia. Kaupallisille G/T-5'-*O*-fosforamidiittiyksiköille käytettiin 5 minuutin kytkentäaika ja modifioidulle U\*-nukleosidille (**10**) 10 minuutin kytkentäaika. Synteesin jälkeen kantajilla olevat oligonukleotidit irrotettiin ammoniakin 33 % vesiliuoksella 55 °C:n lämpötilassa (1 tunti). Suspensio suodatettiin ja suodos haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Haihdutusjäännös puhdistettiin HPLC:llä (gradientti 0–50 % MeCN, 50 mM TEAA, 0–30 min). HPLC:llä puhdistettu TBDMS-suojattu oligonukleotidi **ON1** liuotettiin DMSO:hon (115 µl). Joukkoon lisättiin

TREAT-HF (5  $\mu$ l, 30 nmol). Kahden tunnin kuluttua **ON1** eristettiin reaktioseoksesta HPLC:llä (gradientti 0–50 % MeCN, 50 mM TEAA, 0–30 min). HPLC-kromatogrammit ammoniakki- ja TREAT-HF-käsittelyiden raakatuotteista on esitetty kaaviossa 32. Oligonukleotidin **ON1** saanto (9 ng, 0,6 %) määritettiin UV-spektrofotometrisesti detektioaallonpituudella 260 nm oligonukleotidien laskettuja absorptiokertoimia<sup>155</sup> käyttäen. ESI-MS ( $M-2H^+$ ): 1083,1; laskettu 1083,2.

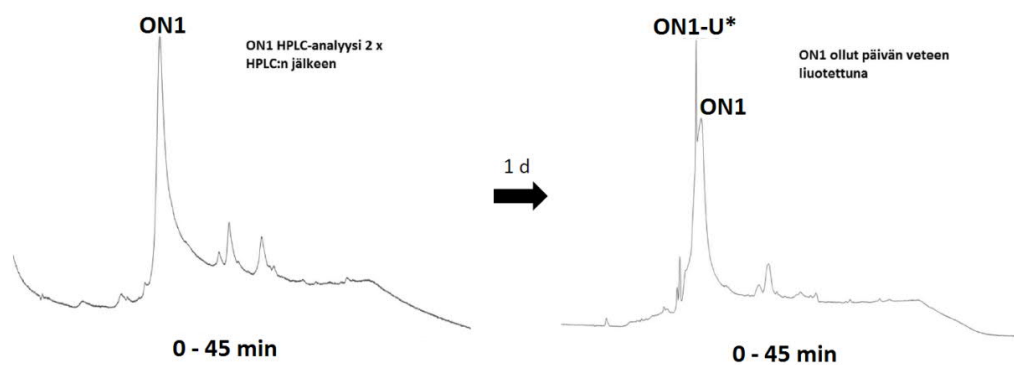


**Kuva 17** Oligonukleotidin **ON1** synteesissä käytetty kantaja **K1**.

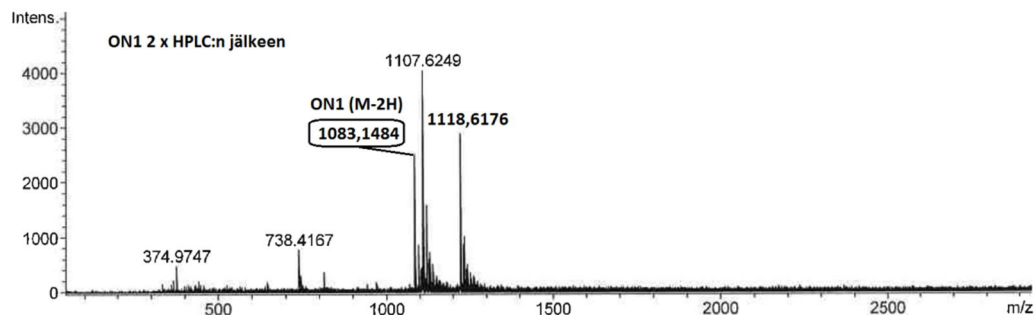


**Kaavio 32** Oligonukleotidin **ON1** HPLC-kromatogrammit A) Raakatuote tunnin ammoniakki-käsittelyn jälkeen B) raakatuote kahden tunnin TREAT-HF-käsittelyn jälkeen.

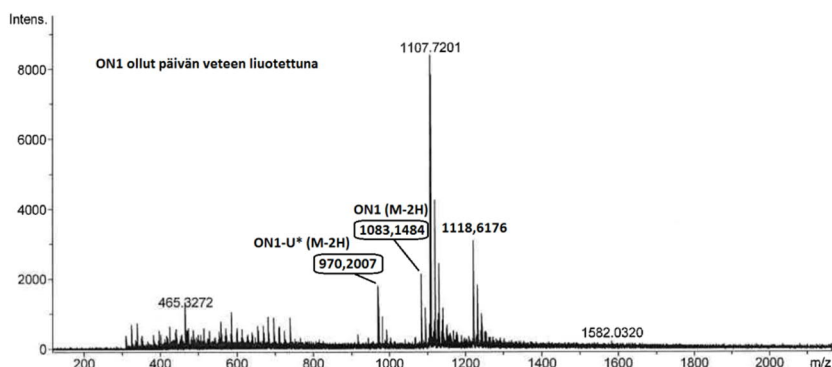
Oligonukleotidin **ON1** pysyvyyttä testattiin liuottamalla puhdistettu **ON1** veteen vuorokaudeksi. Vuorokauden kuluttua HPLC-kromatogrammiin oli ilmestynyt uusi intensiivinen piikki (Kaavio 33). Tämä uusi piikki karakterisoitiin oligonukleotidiksi, josta dioksaanipohjainen nukleosidi **U\*** oli irronnut (5'-GGT TTG, **ON1-U\***). Karakterisointi tehtiin vertaamalla näytteiden massaspektrejä ennen veteen liuotusta (Kuva 18) ja vuorokauden vesiliuotuksen jälkeen (Kuva 19). Vuorokauden vesiliuotuksen jälkeisessä massaspektrissä havaitaan **ON1**:een viittaavan piikin ( $m/z$  1083,1) lisäksi **ON1-U\***:een viittaava piikki ( $m/z$  970,2).



**Kaavio 33** Oligonukleotidin ON1 pysyvyydestin kromatogrammit.



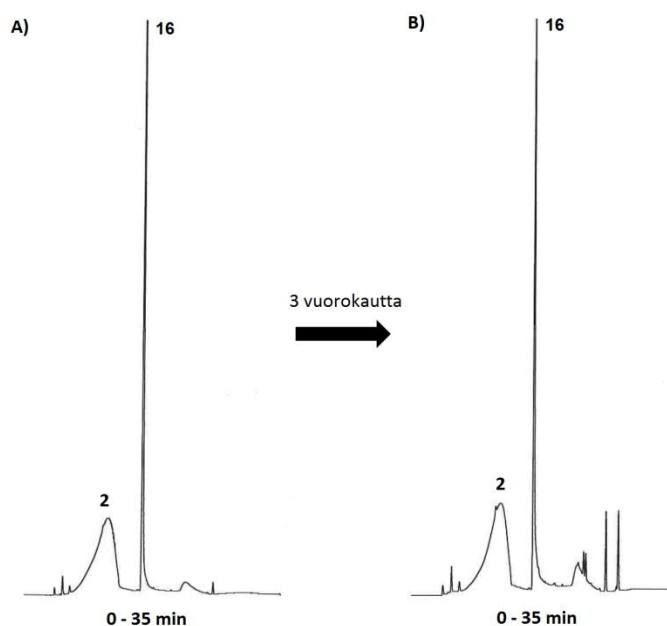
**Kuva 18** Puhdistetun oligonukleotidin ON1 massaspektri ennen veteen liuotusta.



**Kuva 19** Oligonukleotidin ON1 massaspektri vuorokauden vedessä olon jälkeen.

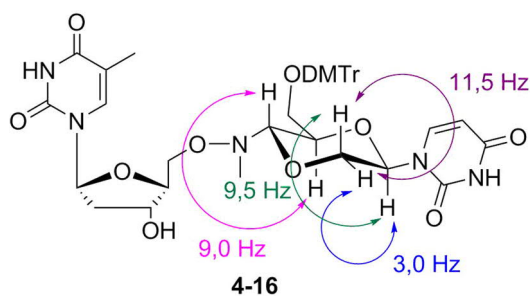
### 2.3.15. Heteromolekulaaristen ligaatioreaktioiden seuranta

Nukleosidijohdoksista **2** ja **16** valmistettiin puskuroitu vesiliuos [pH = 6,  $c(\mathbf{2}) = 10$  mM,  $c(\mathbf{16}) = 5$  mM]. Reaktion etenemistä huoneenlämmössä seurattiin HPLC:llä [gradientti 0–30 % MeCN, 50 mM TEAA (pH 7), 0–20 min, jonka jälkeen 30 % MeCN 20–25 min]. Kolmen vuorokauden kuluttua reaktio vaikutti pysähtyneen useiden tuotteiden tasapainotilaan (Kaavio 34).



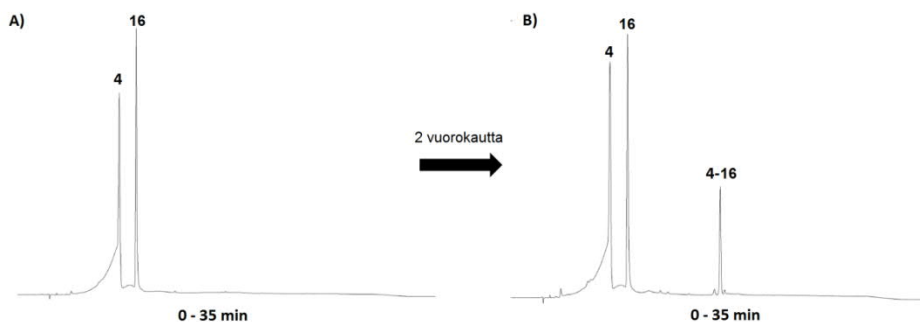
**Kaavio 34** Nukleosidijohdosten **2** ja **16** välisen ligaatioreaktion HPLC-kromatogrammit. A) Reaktioaika n. 1 min B) Reaktioaika 3 vuorokautta.

Nukleosidijohdoksista **4** ja **16** valmistettiin puskuroitu vesiliuos [pH = 6,  $c(\mathbf{4}) = 10$  mM,  $c(\mathbf{16}) = 5$  mM]. Reaktion etenemistä huoneenlämmössä seurattiin HPLC:llä [gradientti 0–30 % MeCN, 50 mM TEAA (pH 8), 0–20 min]. Kromatogrammeista havaittiin yksi reaktiotuote retentioajalla 18,8 min (Kaavio 35), joka eristettiin ja karakterisointiin nukleosidijohdosten **4** ja **16** kondensoituneeksi dimeeriksi **4-16**. Dimeerin dioksaanirengas oli renkaan protonien kytkentävakioiden perusteella tuolikonformaatioissa, johon ligaatiosidos N–C3\* oli orientoitunut ekvatoriaalisesti (Kuva 20).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $\text{D}_6$ ): 11,37 (br, 1H, NH), 11,30 (br, 1H, NH), 7,66 (d, 1H,  $J_{6\text{Ura},5\text{Ura}} = 8,0$  Hz, H $_{6\text{Ura}}$ ), 7,50 (d, 1H,  $J_{6\text{Thy},5\text{Thy}} = 1,0$  Hz, H $_{6\text{Thy}}$ ), 6,18 (t, 1H,  $J_{1',2'} = 7,0$  Hz, H $_{1'}$ ), 5,68 (d, 1H,  $J_{5\text{Ura},6\text{Ura}} = 8,5$  Hz, H $_{5\text{Ura}}$ ), 5,67 (d, 1H,  $J_{1*,2*} = 9,5$  Hz, H $_{1*}$ ), 5,36 (d, 1H,  $J_{3'\text{O},3'} = 4,5$  Hz, 3'-OH), 4,40 (d, 1H,  $J_{3*,4*} = 9,0$  Hz, H $_{3*}$ ), 4,18 (m, 1H, H $_{3'}$ ), 3,96 (m, 2H, H $_{2*}$ , H $_{4*}$ ), 3,85 (m, 2H, H $_{4'}$ , H $_{5'}$ ), 3,76 (m, 2H, H $_{2*}$ , H $_{5*}$ ), 3,54 (m, 2H, H $_{5''}$ , H $_{5*}$ ), 3,27 (s, 3H, MeO), 2,66 (s, 3H, MeNO), 2,16–2,02 (m, 2H, H $_{2'}$ , H $_{2''}$ ), 1,81 (d, 3H,  $J = 1$  Hz, MeThy).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  164,2, 163,3, 150,9, 150,5, 141,1 (C $_{6\text{Ura}}$ ), 136,3 (C $_{6\text{Thy}}$ ), 110,2 (C $_{5\text{Thy}}$ ), 102,5 (C $_{5\text{Ura}}$ ), 89,0 (C $_{3*}$ ), 84,5 (C $_{4'}$ ), 84,2 (C $_{1'}$ ), 78,0 (C $_{1*}$ ), 76,0 (C $_{4*}$ ), 72,8 (C $_{5*}$ ), 71,9 (C $_{5'}$ ), 71,0 (C $_{3'}$ ), 66,4 (C $_{2*}$ ), 59,1 (MeO), 39,3 (C $_{2'}$ ), 38,6 (MeNO), 12,6 (MeThy). ESI-MS (M–H $^+$ ):  $m/z$  510,1727; laskettu 510,1844.

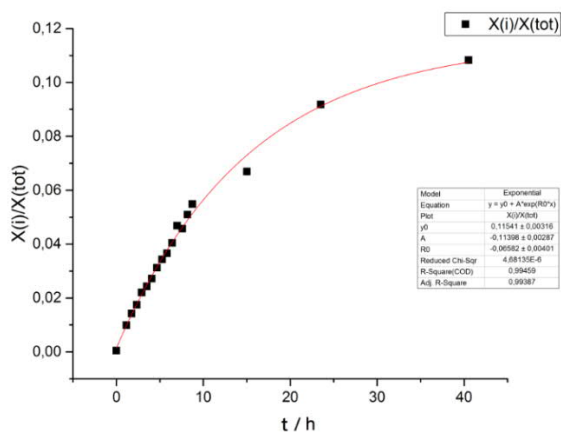


**Kuva 20** Kondensoituneen dimeerin **4-16** dioksaanirenkaan protonien kytkeytymiset ja konformaatio.

Ligaatioreaktion seuraaminen suoritettiin kaikkiaan pH:issa 4, 5 ja 6. Näissä olosuhteissa reaktiolle määritettiin puoliintumisajat ( $t_{1/2}$ ), tasapainosaannot ja tasapainovakiot ( $K$ ) (Taulukko 5 s. 54) laskemalla dimeerin **4-16** mooliosuudet ( $X_i/X_{tot}$ ) reaktion edetessä kromatogrammien piikkien integraalien suhteista ja sovittamalla mooliosuudet  $e$ -kantaiseen eksponenttifunktioon (esim. pH 6: Kuva 21).



**Kaavio 35** Nukleosidijohdosten **4** ja **16** välisen ligaatioreaktion HPLC-kromatogrammit. A) Alkutilanne B) Reaktio edennyt kaksi vuorokautta.



**Kuva 21** Nukleosidijohdosten **4** ja **16** välisessä kondensaatioreaktiossa muodostuneen dimeerin **4-16** mooliosuus ajan funktiona (pH 6).

### 3. Yhteenveto ja päätelmät

Työssä valmistettiin onnistuneesti useita nukleosidien dioksaanijohdoksia. Huomioitavaa monomeerien synteeseissä oli paikoin haastava karakterisointi ja

puhtauden määrittäminen, johtuen synteesisuhteiden monimutkaisista NMR-spektreistä ja eri isomeerien heikosta erottuvuudesta HPLC:ssä.

Nukleosidijohdokset **2** ja **16** reagoivat vesiliuoksessa muodostaen useita tuotteita. Osa tuotteista oli retentioajoista päätellen nukleosidijohdosten ligaatiotuotteita, mutta tarkempaan karakterisointiin ei ehditty. Tämän reaktion seurannasta saatiin kuitenkin osviittoja siihen, että 2',3'-dialdehydinukleosidijohdos oligonukleotidin 3'-päässä voisi olla ligatoitavissa *N*(Me)-alkoksiamiinifunktioon.

Nukleosidijohdokset **4** ja **16** reagoivat vesiliuoksessa muodostaen kondensoituneen dimeerin **4-16**. Reaktion nopeus oli suoraan ja tasapainosaanto kääntäen verrannollinen reaktioliuoksen happamuuteen (pH-alueella 4–6). Tämä heterobimolekularinen ligaatio osoitti alustavasti nukleosidin dioksaanijohdoksen **4** olevan potentiaalinen rakenne pH-riippuvaiseen DNA:n katalysoimaan oligomerisaatioon.

Työssä valmistettiin fosforamidiittikemialla oligonukleotidi **ON1**, jonka 3'-päänä oli dioksaanipohjainen nukleotidijohdos **U\***. Saanto oli kuitenkin heikko. Lisäksi 3'-pään modifioitu nukleosidi irtosi vesiliuoksessa spontaanisti, mikä vaikeuttaa tällaisen oligonukleotidijohdoksen sovellettavuutta. Tämän vuoksi ko. oligon ligaatio-tutkimuksista luovuttiin.

Valmistetun oligonukleotidijohdoksen heikon pysyvyyden syynä oli dioksaanirakenteen ”4'-hiilen” hapan protoni (numerointi perustuu lähtöaineena käytettyyn uridiiniin). Pysyvyysoongelma voisi ratketa esim. käyttämällä oligonukleotidijohdoksessa dioksaanirakenteen **U\*** paikkaisomeeriä, jossa hemiasetaalinen hydroksyyli-ryhmä sijaitsisi ”3'-hiilen” sijaan ”2'-hiilessä”. Työssä alustettiin tällaisten molekyylien tutkimusta valmistamalla monofunktionaalinen dioksaanijohdos **15**.

Työssä valmistettiin fosforamidiittikemialla myös difunktionaalinen dimeeri **DII**. Tällä rakenteella  $\beta$ -eliminaation kautta tapahtuva hajoaminen ei ollut yhtä merkittävää kuin oligonukleotidilla **ON1**, joten **DII** voisi olla potentiaalinen molekyyli DNA-templatoituneen oligomerisaation tutkimukseen. Tämän ligaatiotutkimuksia ei kuitenkaan ehditty toteuttamaan erikoistyön aikana.

Työssä ei tavoitteiden mukaisesti ehditty DNA-templatoitujen ligaatioreaktioiden seurantaan. Siitä huolimatta, **4-16**-dimerisaation tulokset täsmäsivät alkuolettamuksen kanssa, sillä dioksaaninukleosidianalogin **4** ligaatio nukleosidijohdokseen **16** käyttäytyy pH-riippuvaisesti, kuten aiemmin D-glukoosin ja **16**:n välillä ollaan havaittu<sup>154</sup>. Tämä ei kuitenkaan ole taie dioksaanirakenteen toimimisesta DNA-templatoituneissa ligaatioreaktioissa, sillä hybridisaatio ei välttämättä johda suotuisaan paikallis-



konsentraation kasvuun. Lisäksi haasteeksi jäi myös sellaisen nukleosidin dioksaanijohdoksen löytäminen, mikä voitaisiin pysyvästi liittää oligonukleotidiin.

## Viitteet

- (1) Dahm, R. *Hum. Genet.* **2008**, *122*, 565-581.
- (2) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- (3) Müller, S.; Appel, B.; Balke, D.; Hieronymus, R.; Nübel, C. *Fl1000Res.* **2016**, *5*, 1511.
- (4) Hollenstein, M. *Molecules* **2015**, *20*, 20777-20804.
- (5) Cai, Y.; Yu, X.; Hu, S.; Yu, J. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2009**, *7*, 147-154.
- (6) Bochman, M. L.; Paeschke, K.; Zakian, V. A. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 770-780.
- (7) Fallmann, J.; Will, S.; Engelhardt, J.; Grüning, B.; Backofen, R.; Stadler, P. F. *J. Biotechnol.* **2017**, *261*, 97-104.
- (8) Bernhardt, H. S. *Biol. Direct* **2012**, *7*, 23.
- (9) Niu, J.; Hili, R.; Liu, D. R. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 282-292.
- (10) Surin, M. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 4137-4150.
- (11) Smith, W. T. *Prog. Polym. Sci.* **1996**, *21*, 209-253.
- (12) Brudno, Y.; Liu, D. R. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 265-276.
- (13) O'Reilly, R. K.; Turberfield, A. J.; Wilks, T. R. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2496-2509.
- (14) Lehn, J.; Eliseev, A. V. *Science* **2001**, *291*, 2331-2332.
- (15) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J. *Molecular Biology of the Cell*. 4. painos [online], Garland Science; New York, Yhdysvallat, 2002. Viitattu 15.10.2018. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26826/>.
- (16) McCulloch, S. D.; Kunkel, T. A. *Cell Res.* **2008**, *18*, 148-161.
- (17) Dorr, M.; M.G. Loffler, P.; Monnard, P. *Curr. Org. Synth.* **2012**, *9*, 735-763.
- (18) Fazakerley, G. V.; Sowers, L. C.; Eritja, R.; Kaplan, B. E.; Goodman, M. F. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1987**, *5*, 639-650.
- (19) Davies, J. M.; Poole, R. J.; Sanders, D. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1993**, *1141*, 29-36.

- (20) Orgel, L. E.; Lohrmann, R. *Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 368-377.
- (21) Rosenbaum, D. M.; Liu, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13924-13925.
- (22) Vogel, S. R.; Richert, C. *Chem. Commun.* **2007**, 1896-1898.
- (23) Sulston, J.; Lohrmann, R.; Orgel, L. E.; Miles, H. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *60*, 409-415.
- (24) Kozlov, I. A.; Orgel, L. E. *Mol. Biol.* **2000**, *34*, 781-789.
- (25) Sosson, M.; Richert, C. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 603-617.
- (26) Vogel, S. R.; Deck, C.; Richert, C. *Chem. Commun.* **2005**, 4922-4924.
- (27) Hagenbuch, P.; Kervio, E.; Hochgesand, A.; Plutowski, U.; Richert, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6588-6592.
- (28) Deck, C.; Jauker, M.; Richert, C. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 603-608.
- (29) Kervio, E.; Claasen, B.; Steiner, U., E.; Richert, C. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 7409-7420.
- (30) Kervio, E.; Sosson, M.; Richert, C. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 5504-5514.
- (31) Altmann, S.; Labhardt, A., M.; Bur, D.; Lehmann, C.; Bannwarth, W.; Billeter, M.; Wüthrich, K.; Leupin, W. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4827-4835.
- (32) Izgu, E. C.; Fahrenbach, A. C.; Zhang, N.; Li, L.; Zhang, W.; Larsen, A. T.; Blain, J. C.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6373-6382.
- (33) Naylor, R.; Gilham, P. T. *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722-2728.
- (34) Sulston, J.; Lohrmann, R.; Orgel, L. E.; Miles, H. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *59*, 726-733.
- (35) Weimann, B. J.; Lohrmann, R.; Orgel, L. E.; Schneider-Bernloehr, H.; Sulston, J. *E. Science* **1968**, *161*, 387.
- (36) Lohrmann, R.; Bridson, P. K.; Orgel, L. E. *Science* **1980**, *208*, 1464-1465.
- (37) Inoue, T.; Orgel, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7666-7.
- (38) Li, L.; Lelyveld, V. S.; Prywes, N.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3986-3989.
- (39) Wu, T.; Orgel, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5496-5501.
- (40) Acevedo, O. L.; Orgel, L. E. *J. Mol. Biol.* **1987**, *197*, 187-193.
- (41) Orgel, L. E. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109-118.

- (42) Schmidt, J.; Nielsen, P. E.; Orgel, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1494-1495.
- (43) Rojas Stütz, J. A.; Richert, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12718-12719.
- (44) Li, X.; Liu, D. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848-4870.
- (45) Walton, T.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11996-12002.
- (46) Li, L.; Prywes, N.; Tam, C. P.; O'Flaherty, D. K.; Lelyveld, V. S.; Izgu, E. C.; Pal, A.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1810-1813.
- (47) Prywes, N.; Blain, J. C.; Del Frate, F.; Szostak, J. W. *eLife* **2016**, *5*, e17756.
- (48) Fahrenbach, A. C.; Giurgiu, C.; Tam, C. P.; Li, L.; Hongo, Y.; Aono, M.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8780-8783.
- (49) Röthlingshöfer, M.; Richert, C. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3945-3952.
- (50) Zielinski, W. S.; Orgel, L. E. *Nature* **1987**, *327*, 346-347.
- (51) Sievers, D.; von Kiedrowski, G. *Nature* **1994**, *369*, 221-224.
- (52) Jauker, M.; Griesser, H.; Richert, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14559-14563.
- (53) Lehn, J. *Isr. J. Chem.* **2018**, *58*, 136-141.
- (54) Zhirnov, V.; Zadegan, R. M.; Sandhu, G. S.; Church, G. M.; Hughes, W. L. *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 366-370.
- (55) Zhan, Z. J.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12420-12421.
- (56) Goodwin, J. T.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9197-9198.
- (57) Li, X.; Zhan, Z. J.; Knipe, R.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 746-747.
- (58) Gartner, Z. J.; Kanan, M. W.; Liu, D. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1796-1800.
- (59) Gartner, Z. J.; Grubina, R.; Calderone, C. T.; Liu, D. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1370-1375.
- (60) Li, X.; Hernandez, A.; Grover, M.; Hud, N.; Lynn, D. **2011**, *82*, 1477-1488.
- (61) Doudna, J. A.; Cech, T. R. *Nature* **2002**, *418*, 222-228.
- (62) Rosenbaum, D. M.; Liu, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13924-13925.
- (63) Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.

- (64) Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- (65) Tomac, S.; Sarkar, M.; Ratilainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Nordén, B.; Gräslund, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5544-5552.
- (66) Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O.; Egholm, M.; Norden, B. *Nature* **1994**, *368*, 561-563.
- (67) Betts, L.; Josey, J. A.; Veal, J. M.; Jordan, S. R. *Science* **1995**, *270*, 1838-1841.
- (68) Rasmussen, H.; Kastrop, J. S.; Nielsen, J. N.; Nielsen, J. M.; Nielsen, P. E. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 98-101.
- (69) Nielsen, P. E.; Haaima, G. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 73-78.
- (70) Puschl, A.; Sforza, S.; Haaima, G.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4707-4710.
- (71) Englund, E. A.; Appella, D. H. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3465-3467.
- (72) Dragulescu-Andrasi, A.; Rapireddy, S.; Frezza, B. M.; Gayathri, C.; Gil, R. R.; Ly, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10258-10267.
- (73) Kleiner, R. E.; Brudno, Y.; Birnbaum, M. E.; Liu, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4646-4659.
- (74) Wittung, P.; Nielsen, P.; Norden, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 7973-7979.
- (75) Li, M.; Zengeya, T.; Rozners, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8676-8681.
- (76) Bohler, C.; Nielsen, P. E.; Orgel, L. E. *Nature* **1995**, *376*, 578-581.
- (77) Schmidt, J. G.; Christensen, L.; Nielsen, P. E.; Orgel, L. E. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4792-4796.
- (78) Gartner, Z. J.; Liu, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961-6963.
- (79) Kleiner, R. E.; Dumelin, C. E.; Liu, D. R. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5707-5717.
- (80) Heemstra, J. M.; Liu, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11347-11349.
- (81) Ura, Y.; Beierle, J. M.; Leman, L. J.; Orgel, L. E.; Ghadiri, M. R. *Science* **2009**, *325*, 73-77.
- (82) Beierle, J. M.; Ura, Y.; Ghadiri, M. R.; Leman, L. J. *Biochemistry* **2018**, *57*, 160-172.
- (83) Lewis, R. J.; Hanawalt, P. C. *Nature* **1982**, *298*, 393-396.
- (84) Fujimoto, K.; Matsuda, S.; Takahashi, N.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5646-5647.

- (85) Letsinger, R. L.; Wu, T.; Elghanian, R. *Nucleosides and Nucleotides* **1997**, *16*, 643-652.
- (86) Liu, J.; Taylor, J. S. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3300-3304.
- (87) Yoshimura, Y.; Noguchi, Y.; Sato, H.; Fujimoto, K. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 598-601.
- (88) Fujimoto, K.; Yoshino, H.; Ami, T.; Yoshimura, Y.; Saito, I. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 397-400.
- (89) Martin, A. R.; Vasseur, J.; Smietana, M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5684-5713.
- (90) Martin, A. R.; Barvik, I.; Luvino, D.; Smietana, M.; Vasseur, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4193-4196.
- (91) Barbeyron, R.; Vasseur, J.; Smietana, M. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 542-547.
- (92) Barbeyron, R.; Martin, A. R.; Jean-Jacques Vasseur; Smietana, M. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 105587-105591.
- (93) Reverte, M.; Vasseur, J.; Smietana, M. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10604-10608.
- (94) Farrell, R. E. Kappale 18: RT-PCR A Science and an Art Form. Kirjassa&nbsp;*RNA Methodologies*&nbsp;4. painos [online], Academic Press. Viitattu 15.10.2018. Saatavilla: <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1010748590>.
- (95) Butler, J. M. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* **2012**, 347-369.
- (96) Griesang, N.; Gießler, K.; Lommel, T.; Richert, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6144-6148.
- (97) James, K. D.; Boles, A. R.; Henckel, D.; Ellington, A. D. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5203-5211.
- (98) Wojtecki, R. J.; Meador, M. A.; Rowan, S. J. *Nat. Mater.* **2010**, *10*, 14-27.
- (99) Brochu, A. B. W.; Craig, S. L.; Reichert, W. M. *J. Biomed. Mater. Res.* **2011**, *96A*, 492-506.
- (100) Yang, H.; Xi, W. *Polymers* **2017**, *9*, 666.
- (101) Packer, M. S.; Liu, D. R. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 379-394.
- (102) Joyce, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6420-6436.
- (103) Liu, D. R.; Magliery, T. J.; Pastrnak, M.; Schultz, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10092-10097.

- (104) Santoro, S. W.; Wang, L.; Herberich, B.; King, D. S.; Schultz, P. G. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1044-1048.
- (105) Gaj, T.; Mercer, A. C.; Gersbach, C. A.; Gordley, R. M.; Barbas, C. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 498-503.
- (106) Young, E. M.; Tong, A.; Bui, H.; Spofford, C.; Alper, H. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 131-136.
- (107) Kehayova, P. D.; Liu, D. R. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 65-74.
- (108) Scott, J. K.; Smith, G. P. *Science* **1990**, *249*, 386-390.
- (109) McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G.; Chiswell, D. J. *Nature* **1990**, *348*, 552-554.
- (110) Bessette, P. H.; Rice, J. J.; Daugherty, P. S. *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 731-739.
- (111) Bartel, D. P.; Szostak, J. W. *Science* **1993**, *261*, 1411-1418.
- (112) Matsuura, T.; Yomo, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 449-456.
- (113) Badran, A. H.; Liu, D. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *24*, 1-10.
- (114) Kleiner, R. E.; Dumelin, C. E.; Liu, D. R. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5707-5717.
- (115) Zhu, L.; Lukeman, P. S.; Canary, J. W.; Seeman, N. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10178-10179.
- (116) McKee, M. L.; Milnes, P. J.; Bath, J.; Stulz, E.; Turberfield, A. J.; O'Reilly, R. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7948-7951.
- (117) He, Y.; Liu, D. R. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 778-782.
- (118) Meng, W.; Muscat, R. A.; McKee, M. L.; Milnes, P. J.; El-Sagheer, A.; Bath, J.; Davis, B. G.; Brown, T.; O'Reilly, R. K.; Turberfield, A. J. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 542-548.
- (119) Kleiner, R. E.; Dumelin, C. E.; Tiu, G. C.; Sakurai, K.; Liu, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11779-11791.
- (120) Georghiou, G.; Kleiner, R. E.; Pulkoski-Gross, M.; Liu, D. R.; Seeliger, M. A. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 366-374.
- (121) Petersen, L. K.; Blakskjær, P.; Chaikuad, A.; Christensen, A. B.; Dietvorst, J.; Holmkvist, J.; Knapp, S.; Kořínek, M.; Larsen, L. K.; Pedersen, A. E.; Röhm, S.; Sløk, F. A.; Hansen, N. J. V. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 1332-1339.
- (122) Seigal, B. A.; Connors, W. H.; Fraley, A.; Borzilleri, R. M.; Carter, P. H.; Emanuel, S. L.; Fargnoli, J.; Kim, K.; Lei, M.; Naglich, J. G.; Pokross, M. E.; Posy,

- S. L.; Shen, H.; Surti, N.; Talbott, R.; Zhang, Y.; Terrett, N. K. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2855-2861.
- (123) Goodnow Jr, R. A.; Dumelin, C. E.; Keefe, A. D. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *16*, 131-147.
- (124) Hajare, A.; Salunkhe, S.; Mali, S.; Gorde, S.,S.; Nadaf, S.; Pishawikar, S. *American journal of PharmTech research* **2013**, *4*, 112-129.
- (125) Pohorille, A.; Deamer, D. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 123-128.
- (126) LeDuc, P. R.; Wong, M. S.; Ferreira, P. M.; Groff, R. E.; Haslinger, K.; Koonce, M. P.; Lee, W. Y.; Love, J. C.; McCammon, J. A.; Monteiro-Riviere, N.; Rotello, V. M.; Rubloff, G. W.; Westervelt, R.; Yoda, M. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 3-7.
- (127) Chang, T. M. S. *Trends in Biotechnology* **1999**, *17*, 61-67.
- (128) Dixit, V.; Gitnick, G. *Eur. J. Surg.* **1998**, *164*, 71-76.
- (129) Blain, J. C.; Szostak, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 615-640.
- (130) Crick, F. H. C. *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 367-379.
- (131) Orgel, L. E. *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 381-393.
- (132) Lönnberg, T. *ACS Omega* **2017**, *2*, 5122-5127.
- (133) Verlander, M. S.; Lohrmann, R.; Orgel, L. E. *J. Mol. Evol.* **1973**, *2*, 303-316.
- (134) Ferris, J. P.; Hill Jr, A. R.; Liu, R.; Orgel, L. E. *Nature* **1996**, *381*, 59-61.
- (135) Strigunkova, T. F.; Lavrentiev, G. A.; Otroshchenko, V. A. *J. Mol. Evol.* **1986**, *23*, 290-293.
- (136) Schwartz, A. W.; Orgel, L. E. *J. Mol. Evol.* **1985**, *21*, 299-300.
- (137) Rajamani, S.; Vlassov, A.; Benner, S.; Coombs, A.; Olasagasti, F.; Deamer, D. *Orig. Life Evol. Biospheres* **2008**, *38*, 57-74.
- (138) Kanavarioti, A.; Monnard, P.; Deamer, D. W. *Astrobiology* **2001**, *1*, 271-281.
- (139) Monnard, P.; Ziock, H. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 1521-1539.
- (140) Anastasi, C.; Buchet, F.; Crowe, M.; Parkes, A.; Powner, M.; Smith, J.; Sutherland, J. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 721-739.
- (141) Nelson, K. E.; Levy, M.; Miller, S. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 3868-3871.
- (142) Plöger, T. A.; von Kiedrowski, G. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6908-6914.
- (143) Singhal, A.; Nielsen, P. E. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6901-6907.

- (144) Ricardo, A.; Carrigan, M. A.; Olcott, A. N.; Benner, S. A. *Science* **2004**, *303*, 196.
- (145) McCall, M. J.; Hendry, P.; Mir, A. A.; Conaty, J.; Brown, G.; Lockett, T. J. *Mol. Biotechnol.* **2000**, *14*, 5-17.
- (146) Xia, T.; SantaLucia, J.; Burkard, M. E.; Kierzek, R.; Schroeder, S. J.; Jiao, X.; Cox, C.; Turner, D. H. *Biochemistry* **1998**, *37*, 14719-14735.
- (147) He, C.; Gállego, I.; Laughlin, B.; Grover, M. A.; Hud, N. V. *Nat. Chem.* **2016**, *9*, 318-324.
- (148) Apel, C. L.; Deamer, D. W.; Mautner, M. N. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2002**, *1559*, 1-9.
- (149) Hanczyc, M. M.; Fujikawa, S. M.; Szostak, J. W. *Science* **2003**, *302*, 618-622.
- (150) Mansy, S. S.; Schrum, J. P.; Krishnamurthy, M.; Tobé, S.; Treco, D. A.; Szostak, J. W. *Nature* **2008**, *454*, 122-125.
- (151) Discher, B. M.; Won, Y.; Ege, D. S.; Lee, J. C.; Bates, F. S.; Discher, D. E.; Hammer, D. A. *Science* **1999**, *284*, 1143-1146.
- (152) Holowka, E. P.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12423-12428.
- (153) Percec, V.; Wilson, D. A.; Leowanawat, P.; Wilson, C. J.; Hughes, A. D.; Kaucher, M. S.; Hammer, D. A.; Levine, D. H.; Kim, A. J.; Bates, F. S.; Davis, K. P.; Lodge, T. P.; Klein, M. L.; DeVane, R. H.; Aqad, E.; Rosen, B. M.; Argintaru, A. O.; Sienkowska, M. J.; Rissanen, K.; Nummelin, S.; Ropponen, J. *Science* **2010**, *328*, 1009-1014.
- (154) Österlund, T.; Korhonen, H.; Virta, P. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1496-1499.
- (155) Eugen, B. Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. Viitattu 16.10.2018. Saatavilla: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.