

# *N*-metoksioksatsolidiiniligaatio peptidinukleiinihapporakenteissa

Erika Mesimäki  
Pro gradu -tutkielma  
Lääkekehityksen kemia  
Kemian laitos  
Turun yliopisto  
Helmikuu 2023

*Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu  
Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä.*

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

MESIMÄKI, ERIKA: *N*-metoksioksaatsolidiiniligaatio peptidinukleiinihapporakenteissa

Pro gradu -tutkielma, 31 s., liitteet 10 s.

Helmikuu 2023

---

Luonnossa reaktiot tapahtuvat hyvin matalissa konsentraatioissa reaktioliuosten sisältäessä jopa tuhansia reagensseja. Näitä reaktioita ohjaavat ja katalysoivat makromolekyylit kuten DNA:t ja RNA:t. Tätä luonnon lähestymistapaa reaktioiden kontrollointiin on hyödynnetty myös synteettisessä kemiassa niin kutsutuissa DNA-templatoituissa reaktioissa. DNA-templatoituissa reaktioissa reagensseina toimivat templaatile komplementaariset nukleiinihappujuosteet, joiden päihin on kiinnitetty reaktiivisia ryhmiä. DNA-templaatti ohjaa reagenssien liikettä Watson-Crickin emäspariperiaatteen mukaisesti. Templaatin hybridisoituessa nukleiinihappojen kanssa reaktiiviset ryhmät asettuvat toistensa läheisyyteen ja reagoivat siten tehokkaasti. DNA-templatoitujen reaktioiden avulla reaktiot saadaan tapahtumaan sellaisissa olosuhteissa, joissa tuotteiden muodostuminen jäisi perinteisin kemian keinoin olemattomaksi.

Nukleiinihappojen lisäksi DNA-templatoituissa reaktioissa DNA-templaatin kanssa hybridisoituvina juosteina on hyödynnetty myös esimerkiksi peptidinukleiinihappoja eli PNA:ita. PNA:t ovat nukleiinihappojen kaltaisia synteettisiä molekyyliä. Ne sisältävät perinteisten nukleiinihappojen tavoin puriini- ja pyrimidiinimäksiä, mutta sokerifosfaattirungon sijaan niiden runko muistuttaa peptidien runkoa. Varauksettoman runkonsa ansiosta PNA:t sitoutuvat voimakkaammin nukleiinihappojen kanssa kuin vastaavat nukleiinihapot.

Työn tarkoituksena oli tutkia DNA-templatoitua *N*-metoksioksaatsolidiiniligaatiota DNA-PNA-hybridirakenteessa. Koska PNA-DNA kaksoiskierteen pysyvyys on suurempi kuin luonnollisen DNA-DNA-kaksoiskierteen, tämän odotetaan tehostavan DNA-templatoitua ligaatiota ja mahdollistavan melko lyhyidenkin PNA-juosteiden käytön tehokkaan ligaation saavuttamiseksi. *N*-metoksioksaatsolidiinin muodostuminen on pH-riippuvainen reversiibeli reaktio, ja sitä on tutkittu aiemmin erilaisten nukleiinihappojen sekä peptidien ja nukleiinihappojen välillä. Tässä tutkimuksessa onnistuttiin syntetisoimaan ligaatioon tarvittavat PNA- ja DNA-reagenssit sekä tutkimaan näiden välistä *N*-metoksioksaatsolidiiniligaatiota. *N*-metoksioksaatsolidiinin havaittiin muodostuvan hieman happamissa olosuhteissa PNA-aldehydin sekä *N*-metoksimodifioitun hiusneulamaisen DNA-templaatin välille PNA-sekvenssin ollessa viiden nukleotidin mittainen.

Avainsanat: *N*-metoksioksaatsolidiiniligaatio, DNA-templatoitu reaktio, peptidinukleiinihappo

# Sisällysluettelo

<b>1. JOHDANTO</b> .....	<b>1</b>
1.1. DNA-TEMPLATOIDUT REAKTIOT .....	1
1.2. NUKLEIINIHAPPOTEMPLATOITUIJEN REAKTIOIDEN KEHITYS .....	3
1.3. PEPTIDINUKLEIINIhapot .....	4
1.3.1. <i>Suolan vaikutus PNA:n ja DNA:n hybridisaatioon</i> .....	6
1.4. PEPTIDINUKLEIINIhapot DNA-TEMPLATOIDUISSA REAKTIOISSA .....	7
1.4.1. <i>PNA:n templatoituja lugaatioreaktioita</i> .....	7
1.4.2. <i>Sovelluksia</i> .....	9
1.5. N-METOKSIOKSATSOLIDIINI LIGAATIO .....	11
1.6. TYÖN TARKOITUS.....	13
<b>2. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b> .....	<b>14</b>
2.1. PNA-ALDEHYDIPREKURSORI .....	14
2.2. ALDEHYDIMODIFIOITU PNA .....	15
2.2.1. <i>PNA-synteesi</i> .....	15
2.2.2. <i>Aldehydiprekursorin manuaalilytkentä kantajalla</i> .....	16
2.2.1. <i>Hapetus aldehydiksi</i> .....	16
2.3. HIUSNEULAMAINEN U <sup>NOME</sup> -MODIFIOITU DNA .....	17
2.4. DNA-TEMPLATOITU N-METOKSIOKSATSOLIDIINI LIGAATIO.....	17
<b>3. JOHTOPÄÄTÖKSET JA YHTEENVETO</b> .....	<b>20</b>
<b>4. KOKEELLISET MENETELMÄT</b> .....	<b>21</b>
4.1. YLEISET MENETELMÄT .....	21
4.2. PNA-ALDEHYDIPREKURSORI .....	21
4.2.1. <i>Alkylaatio ja asylaatio</i> .....	21
4.2.2. <i>Hapetus</i> .....	22
4.2.3. <i>Diolin suojaus</i> .....	22
4.2.4. <i>Hydrolyysi</i> .....	23
4.3. ALDEHYDIMODIFIOITU PNA .....	23
4.3.1. <i>PNA-synteesi</i> .....	23
4.3.2. <i>Aldehydiprekursorin manuaalilytkentä kantajalla</i> .....	24
4.3.3. <i>Hapetus aldehydiksi</i> .....	25
4.4. HIUSNEULAMAINEN U <sup>NOME</sup> -MODIFIOITU DNA .....	25
4.5. DNA-TEMPLATOITU N-METOKSIOKSATSOLIDIINI LIGAATIO.....	26
<b>5. LÄHDELUETTELO</b> .....	<b>28</b>
<b>6. LIITTEET</b> .....	<b>32</b>

## Lyhenteet

A	Adeniini
Ala	Alaniini
Bz	Bentsoyyli
C	Sytosiini
CuAAC	Kuparikatalysoitu atsidi-alkyyini sykloadditio
DIPEA	<i>N,N</i> -di-isopropylietyyliamiini
DMF	Dimetyyliformamidi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
dT	2'-deoksiribotymidiini
Fmoc	9-Fluorenyylimetyylioksidikarbonyyli
Gly	Glysiini
Hp-DNA	Hiusneulamuotoinen DNA
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
L(Hp-PNA)	Hiusneulamuotoisen DNA:n ja PNA:n ligaatiotuote
MS	Massaspektrometria
NCL	Natiivi kemiallinen ligaatio
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
ON	Oligonukleotidi
PCR	Polymeraasiketjureaktio
PNA	Peptidinukleiinihappo
PNA-CHO	Aldehydi-PNA
poly-dA	poly-deoksiriboadenosiini
poly-rU	poly-deoksiribouridiini
RNA	Ribonukleiinihappo
T	Tymiini
TFA	Trifluoretikkahappo
TFMSA	Trifluorimetaanisulfonihappo
TLC	Ohutkerroskromatografia
U <sup>NOMe</sup>	<i>N</i> -metoksimodifioitu uridiini
UV	Ultraviolettisäteily

# 1. Johdanto

## 1.1. DNA-templatoitujen reaktiot

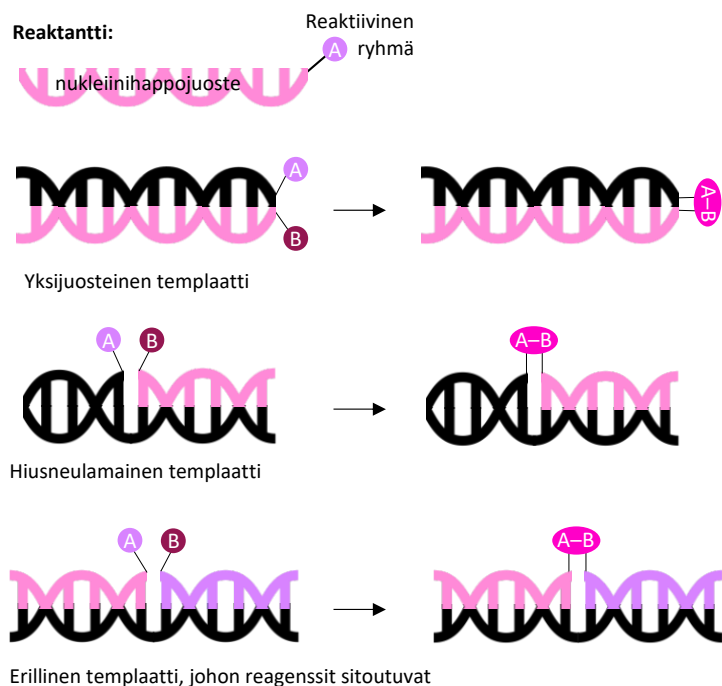
Luonnossa reaktiot tapahtuvat hyvin matalissa konsentraatioissa sekä sellaisissa liuoksissa, jotka sisältävät valtavan määrän reaktantteja. Jotta tällaisissa olosuhteissa reaktioissa syntyisi haluttuja tuotteita, tai että reaktioita ylipäättään tapahtuisi merkittävässä määrin, reaktioita täytyy ohjata. Luonnossa reaktioiden ohjaaminen tapahtuu erilaisten makromolekyylien avulla. Makromolekyylinä voi toimia esimerkiksi proteiini, joka katalysoi toisten molekyylien välisiä reaktioita. Toinen huomattavan tärkeä rooli reaktioiden ohjaamisessa on deoksiribonukleiinihappoilla (DNA). DNA-molekyylit toimivat malleina eli DNA-templaatteina proteiinisynteesissä syntyville proteiineille. DNA-templaattit ohjaavat proteiinien muodostusta transkriptio nimisessä tapahtumassa, jossa DNA toimii mallina muodostuvalle RNA-juosteelle. Tästä RNA-juosteesta muodostetaan proteiini translaatioissa. Proteiinisynteesissä nukleiinihappoon sisällytetty koodi muutetaan rakenteeltaan erilaiseksi molekyyliksi, jolla on nukleiinihappoista eroavia ominaisuuksia.

Kemiallisten reaktioiden kontrollointi on keskeinen haaste synteettisessä kemiassa. Perinteisesti kemistit kontrolloivat reaktiivisuutta käyttämällä pienmolekyylikatalyyttejä tai liuotinominaisuuksia, lämpötilaa ja reagenssien konsentraatiota muuttamalla. Luonnon lähestymistapaa reaktioiden hallintaan voidaan kuitenkin hyödyntää myös synteettisessä kemiassa DNA-templatoituissa reaktioissa.<sup>1</sup> Kuten luonnossakin, näissä reaktioissa DNA toimii reaktioita spesifisesti säätelevänä yksikkönä. DNA-templatoituissa reaktioissa on käytetty DNA:n kanssa reagoivina molekyyleinä perinteisiä nukleiinihappoja DNA:ta ja RNA:ta sekä esimerkiksi peptidinukleiinihappoja (PNA).<sup>1</sup>

DNA-templatoitujen reaktioiden toimintaperiaate nojaa Watson-Crickin emäspariperiaatteeseen.<sup>1</sup> Sen mukaan nukleiinihappojen emäkset pariutuvat toistensa kanssa niin, että adeniini pariutuu aina tymiinin kanssa ja guaniini sytosiinin kanssa. RNA:ssa tymiini korvautuu urasiililla, joka pariutuu adeniinin kanssa vastaavasti. Tymiini tai urasiili muodostaa adeniinin kanssa kaksi vetysidosta, kun taas guaniinin ja sytosiinin välille muodostuu kolme vetysidosta. DNA-templatoituissa reaktioissa oligonukleotidien kyky tunnistaa emäksiä mahdollistaa kemiallisten reaktioiden ohjaamisen. DNA-templatoitujen reaktioiden reaktanttina toimii nukleiinihappojuoste, jonka päässä on yleensä linkkerillä kiinnitettynä jokin reaktiivinen ryhmä.<sup>1</sup> Tämä

reaktiivinen ryhmä reagoi toisen reaktiivisen ryhmän kanssa, joka voi olla kiinni joko templaattina toimivassa nukleiinihappossa tai erillisessä nukleiinihappossa. Reaktioissa DNA-templaatti ohjaa muiden nukleiinihappojen liikettä emästen vuorovaikutusten avulla, ja ohjaa näin nukleiinihappoissa kiinni olevat reaktiiviset ryhmät toistensa läheisyyteen kasvattaen niiden paikalliskonsentraatiota. Paikalliskonsentraation kasvu mahdollistaa reaktiivisten ryhmien tehokkaan reagoimisen, minkä ansiosta reaktionopeus kasvaa. Lisäksi tämä mahdollistaa DNA-templatoitujen reaktioiden suorittamisen sellaisissa olosuhteissa, joissa reaktiotuotteiden muodostuminen ilman templaattia jäisi heikoksi (= templatoimattoman taustareaktion eliminoiminen). Reaktiot suoritetaankin usein matalissa konsentraatioissa, jolloin sivutuotteita ei pääse muodostumaan merkittävässä määrin.<sup>1</sup> Templaattien käyttö mahdollistaa myös one pot -reaktiot, joissa useat reaktiot tapahtuvat samanaikaisesti samassa reaktioluoksessa.<sup>2</sup>

DNA-templatoituja reaktioita voidaan suorittaa käyttäen erilaisia templaatteja (kuva 1). Yksinkertaisin vaihtoehto on käyttää templaattia, jonka päässä on reaktiivinen ryhmä sekä tähän sitoutuvaa toista nukleiinihappoa, jonka päässä on toinen reaktiivinen ryhmä. Reagoidessaan nämä kaksi juostetta pariutuvat keskenään, jolloin reaktiiviset ryhmät reagoivat. Templaattina toimiva juoste voi myös olla osittain itsensä kanssa komplementaarinen, jolloin templaatti muodostaa hiusneulamaisen rakenteen mennessään osittain itsensä kanssa kaksoiskierteelle. Yksijuosteiseen osaan voi sitoutua toinen nukleiinihappo, mikä mahdollistaa tässäkin tapauksessa reaktiivisten ryhmien reagoimisen. Kolmas vaihtoehto on käyttää DNA-templaattia, joka ei sisällä reaktiivista ryhmää. Tähän voi sitoutua kaksi tai useampaa nukleiinihappoa, joiden sisältämät reaktiiviset ryhmät reagoivat toistensa kanssa.<sup>1</sup>



Kuva 1 Erilaisia DNA-templaatteja

## 1.2. Nukleiinihappotemplatoitujen reaktioiden kehitys

Nukleiinihappotemplatoituilla reaktioilla on pitkä historia, joka juontaa juurensa prebioottiseen kemiaan ja elämän synnyn tutkimiseen.<sup>3</sup> Ensimmäisissä nukleiinihappotemplatoitujen reaktioiden tutkimuksissa osoitettiin, että oligonukleotidi pystyi toimimaan templaattina ligaatioreaktiossa, jossa sille komplementaariset fosfodiesteraktivoituneet nukleiinihappojuosteet muodostavat fosfodiesterisidoksen.<sup>4,5</sup> Naylor ja Gilham havaitsivat 1966 tutkimuksissaan poly-dA-templaatin ohjaavan fosfodiesterisidoksen muodostumista karbodiimidillä aktivoitujen dT6-oligonukleotidien välille.<sup>4</sup> Orgel tutkimusryhmineen sai samankaltaisia tuloksia, kun he onnistuivat liittämään imidatsolilla aktivoituja adenosinimonomeerejä toisiinsa käyttäen poly-rU-templaattia.<sup>5</sup> Tutkimukset osoittivat nukleiinihappojen voivan polymerisoitua templaatin avustamana ilman entsyymiä.

Ensimmäisistä luonnollista fosfodiesterisidoksen muodostumista jäljittelevistä tutkimuksista templatoituneet reaktiot ovat kehittyneet reaktioihin, joilla ei ole rakenteellista samankaltaisuutta fosfodiesterisidoksiin. Tämä on laajentanut DNA-templatoitujen reaktioiden käyttömahdollisuuksia. Ensimmäinen reaktio, joka erosi fosfodiesterisidoksen muodostumisesta, suoritettiin liittämällä viisi PNA-dimeeriä toisiinsa amidiligaatiolla RNA-templaatin ohjaamana.<sup>6</sup> Tässä Nielsenin ja Orgelin prebioottista elämää mallintavassa tutkimuksessa osoitettiin informaation siirtyminen

RNA:sta muuhunkin materiaaliin kuin nukleiinihappoihin. Tutkimus oli merkittävä myös templatoidujen reaktioiden kehityksen kannalta, sillä se osoitti synteettisten molekyylien polymerisoimisen templatoidusti mahdolliseksi.

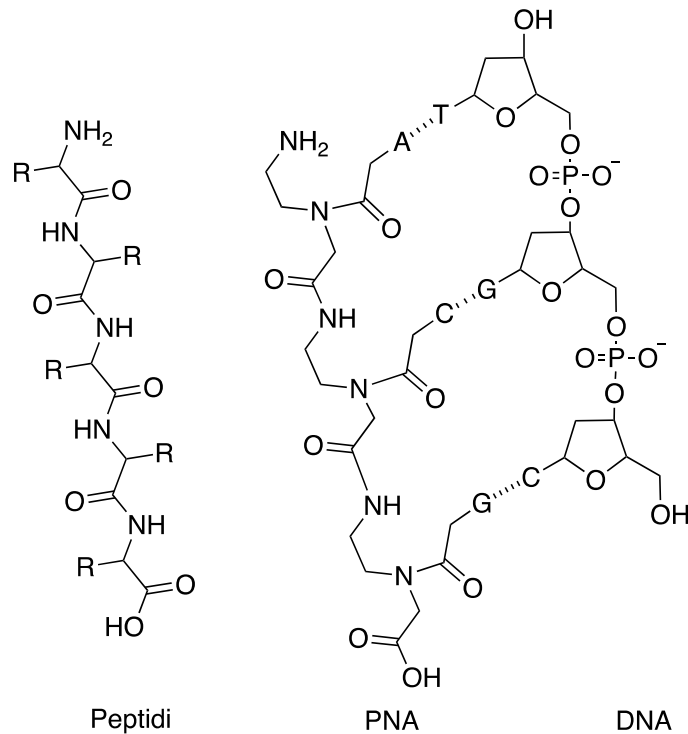
DNA:n käyttö reaktantteja ohjaavana molekyylinä rajoittaa DNA-templatoiduissa reaktioissa hyödynnettäviä molekyyliä, sillä käytettyjen molekyylien tulisi olla yhdistettävissä DNA:han. Tämä rajoittaa huomattavasti DTS-reaktioiden avulla saavutettavien molekyylien rakenteita ja niiden ominaisuuksia.<sup>1</sup> Tämän vuoksi suurena mielenkiintona on ollut kehittää sellaisia DTS-reaktioita, joiden avulla voidaan syntetisoida rakenteellisesti nukleiinihapoista eroavia molekyyliä.

Liu tutkimusryhmineen ovat onnistuneet laajentamaan DTS-reaktioita useisiin molekyyliin, jotka eroavat rungoltaan DNA:sta.<sup>7</sup> Aluksi he tutkivat konjugaattien additio- ja substituutioreaktioita useilla erilaisilla nukleofiilillä ja elektrofiilillä ryhmällä, ja havaitsivat näiden toimivan tehokkaasti 60 nM konsentraatioissa. Vastaavasti tuotteita ei muodostunut, kun DNA-sekvenssit eivät olleet komplementaarisia.<sup>7</sup> Tutkimukset osoittivat DTS-reaktioiden toimivan tehokkaasti ja sekvenssispesifisesti myös silloin, kun reaktantit ja tuotteet eroavat rakenteellisesti nukleiinihapoista. Löydön seurauksena DTS-reaktioita laajennettiin entisestään monimuotoisempaan joukkoon erilaisia reaktioita, esimerkiksi oksatsolidiin muodostumiseen<sup>8</sup> sekä useisiin hiili–hiili-sidosten muodostumisreaktioihin<sup>9</sup>. Erilaisten reaktiotyyppien lisäksi DNA-templatoiduja reaktioita on myös kehitetty toimivaksi monivaiheisissa molekyylien synteeseissä, joissa templaatin ohjaamana syntyy usean reaktiovaiheen kautta erillinen pieni molekyyli<sup>10</sup> tai synteettinen polymeeri<sup>11,12</sup>.

### 1.3. Peptidinukleiinihapot

Peptidinukleiinihapot ovat synteettisiä DNA:n analogeja, jotka muistuttavat rakenteeltaan sekä peptidejä että nukleiinihappoja (kuva 2).<sup>13</sup> PNA:iden runko koostuu peptidisidoksin toisiinsa liittyneistä *N*-(2-aminoetyyli)-glysiiniyksiköistä ja muistuttaa siten peptidien runkoa. Runkoon on kiinnittynyt metyleenisillan ja karbonyyliryhmän avulla nukleiinihapoista tuttuja puriini- ja pyrimidiiniemäksiä, mikä luo yhteyden nukleiinihappoihin. Lisäksi runko on suunniteltu mukailemaan DNA:n runkoa, ja rungon sidosten määrä sekä välimatka emästen välillä vastaa DNA:ta. PNA:iden runko on kuitenkin varaukseton toisin kuin negatiivisesti varautuneiden nukleiinihappojen sokeri-fosfaattirunko.<sup>13</sup>



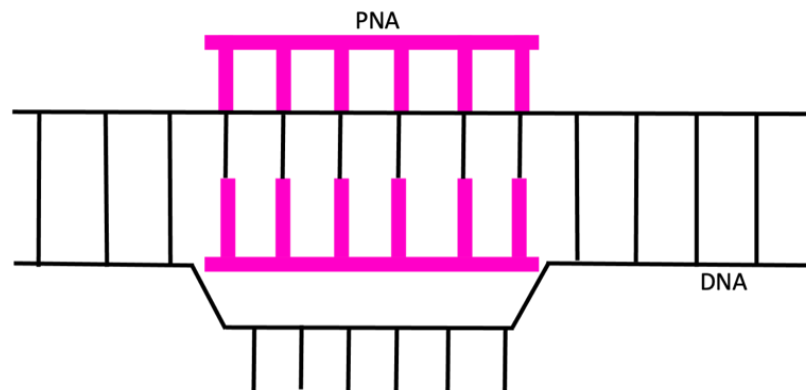


*Kuva 2 Peptidi, PNA ja DNA<sup>14</sup>*

Nukleoemästen ansiosta PNA:t käyttäytyvät nukleiinihappojen kaltaisesti ja voivat sitoutua vetysidoksin komplementaaristen DNA- ja RNA-juosteiden kanssa Watson–Crickin emäspariperiaatteen mukaisesti.<sup>13,15</sup> Varauksettoman runkonsa ansiosta PNA:t kuitenkin sitoutuvat komplementaarisiiin nukleiinihappojuosteisiin voimakkaammin kuin vastaavat DNA:t tai RNA:t muodostaen pysyvämpiä kaksoiskierteitä.<sup>13</sup> Esimerkiksi 15-meerisen PNA/DNA- tai PNA/RNA-kaksoiskiirteen sulamislämpötila voi olla noin 70 °C, kun taas vastaavan DNA/DNA- tai DNA/RNA-kaksoiskiirteen sulamislämpötila vain 55 °C.<sup>16</sup> Tämä on seurausta peptidinukleiinihappojen elektrostaattisten hylkimisvoimien puutteesta, joita esiintyy negatiivisesti varautuneiden nukleiinihappojen välillä, sekä lisäksi PNA-rungon paremmasta joustavuudesta.<sup>13,16</sup> Lisäksi PNA:t ovat joissain tapauksissa komplementaarisuuden suhteen spesifisempiä kuin vastaavat nukleiinihapot, sillä ei-komplementaarinen emäs aiheuttaa suuremman destabiloivan vaikutuksen PNA:ssa kuin nukleiinihapoissa.<sup>13,16</sup> Peptidinukleiinihappojen etuihin lukeutuu myös niiden resistiivisyys sekä nukleiinihappoja pilkkovia nukleaaseja että proteiineja pilkkovia proteaaseja kohtaan, mikä parantaa niiden biostabiilisuutta.<sup>17</sup>

PNA:iden voimakkaampi affiniteetti DNA:ta kohtaan saa aikaan myös sen, että homopyrimidiini-PNA kykenee sitoutumaan komplementaariseen kaksijuosteiseen DNA:han syrjäyttäen ei-komplementaarisen juosteen tältä osin. Tämän ansiosta

peptidinukleiinihapot pystyvät muodostamaan PNA/DNA/PNA-kolmoiskierteitä DNA:n kanssa, kun toinen PNA-juoste sitoutuu Watson–Crickin emäspariperiaatteella komplementaariseen juosteeseen ja toinen PNA sitoutuu tähän Hoogsteenin emäspariutumisella. DNA:n ei-komplementaarinen juoste muodostaa tässä tapauksessa pullistuman kolmoiskierteen vierelle siltä osin, kun se on syrjäytetty (kuva 3).<sup>13,18</sup> Lisäksi PNA:t pystyvät muodostamaan kaksoiskierteitä paralleelisesti sekä antiparalleelisesti kun taas DNA:t pystyvät muodostamaan näitä ainoastaan antiparalleeliseen suuntaan. PNA:iden kohdalla antiparalleelinen orientaatio on kuitenkin pysyvämpi.<sup>15</sup>



*Kuva 3 PNA:n ja DNA:n muodostama tripleksi, jossa ylempi PNA on sitoutunut DNA:han Hoogsteenin emäspariutumisella ja alempi PNA Watson–Crickin emäspariperiaatteen mukaisesti<sup>14</sup>*

### 1.3.1. Suolan vaikutus PNA:n ja DNA:n hybridisaatioon

DNA ja RNA juosteet ovat negatiivisesti varautuneita. Laskostuessaan kolmiulotteiseen muotoonsa fosfaattien negatiiviset varaukset aiheuttavat repulsioita näissä molekyyliissä, mikä hankaloittaa nukleiinihappojen laskostumista. Repulsiota voidaan vähentää positiivisesti varautuneiden ionien avulla, minkä vuoksi nukleiinihappojen toiminta on riippuvaista kationien konsentraatiosta liuoksessa. Sekä monovalenttiset että divalenttiset ionit stabiloivat tehokkaasti nukleiinihappoja sekä näiden kaksoiskierteitä.<sup>19,20</sup> Peptidinukleiinihapot ovat varauksettomia, minkä vuoksi näiden kohdalla suolalla ei ole samanlaista vaikutusta pysyvyyteen. Sen sijaan että kationit stabiloisivat PNA/DNA-kaksoiskierrettä, on niiden havaittu destabiloivan näitä rakenteita.<sup>21,22</sup> Suolan on havaittu vaikuttavan etenkin kaksoiskierteen muodostumiseen hidastaen hybridisaatiota. Sen sijaan kaksoiskierteen dissosiaatioon suolalla on mitätön vaikutus, ja näin ollen suolan destabiloivan vaikutuksen voidaan päätellä olevan seurausta heikentyneestä assosiaatiosta.<sup>21</sup>

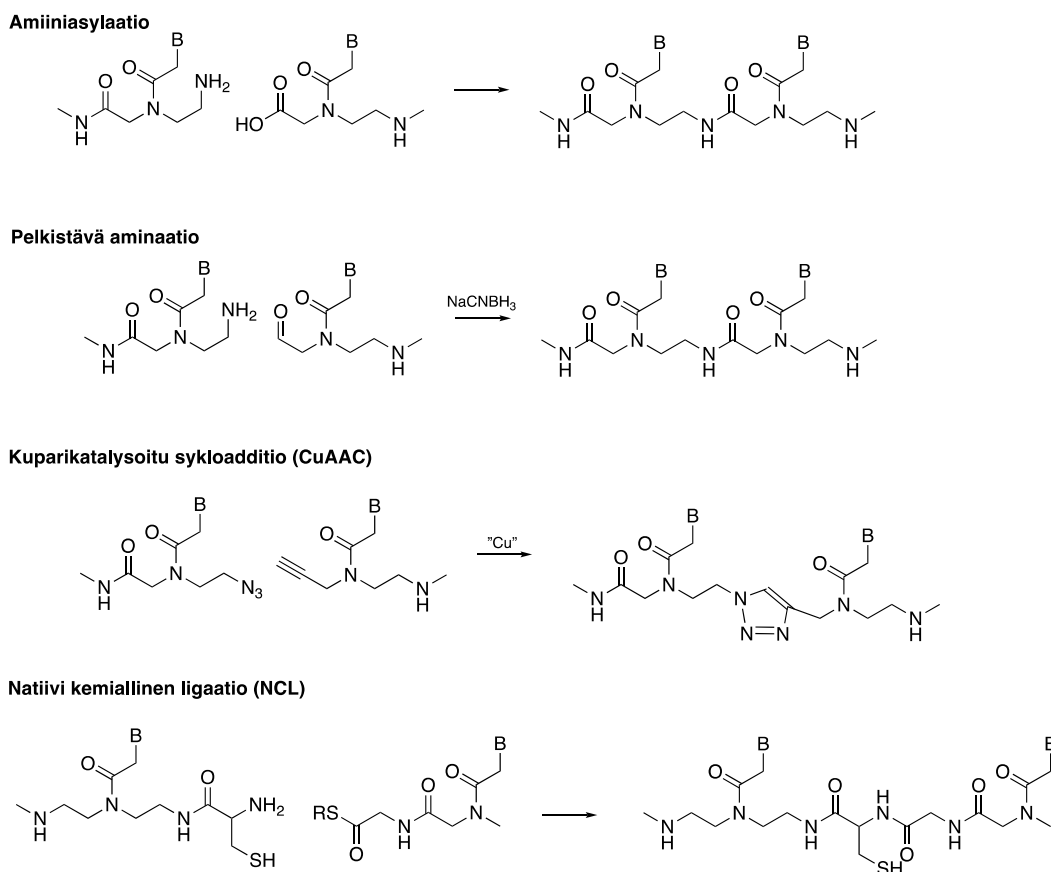
## 1.4. Peptidinukleiinihapot DNA-templatoituissa reaktioissa

PNA:n hybridisaatio-ominaisuudet, yhdistettävyyys perinteiseen kiinteän kantajan peptidisynteesiin sekä kombinatoriaaliseen kemiaan tekevät PNA:sta houkuttelevan vaihtoehdon nukleiinihappojen rinnalle käytettäväksi DNA-templatoituissa reaktioissa. Tutkimukset DNA-templatoituista PNA-oligomeereistä ovat osoittaneet, että DNA-templatoitujen reaktioiden avulla voidaan valmistaa synteettisiä polymeerejä, jotka vastaavat pituudeltaan luonnon biopolymeerejä, joilla on sitoutumis- tai katalyyttiominaisuuksia<sup>23,1</sup>. DNA-templatoituja reaktioita voidaan hyödyntää myös PNA:iden ohjaamisessa, ja tällaisia sovelluksia on tutkittu käytettäväksi esimerkiksi diagnostiikassa<sup>24</sup>, PNA:iden *in vitro* valinnassa<sup>11</sup> sekä kombinatoriaalisissa molekyylikirjastoissa pienten molekyylien tunnistena<sup>25</sup>.

### 1.4.1. PNA:n templatoituja ligaatioreaktioita

Aiemmin tutkituissa PNA:n templatoituissa reaktioissa ligaatioreaktioita PNA-fragmenttien välillä on suoritettu eri tavoin. Ensimmäisissä PNA:n DNA-templatoituissa reaktioissa PNA-fragmentteja oligomerisoitiin DNA-templaattilla käyttäen amidisidoksen muodostumista (kuva 4).<sup>6,26</sup> Reaktioissa saannot jäivät kuitenkin heikoiksi, ja PNA-fragmentit pystyivät muodostamaan templaatille ei-komplementaarisia oligomeerejä johtaen ennustamattomiin tuoteseoksiin.

Pilottitutkimusten ongelmat ratkaistiin käyttämällä amidikytkennän sijaan pelkistävää aminaatiota (kuva 4), jolla oli aiemmin saatu lupaavia tuloksia DNA-analogien<sup>27</sup> kanssa.<sup>28</sup> Pelkistävässä aminaatioissa PNA-aldehydi reagoi hiusneulamaisen 5'-amiinimodifioitun DNA-templaatin kanssa NaCNBH<sub>3</sub>:n läsnäollessa. Tulokset osoittivat reaktion aikaansaavan tehokkaan oligomerisaation PNA-aldehydeillä, sillä reaktiossa haluttua tuotetta muodostui yli 90 %:n saannolla. Ilman NaCNBH<sub>3</sub>:a tuotteita ei havaittu muodostuvan. Oligomerisaation havaittiin olevan myös erittäin regio- ja sekvenssispesifinen, sillä PNA-sekvenssin muodostus pysähtyi heti, jos templaatissa tuli vastaan PNA:lle ei-komplementaarinen emäs.<sup>28</sup>



Kuva 4 Tutkittuja PNA:n templatoituja ligaatioreaktioita<sup>29</sup>

PNA:iden DNA-templatoiduissa ligaatioissa on myös hyödynnetty esimerkiksi kupari(I)katalysoitua sykloadditiota (CuAAC) (kuva 4).<sup>30</sup> Kupari(I)katalysoidussa sykloadditiossa terminaalisen atsidin sisältävä PNA-oligomeeri reagoi alkyynimodifioidun PNA:n kanssa kuparisulfaatin ja askorbiinihapon läsnäollessa muodostaen triatsolin. Templaattina tässä reaktiossa käytetään erillistä templaattia. Kun toisiinsa liitettävät PNA-sekvenssit olivat templaatin kanssa komplementaarisia triatsoliligaation havaittiin tapahtuvan kvantitatiivisesti. Jos PNA:ssa oli yksikin ei-komplementaarinen emäs, reaktio jäi vajaaksi. Täysin sattumanvaraisen sekvenssin kanssa tuotetta ei havaittu muodostuvan.<sup>30</sup>

Neljäs vaihtoehtoinen ligaatiotapa on natiivi kemiallinen ligaatio (NCL) (kuva 4). NCL tapahtuu tiolinvaihtoreaktionä PNA-fragmenttien kysteini-konjugaatin ja tioesterin välillä PNA-juosteiden hybridisoituessa DNA-templaatin kanssa.<sup>24</sup> Templaattina NCL:ssä on käytetty sekä yksijuosteista synteettistä DNA:ta sekä kaksijuosteista solusta eristettyä DNA:ta. Tutkittaessa yksijuosteisen templaatin sekvenssin vaikutusta ligaatiotuotteen muodostumiseen, havaittiin ligaation olevan hyvin sekvenssispesifinen. Täysin komplementaarisen sekvenssin kanssa ligaatiotuotetta muodostui 70 % saannolla.

Kun komplementaarisessa templaattissa oli yksikin ei-komplementaarinen emäs tai templaattia ei ollut ollenkaan, muodostuneen ligaatiotuotteen määrä oli olematon.<sup>24</sup>

#### 1.4.2. Sovelluksia

PNA:ita DNA-templatoituissa reaktioissa voidaan hyödyntää esimerkiksi molekyylien etsintään evoluutiota muistuttavissa keinotekoisissa laboratorio-olosuhteissa. Näissä etsintä perustuu mutaatioiden, valinnan ja lisääntymisen sykliin. Tällainen molekyylien etsintätapa on perinteisesti rajoittunut biologisiin koneistoihin liitettäviin molekyyliin eli nukleiinihappoihin ja proteiineihin. Viime vuosikymmenten aikana on kuitenkin tutkittu mahdollisuuksia tuottaa nukleiinihappotemplatoidusti synteettisiä ja sekvenssispesifisiä polymeerejä, jolloin myös synteettiset molekyylit saataisiin valjastettua osaksi edellä kuvattuja etsintäkoneistoja.<sup>11</sup> Mikäli synteettiset polymeerit kuten PNA:t saataisiin osaksi tällaisia etsintäkoneistoja, voitaisiin näiden joukosta löytää molekyyliä, joilla olisi esimerkiksi terapeuttisia tai katalyyttisiä ominaisuuksia.<sup>11</sup> Kuten esimerkiksi proteiinien kohdalla, myös synteettisten polymeerien kohdalla olisi tärkeää, että polymeeri muodostuu virheettömästi templaatin ohjeistuksella. Lisäksi muodostuneen polymeerin olisi kyettävä irtautumaan templaattista, jotta se kykenisi laskostumaan ja ottamaan siten sille ominaisen kolmiulotteisen rakenteensa.<sup>11</sup>

Tällä saralla on saatu aikaan lupaavia tuloksia, kun DNA-templatoitu PNA:n oligomerisaatio onnistuttiin liittämään osaksi synteettisten PNA:iden *in vitro* valintasysteemiä.<sup>11</sup> Valintasysteemissä hiusneulamuoitoiseen DNA-templaattiin liitetään PNA-fragmentteja pelkistävällä aminaatiolla. PNA:n polymerisaation jälkeen PNA syrjäytetään DNA-templaattista polymeerasientsyymien avulla, joka auttaa uuden DNA-juosteen rakentumisessa PNA:n tilalle. Vapautunut PNA-juoste pystyy siten laskostumaan ja ottamaan kolmiulotteisen rakenteensa. Vapaiden PNA:iden joukosta pystytään valitsemaan haluttuja ominaisuuksia ilmentävä molekyyli, jota koodaava DNA-sekvenssi sitten monistetaan. Monistettuihin DNA-sekvensseihin voidaan aiheuttaa mutaatioita, jotka sitten voidaan jälleen kääntää PNA:iksi DNA-templatoitulla PNA:n polymerisaatiolla. Sykliä voidaan jatkaa, kunnes on löytynyt molekyyli, joka on haluttujen ominaisuuksien suhteen optimaalinen.<sup>11</sup>

Samankaltaista sovellusta on myös kehitetty PNA:han tai nukleiinihappoihin liittymättömien synteettisten monomeerien polymerisoimiseksi.<sup>12</sup> Tässä tapauksessa PNA:t toimivat siirtäjä-RNA:n tavoin ja kuljettavat niihin kiinnitetyt synteettiset monomeerit DNA-templaatin määräämään järjestykseen, mahdollistaen synteettisen

polymeerin valmistuksen DNA:n koodin mukaisesti.<sup>12</sup> Synteettiset monomeerit kiinnitetään ohjaaviin PNA-fragmenteihin katkaistavilla disulfidi-linkkereillä. PNA:t sitoutuvat templaattina toimivaan DNA:han emäspariperiaatteen mukaisesti ohjaten synteettiset monomeerit toistensa läheisyyteen, jolloin ne sitoutuvat toistensa kanssa tehokkaasti kuparikatalysoidulla sykloadditiolla. Valmis polymeeri voidaan irrottaa PNA:ista katkaistavien disulfidi-linkkereiden ansiosta.<sup>12</sup>

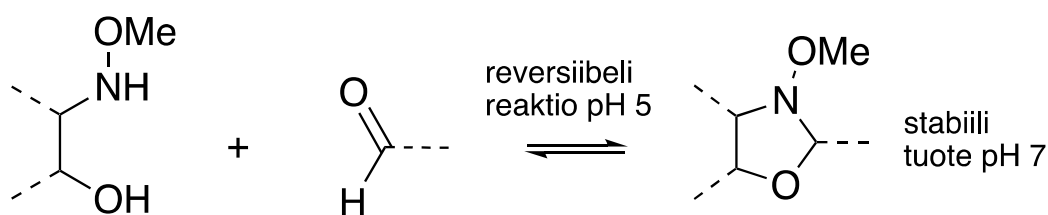
PNA:ta voidaan lisäksi hyödyntää kombinatoriaalisissa molekyylikirjastoissa pienten molekyylien tunnistena.<sup>25</sup> PNA:iden avulla molekyylien joukosta voidaan valita DNA-templatoidusti ne molekyylit, joilla on affiniteetti haluttua kohdemolekyyliä vastaan. Tämä voidaan suorittaa liittämällä pieniin molekyyliin PNA-sekvenssi. PNA-sekvenssit kiinnitetään osaan molekyyleistä niiden N-terminuksesta ja osaan C-terminuksesta. PNA-sekvenssit sitoutuvat templaatoidusti DNA:han, jolloin PNA:iden päissä olevat molekyylit asettuvat vierekkäin. Kahden vierekkäisen molekyylin affiniteettia voidaan tämän jälkeen mitata haluttua kohdemolekyyliä kohtaan altistamalla erilaiset PNA/DNA-kompleksit kohdemolekyyliin, joka on kiinnitetty esimerkiksi magneettiseen kantajamateriaaliin. Sitoutuneet kompleksit voidaan poimia joukosta, jonka jälkeen DNA voidaan erottaa tästä ja monistaa PCR:n avulla. Monistettujen DNA-sekvenssien avulla molekyylikirjastosta voidaan poimia edellä valikoituneet molekyylit PNA:iden hybridisaatiokykyä hyödyntäen.<sup>25</sup>

PNA:n sekvenssispesifistä sitoutumista sekä korkeaa affiniteettia DNA:han voitaisiin potentiaalisesti hyödyntää myös esimerkiksi PCR:n avulla suoritettavassa diagnostiikassa.<sup>24</sup> Sovelluksessa hyödynnetään PNA:han perustuvaa ligaatiokemiaa (NCL) yhden emäksen mutaatioiden tunnistamisessa, ja analyysi voidaan suorittaa kaksijuosteiseen DNA-templaattiin, mikä helpottaa analyysimetodin käyttökelpoisuutta. PNA:n sitoutuminen kaksijuosteiseen DNA:han onnistuu PNA:n päihin liitettävien apufragmenttien avulla, jotka estävät DNA:ta palaamasta kaksoiskierteelle termalisen denaturaation jälkeen.<sup>24</sup> Ongelmaksi nousi ligaatiotuotteen inhibitio, joka johtui ligaatiotuotteen suuremmasta affiniteetista DNA:ta kohtaan verrattuna reaktantteihin ennen ligaatiota.<sup>31</sup> Ratkaisuksi tähän esitettiin isokysteiniin käyttämistä kysteiniin sijaan ligaatioreaktiossa tioesterin kanssa. Isokysteiniinissä amino- ja tioliryhmät vaihtavat keskenään paikkoja verrattuna kysteiniin. Tioesterin reagoidessa isokysteiniin kanssa PNA:n pääketju pitenee 13 sigmasidokseen, jolloin ligaatiotuotteen affiniteetti templaattia kohtaan pienenee verrattuna tioesteri-intermediaattiin ja tuotteen inhibitio

vähenee.<sup>31</sup> Ligaatiotuotteen uudelleensitoutuminen DNA-templaattien kanssa puolestaan voidaan estää käyttämällä ligaatiotuotteen syklistaatiota.<sup>32</sup>

### 1.5. *N*-metoksioksatsolidiiniligaatio

*N*-metoksioksatsolidiinin muodostuminen on dynaaminen pH-herkkä tasapainoreaktio.<sup>33</sup> Reaktio on reversiibeli hieman happamissa olosuhteissa, kun taas korkeammassa pH:ssa reaktiota ei tapahdu, ja näin ollen muodostunut rakenne pysyy stabiilina (kaavio 1). *N*-metoksioksatsolidiinia voidaan siten pitää hajoavana linkkerinä, ja sillä voisi olla käyttömahdollisuuksia esimerkiksi lääkemolekyyleissä.<sup>33</sup> Templatoitua *N*-metoksioksatsolidiinin muodostumisreaktiota voitaisiin puolestaan hyödyntää esimerkiksi dynaamisissa itsestään replikoituvissa systeemeissä sekä hybridisaatioon perustuvissa nanokoneistoissa.<sup>34</sup>



Kaavio 1 *N*-metoksioksatsolidiinin muodostuminen

*N*-metoksioksatsolidiiniligaation suunnittelun pohjana käytettiin neoglykosidien sekä oksatsolidiinin kemiaa.<sup>33</sup> Neoglykosylaatio on happokatalysoitu reaktio, joka tapahtuu sokerin hemiasetaalin ja *N*-metyylialkoksiamiinin välillä, ja sitä on hyödynnetty erilaisten hiilihydraattikonjugaattien syntetisoinnissa.<sup>35,36</sup> Reaktio on ortogonaalinen ja sen rakenne muistuttaa natiivia glykaanin rakennetta. Reaktion ongelmana on kuitenkin sen huono tasapainovakio, joka on vesipitoisissa liuksissa (pH < 6) alle 100 M<sup>-1</sup>. *N*-metoksioksatsolidiinin tarkoituksena oli säilyttää neoglykosylaation pH profiili, mutta parantaa sen tasapainosaantoa hyödyntämällä alkoksiamiinin edistämää happokatalysoitua *N,O*-transasetalisaatiota viisijäsenisen oksatsolidiinirenkaan muodostumiseen.<sup>33</sup>

*N*-metoksioksatsolidiinin muodostuminen voidaan pysäyttää nostamalla reaktioliuoksen pH:ta. Tämän ansiosta reaktiotuotteet voidaan eristää HPLC:n avulla ilman huomattavaa tuotteiden hydrolysoitumista takaisin lähtöaineiksi käyttäen trietyyliammoniumasetatipuskuria (50 mmol<sup>-1</sup>, pH 7) vesipitoisessa asetonitriili

gradientissa.<sup>34</sup> *N*-metoksioksaatsolidiiniligaation käyttökelpoisuutta lisää se, että reaktiiviset *N*-metoksimodifioidut oligonukleotidit sekä peptidialdehydit voidaan syntetisoida automatisoidusti. Oligonukleotidien synteesissä *N*-metoksimodifioitu uridiini voidaan liittää kiinteään kantajaan, jonka jälkeen loppusekvenssi voidaan syntetisoida oligonukleotidisyntetisaattorilla. Aldehydipeptidit saadaan valmistettua liittämällä Fmoc-Gly-H aminomodifioituun ChemMatrixin kantajaan oksaatsolidiiniligaatiolla.<sup>33</sup>

*N*-metoksioksaatsolidiiniligaatiota on tutkittu aiemmin peptidien ja nukleinihappojen välillä<sup>33,37</sup> sekä erilaisten oligonukleotidien välillä<sup>34</sup>. Ensimmäisissä tutkimuksissa *N*-metoksioksaatsolidiinien muodostumista tutkittiin pienimolekyylisillä malleilla 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin sekä pienten aldehydien kanssa. Reaktiot suoritettiin pH:ssa 4,5 ja 6 käyttäen 5 mmol L<sup>-1</sup> konsentraatioita sekä aldehydeille että uridiinille. Reaktion havaittiin käyttäytyvän kuten neoglykosylaatio ja reaktio nopeutui mitä happamampaa pH:ta käytettiin. Sen sijaan tasapainovakio kasvoi huomattavasti ( $K = 0,4 - 9,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Jokaisessa reaktiossa muodostui dynaaminen tasapainotila ligaatiotuotteen R- ja S-isomeerien välille. Tutkimuksissa havaittiin myös, että reaktionopeutta ja tasapainovakiota pystyttiin säätämään käyttämällä erilaisia aldehydejä. Nopeimmin reaktio tapahtui alifaattisten esteettömien aldehydien kanssa, joilla reaktion puoliintumisaika oli noin 10 minuuttia pH:n ollessa neljä. Suurin tasapainovakio oli puolestaan *N*-Bz-glysiinialdehydillä ( $9038 \text{ M}^{-1}$ ). Optimoiduissa olosuhteissa liuottimen vaihdon ja LiCl:n lisäyksen jälkeen *N*-Bz-glysiinialdehydin reaktiossa tuotetta muodostui yli 98 % saannolla 15 minuutissa.<sup>33</sup> Ligaatiotuotteiden havaittiin hajoavan vain marginaalisen vähän pH 7:ssä, minkä vuoksi ligaatiota voidaan pitää käytännössä stabiilina. Erilaisilla aldehydeillä havaittiin olevan myös vaikutusta hajoamisnopeuteen, minkä ansiosta konjugaattien pysyvyyttä voidaan säätää kuhunkin tarkoitukseen sopivaksi.<sup>33</sup> Hyödyntäen *N*-Bz-glysiinialdehydille optimoituja reaktio-olosuhteita, tutkittiin *N*-metoksimodifioitujen oligonukleotidien sekä peptidialdehydien välistä ligaatiota. Tuotteena saatiin haluttuja ON-peptidikonjugaatteja 12–41 % saannolla.

Myöhemmin *N*-metoksioksaatsolidiiniligaation tutkimuksia laajennettiin monimuotoisempaan joukkoon erilaisia konjugaatteja.<sup>37</sup> Tutkimuksissa peptidialdehydeihin sekä yhteen aldehydimodifioituun PNA:han liitettiin β-Ala-H-tähde. Nämä kojugoitiin *N*-metoksioksaatsolidiinilla erilaisiin terapeuttisesti relevantteihin oligonukleotidifosforotioaatteihin sekä yhteen DNA-aptameeriin.<sup>37</sup> Ligaatiotuotteiden hajoamista tutkittiin lievästi happamissa olosuhteissa, ja reaktion puoliintumisaikojen



havaittiin olevan samaa luokkaa kuin sellaisilla happolabiileilla linkkereillä, jotka ovat tällä hetkellä käytössä vasta-aine-lääkekonjugaateissa.<sup>37</sup> Tämä puoltaa *N*-metoksioksatsolidiinin käyttömahdollisuuksia lääkemolekyyliden linkkereissä. Tutkimuksissa havaittiin myös  $\beta$ -Ala-H-tähteen nopeuttavan ligoatiotuotteen hajoamista verrattuna aiemmin tutkittuun Gly-H-tähteeseen.<sup>33,37</sup> Pienillä modifikaatioilla pystytään siis vaikuttamaan huomattavasti ligoation hydrolyysinopeuksiin, ja voidaan olettaa, että muillakin samankaltaisilla modifikaatioilla pystyttäisiin säätämään hajoamisnopeuksia haluttuun suuntaan.<sup>37</sup>

*N*-metoksioksatsolidiinien muodostumista on tutkittu myös DNA-templatoituissa reaktioissa.<sup>34</sup> DNA-templaatti kiihdytti *N*-metoksioksatsolidiinien muodostumista huomattavasti sekä kasvatti tasapainovakiota verrattuna ligoatioreaktioon ilman DNA-templaattia (taulukko 1). Reaktionopeuden kiihtymistä havaittiin jopa lyhyillä neljän nukleotidin mittaisilla templaateilla. Ligoatio osoittautui myös tässä tapauksessa erittäin pH herkäksi ja muodostuneet tuotteet olivat pysyviä pH:n ollessa neutraali.<sup>34</sup> Sekä templaatoitu että templaatoimaton reaktio suoritettiin NaCl (0,1 M) sisältävässä puskuroidussa (pH 5) reaktiooliuksessa. Kummassakin reaktiossa toisena reagenssina käytettiin aldehydimodifioitua oligonukleotidia (5  $\mu$ M). Ei-templatoitu reaktiossa käytettiin reagenssina *N*-metoksimodifioitua uridiinia (0,5 mM) ja templaatoitu reaktiossa *N*-metoksimodifioitua oligonukleotidia (5  $\mu$ M), joka oli neljän nukleotidin osalta komplementaarinen templaatin kanssa.

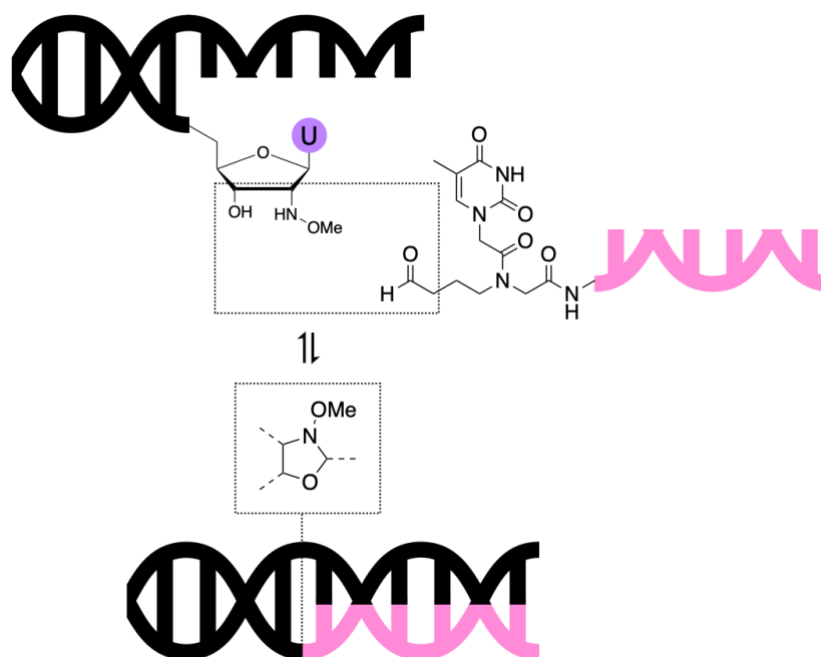
Taulukko 1 Erot templaatoitun ja templaatoimattoman reaktion välillä

	templaatin kanssa	ilman templaattia
<b>puoliintumisaika (h)</b>	16,2 $\pm$ 1,1	91 $\pm$ 16
<b>tasapainosaanto (%)</b>	48 $\pm$ 1,1	55 $\pm$ 3
<b>tasapainovakio (<math>M^{-1}</math>)</b>	3,6 $\pm$ 0,7 $\times 10^5$	2,5 $\pm$ 0,3 $\times 10^3$

## 1.6. Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli tutkia DNA-templatoitua pH-riippuvaista *N*-metoksioksatsolidiiniligoatiota DNA-PNA-hybridirakenteessa. PNA-DNA-kaksoiskierrteen pysyvyys on suurempi kuin luonnollisen DNA-DNA-kaksoiskierrteen.<sup>13</sup> Tämän odotetaan tehostavan DNA-templatoitua ligoatiota ja mahdollistavan melko lyhyidenkin PNA-juosteiden käytön tehokkaan ligoation saavuttamiseksi. Mikäli

hypoteesi pitää paikkaansa, kyseistä ligaatiota on tarkoitus laajentaa useamman komponentin väliseen hybridisaation kontrolloimaan polymerisaatioon. Hypoteesin todentamiseksi tutkielmassa valmistettiin aldehydimodifioitu PNA (**PNA-CHO**) ja tälle komplementaarinen hiusneulamainen 2'-(*N*-metoksiamino)-2'-deoksiuridiini-modifioitu DNA-juoste (**Hp<sup>NOMe</sup>**). Lisäksi työssä tutkittiin kyseisen PNA- ja DNA-juosteen välistä DNA-templatoitua *N*-metoksioksatsolidiiniligaatiota (Kaavio 2).



Kaavio 2 *N*-metoksioksatsolidiinin muodostuminen

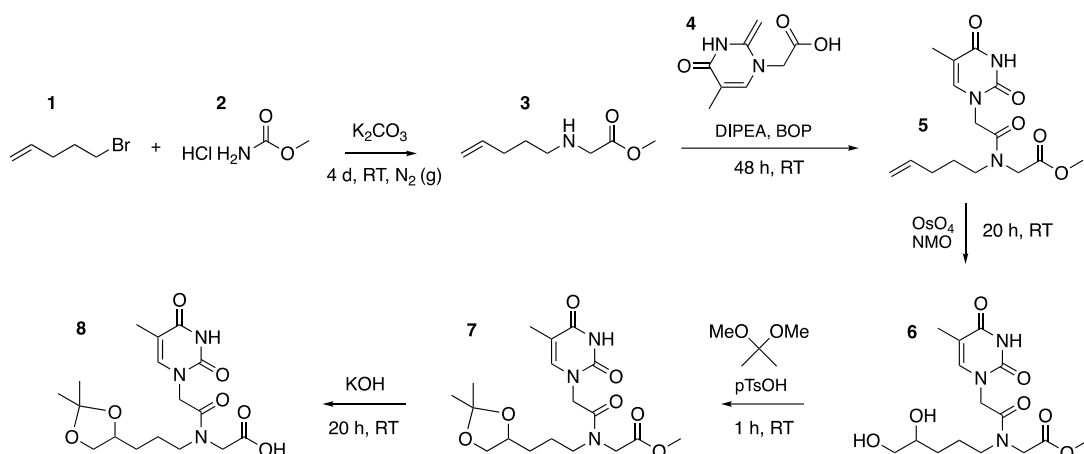
## 2. Tulokset ja niiden tarkastelu

Tässä osiossa on esitelty työn tulokset. Synteesejä tarkastellaan tarkemmin osiossa Kokeelliset menetelmät.

### 2.1. PNA-aldehydiprekursori

Synteesit (Kaavio 3) aloitettiin valmistamalla PNA-ketjuun liitettävä aldehydiprekursori **8**, joka on muutettavissa vapaaksi aldehydiksi PNA-synteesin jälkeen. Aldehydiprekursorin synteesi aloitettiin glysiinin metyyliesterin HCl-suolan (**2**) alkylaatiolla 5-bromopenteenin (**1**) kanssa. Reaktiossa käytettiin emäksenä K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:ia. Synteesiä jatkettiin ilman kromatografista puhdistusta. *N*-alkyloituneeseen glysiiniin **3**

tehtiin amidikytkeä tyminietikkahapon (**4**) kanssa. Kytkeäareagenssina käytettiin BOP:ia ja emäksenä toimi DIPEA. Haluttu tuote **5** saatiin 43 %:n saannolla (kokonaissaanto kahden reaktiovaiheen jälkeen). Synteesin kolmannessa vaiheessa rakenneyksikön **5** kaksoissidos hapetettiin dioliksi **6** käyttäen osmiumtetroksidia (65 %). Tämän jälkeen dioli suojattiin isopropylideenisuojauksella **7** (55 %) ja metyyliesteri hydrolysoitiin kaliumhydroksidin vesiliuoksella halutuksi lopputuotteeksi **8** (67 %).



Kaavio 3 Aldehydiprekursorin synteesikaavio

## 2.2. Aldehydimodifioitu PNA

### 2.2.1. PNA-synteesi

Peptidinukleiinihappojen peptidirungon vuoksi PNA:ita voidaan syntetisoida samalla tavalla kuin peptidejä. Yleinen ja käyttökelpoinen tapa syntetisoida näitä on automatisoidusti kiinteän kantajan menetelmällä käyttäen Fmoc-suojausta. Syntetisoinnin jälkeen PNA:t irrotetaan kantajalta käyttäen yleensä TFA:ta, jonka jälkeen ne puhdistetaan HPLC:n avulla.<sup>38</sup>

Tässä tutkimuksessa peptidinukleiinihapot syntetisoitiin automatisoidusti käyttäen CEM Liberty Blue peptidisyntetisaattoria. Alun perin tarkoituksena oli syntetisoida 10-meerinen PNA-sekvenssi, mutta syntetisaattorin ongelmien ja rajoitetun aikataulun takia päädyttiin valmistamaan tetrameerinen sekvenssi, jota käytettiin tutkimuksissa. Synteesissä käytettiin 10 mikromoolin skaalaa ja rakenneyksikköinä kaupallisia Fmoc-suojattuja PNA-monomeerejä. Kantajana synteesissä käytettiin kiinteää ChemMatrix-kantajaa, jossa oli Rink-linkkeri, aktivaattorina PyBOP:ia ja emäksenä DIPEAa.

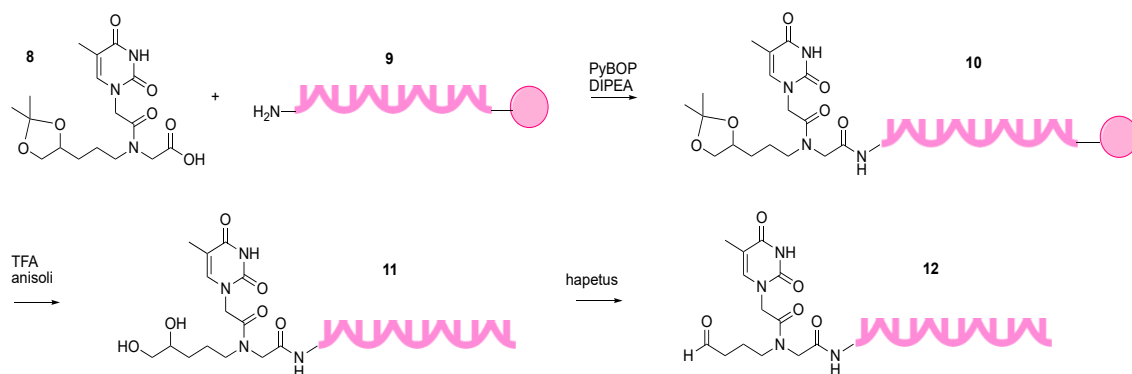
Synteesin jälkeen PNA-sekvenssi **9** (H-CCAT-C) jätettiin kiinni kantajaan seuraavaa manuaalikytkentää varten.

### 2.2.2. Aldehydiprekursorin manuaalikytkentä kantajalla

Aldehydiprekursori **8** liitettiin PNA-sekvenssin **9** aminoterminukseen manuaalikytkennällä kiinteällä kantajalla (Kaavio 4). Kantajaan liitetyn PNA:n (4  $\mu\text{mol}$ ) annettiin reagoida huoneenlämmössä aldehydiprekursorin (20  $\mu\text{mol}$ ) kanssa tunnin ajan. Liuottimena reaktiossa käytettiin DMF:ia, aktivaattorina PyBOP:ia ja emäksenä DIPEA:a. Kytkennän jälkeen sekvenssi **10** irrotettiin kantajalta TFA/anisoli/vesiseoksella (85/10/5). Tämän happokäsittelyn tarkoituksena oli myös irrottaa aldehydiprekursorin diolin asetaalisuojaus välituotteen **11** saamiseksi. Happokäsittelyn jälkeen kantaja suodatettiin ja tuote saostettiin eetteristä. Kiinteä tuote liotettiin 0,1 % TFA vesi-asetonitriililiuokseen (50:50) ja puhdistettiin HPLC:n avulla. Puhdistetun tuotteen **11** ainemäärä (0,13  $\mu\text{mol}$ ) määritettiin UV-spektrometrillä, jonka perusteella tuotteen saanto oli 3,2 %. Tuote todettiin oikeaksi massaspektrometrin avulla. Reaktiot esitetty Kaavio 4.

### 2.2.1. Hapetus aldehydiksi

PNA-sekvenssin pään dioli hapetettiin aldehydiksi natriumperjodaattiliuoksella (Kaavio 4). Reaktio suoritettiin vesiliuoksessa käyttäen fosfaattipuskuria (pH 7). Kun reaktio oli edennyt loppuun, reaktio keskeytettiin natriumsulfiitilla. Tuoteseos puhdistettiin HPLC:llä. Noin puolesta tuotteen määrästä mitattiin ainemäärä UV-spektrometrillä, ja tuotetta **12** saatiin arvioidusti 65 % saannolla.

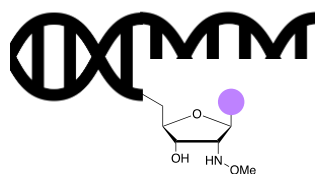


Kaavio 4 Aldehydiprekursorin manuaalikytkentä PNA-sekvenssiin kiinteällä kantajalla ja diolin hapetus aldehydiksi

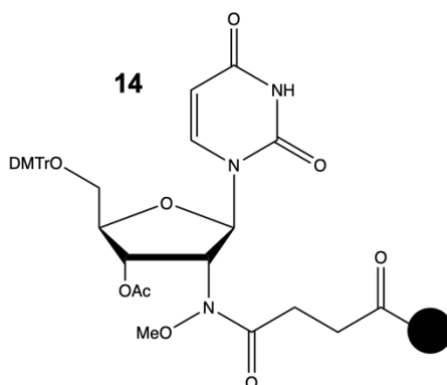
### 2.3. Hiusneulamainen U<sup>NOMe</sup>-modifioitu DNA

Ligaatioreaktiota varten valmistettiin hiusneulamainen DNA-sekvenssi, jonka 3'-päässä oli 2'-(*N*-metoksiamino)-2'-deoksi uridiini (**Hp<sup>NOMe</sup>**, kuva 5). Tähän käytettiin laboratoriossa aikaisemmin valmistettua 2'-(*N*-metoksiamino)-2'-deoksi uridiini-modifioitua kantajaa **14** (kuva 6). DNA syntetisoitiin 1 mikromoolin skaalalla käyttäen automatisoitua DNA/RNA-syntetisaattoria. Rakenneyksikköinä käytettiin kaupallisia fosforamidiittirakenneyksiköitä. Oligonukleotidi irrotettiin kantajalta ammoniakikäsittelyllä, minkä jälkeen se puhdistettiin HPLC:n avulla. Puhdistettu tuote karakterisoitiin massaspektrometrillä.

Syntetisoidun DNA:n sekvenssi: 5'-TTA AGC ATG GAA GCG CTA GCG CU-3'



Kuva 5 Hiusneulamainen DNA, jonka päässä on 2'-(*N*-metoksiamino)-2'-deoksiuridiini-modifikaatio.



Kuva 6 2'-(*N*-metoksiamino)-2'-deoksiuridiinin sisältävä kantaja

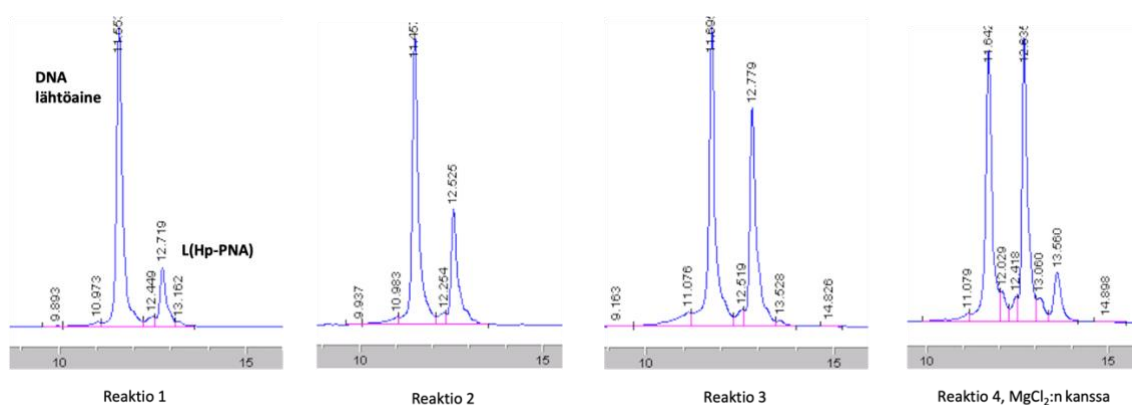
### 2.4. DNA-templatoitu *N*-metoksioksatsolidiiniligaatio

*N*-metoksioksatsolidiiniligaatiossa hiusneulamainen DNA reagoi modifioidusta U<sup>NOMe</sup>-päästään PNA:n aldehydipään kanssa muodostaen *N*-metoksioksatsolidiinin. Toisilleen komplementaariset DNA- ja PNA-juosteet saavat aikaan paikalliskonsentraation kasvun, mikä kiihdyttää reaktion nopeutta ja kasvattaa myöskin reaktion tasapainovakiota. DNA-

templaattiefektin kasvaessa reaktio voi myös muuttua bimolekulaarisesta reaktiosta molekyyllinsisäiseksi. Tällöin reaktio ei ole enää riippuvainen lähtöaineiden konsentraatiosta vaan hybridisaation voimakkuudesta.

Ligaatiotutkimukset aloitettiin neljällä testireaktiolla, joissa kussakin hiusneula-DNA:n  $\text{Hp}^{\text{NOMe}}$  konsentraatio oli  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Kolmessa ensimmäisessä testissä tutkittiin PNA:n PNA-CHO määrän vaikutusta ligaatiotuotteen **L(Hp-PNA)** muodostumiseen. Ko. testeissä käytettiin  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  (0,5 ekv., **Reaktio 1**),  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  (1.0 ekv., **Reaktio 2**) ja  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  (2.0 ekv., **Reaktio 3**) PNA-CHO:ta. Kukaan näistä reaktioista suoritettiin pH 5.0 puskuriliuoksessa. Neljännessä testireaktiossa (**Reaktio 4**) tutkittiin  $\text{Mg}^{2+}$ -ionin vaikutusta ligaatioon. Reaktiossa sekä  $\text{Hp}^{\text{NOMe}}$ :n ja PNA-CHO:n pitoisuus oli  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  (vrt. *Testi 2*) ja se suoritettiin pH 5.0 puskuriliuoksessa, joka sisälsi 100 mM magnesiumkloridia.

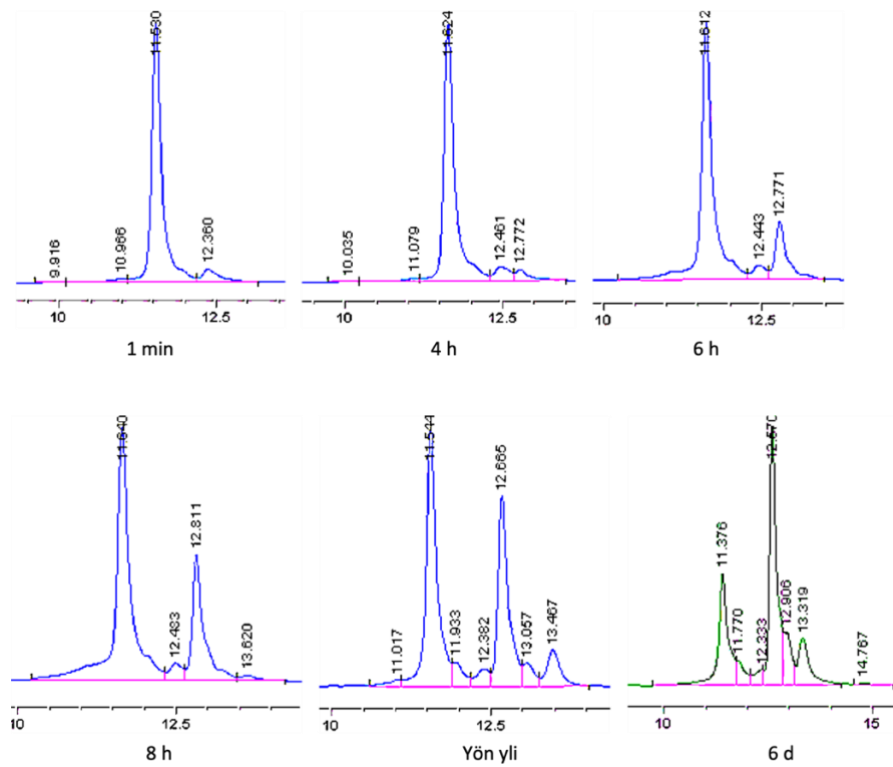
Kustakin reaktiosta otettiin näytteet vuorokauden jälkeen. Reaktiot sammutettiin neutraloimalla reaktioliuos, jonka jälkeen näytteet ajettiin HPLC:llä. Referensseiksi HPLC:llä ajettiin myös näytteet  $\text{Hp}^{\text{NOMe}}$ :sta sekä PNA-CHO:sta yksinään. HPLC-grammeista havaittiin, että kussakin reaktiossa oli muodostunut tuotetta (kuva 7). Tuote karakterisoitiin massaspektrometrisesti, jonka perusteella se oli odotettu ligaatiotuote **L(Hp-PNA)**. Lisäksi havaittiin, että  $\text{Mg}^{2+}$  tehosti ligaatiota. **Reaktio 4** tuotti ligaatiotuotetta enemmän kuin **Reaktio 3**, jossa käytettiin kaksinkertaista PNA-CHO:n konsentraatiota. **Reaktiossa 4** ligaatiotuotetta muodostui 39 % ja **reaktiossa 3** 36 %. Vastaavasti **reaktiossa 2** tuotetta muodostui 28 %.



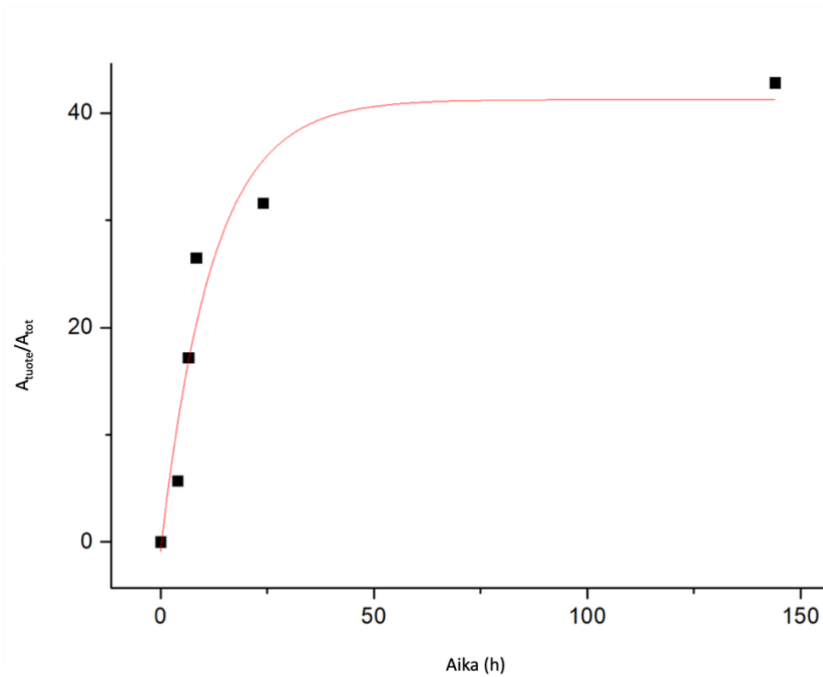
Kuva 7 Ligaatiotuotteen muodostuminen ja  $\text{MgCl}_2$ :n vaikutus reaktionopeuteen

Näiden testireaktioiden perusteella reaktionopeutta päätettiin tutkia reaktiolla, jossa reaktioliuoksessa oli mukana magnesiumkloridia (**Reaktio 5**). Reaktiota seurattiin kahden tunnin välein HPLC:llä, ja tuotetta muodostui seuraavien grammien mukaisesti (kuva 8).

Tuotteen muodostumisesta piirrettiin kuvaaja ajan funktiona käyttäen HPLC-mittauksista saatuja pinta-aloja. Kuvaajasta saatiin reaktion puoliintumisajaksi  $8,3 \pm 3,1$  tuntia ja tuotteen saannoksi tasapainossa  $41,2 \pm 5,0$  %. Reaktio-  
tasapainovakioksi laskettiin  $2,65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .



Kuva 8 Ligaation eteneminen



Kuvaaja 1 Tuotteen muodostuminen ajan funktiona

### 3. Johtopäätökset ja yhteenveto

Työssä onnistuttiin valmistamaan PNA-aldehydiprekursori noin 10 % kokonaissaannolla. Lisäksi aldehydiprekursori onnistuttiin liittämään automatisoidusti syntetisoituun 4-meeriseen PNA-sekvenssiin kiinteällä kantajalla. PNA irrotettiin kantajalta diolina ja se hapetettiin aldehydiksi 65 % saannolla. **PNA-CHO** onnistuttiin liittämään **Hp<sup>NOMe</sup>**:een (5 µM) *N*-metoksioksatsolidiiniligaatiolla hieman happamissa olosuhteissa (pH 5). HPLC-ajoista saatujen pinta-alojen perusteella tuotetta **L(Hp-PNA)** onnistuttiin valmistamaan enimmillään 43 % saannolla viikon reagoinnin jälkeen magnesiumkloridin läsnäollessa reaktioliuoksessa. Saaduista tuloksista piirretyn käyrän perusteella reaktion puoliintumisaika olisi  $8,3 \pm 3,1$  tuntia ja tuotteen saanto tasapainotilassa  $41,2 \pm 5,0$  %. HPLC-mittausten perusteella reaktion tasapainovakioksi laskettiin  $2,65 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Luotettavampien tulosten saamiseksi reaktiota olisi kuitenkin täytynyt seurata tiheämmin yhden ja kuuden päivän välillä sekä tarvittaessa vielä tätäkin pidempään. Aikarajan puitteissa tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista. Verrattuna *N*-metoksioksatsolidiiniligaation aiempiin tutkimuksiin oligonukleotidien välillä, tasapainovakion arvo ja tasapainosaanto on kuitenkin samaa luokkaa. Puoliintumisaikaa verrattaessa reaktio PNA:n ja DNA:n välillä olisi hieman nopeampi ( $8,3 \pm 3,1$  h) kuin oligonukleotidien välillä ( $16,2 \pm 1,1$  h), mutta epävarmojen tulosten perusteella tästä ei juurikaan voida vetää johtopäätöksiä.

Yhden päivän reagoinnin jälkeen ilman magnesiumkloridia tuotetta saatiin 28 % ja magnesiumkloridin kanssa 39 %. Ligaatiotutkimusten perusteella MgCl siis tehostaisi *N*-metoksioksatsolidiiniligaatiota PNA:n ja DNA:n välillä ainakin lyhyellä aikavälillä. Aiempien tutkimusten perusteella suolan lisäämisellä reaktioliuokseen ei kuitenkaan pitäisi olla PNA:n ja DNA:n hybridisaatiota tehostavia vaikutuksia, vaan päinvastoin hybridisaatiota destabiloiva vaikutus. Sen sijaan oligonukleotidien hybridisaatioon suolalla on stabiloiva vaikutus. Tässä tapauksessa reaktiota ohjaava templaatti on viiden nukleotidin matkalta itsensä kanssa komplimentaarinen ja siihen liittyvä PNA saman mittainen. Näin ollen voitaisiin päätellä, että MgCl liuoksessa mahdollisesti tehostaisi hiusneulamaisen templaatin laskostumista kaksoiskierteelle ja näin ollen tehostaisi myös PNA-aldehydin reaktiota DNA:n kanssa. Luotettavampien tulosten saamiseksi olisi kuitenkin tutkittava tarkemmin myös ligaatioreaktiota PNA:n ja DNA:n välillä ilman MgCl:n läsnäoloa reaktioliuoksessa. Kaiken kaikkiaan ligaatioreaktio onnistui kohtalaisella saannolla käytettäessä viiden nukleotidin mittaista PNA-sekvenssiä, ja näin



ollen sitä voitaisiin tutkia useamman komponentin välisessä hybridisaation kontrolloimassa polymerisaatiossa.

## 4. Kokeelliset menetelmät

### 4.1. Yleiset menetelmät

Synteseissä käytettiin kaupallisia reagensseja ja liuottimia, ja liuottimet kuivattiin tarvittaessa molekyyliseuloilla. NMR-spektrien mittaamiseen käytettiin Bruker 500 MHz Avance III-NMR-spektrometriä, ja massaspektrit mitattiin Bruker ESI-microTOF-Q-massaspektrometrillä. Reaktioiden etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti sekä HPLC-MS:llä (Agilent 6120). UV-spektrofotometrisissä mittauksissa käytettiin Jenway Genova Nano -laitetta.

### 4.2. PNA-aldehydiprekursori

#### 4.2.1. Alkylaatio ja asylaatio

Glysiinin metyyliesterin HCl-suola **2** (3,0 g, 0,024 mol) ja kaliumkarbonaatti (6,6 g, 0,048 mol) liuotettiin kuivaan asetonitriiliin, jonka jälkeen seosta sekoitettiin tunti typpikaasun alla. Joukkoon lisättiin tipoitain sekoituksessa typpikaasussa 5-bromopenteeniä **1** (2,8 ml, 0,024 mol). Reaktiota seurattiin ohutlevykromatografisesti eluentina etyyliasetaatti/heksaani (4:6, v/v). Tuote **3** ei ollut UV-aktiivinen, joten täplät saatiin näkyviin kastamalla TLC-levy ninhydriiniliuokseen ja lämmittämällä lämpöpuhaltimella. Neljän päivän jälkeen reaktio oli edennyt riittävästi, jolloin reaktioseos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin pois pyöröhaihduttimella. Haihdutusjäännös liuotettiin DMF:ään (120 ml), ja tästä liuoksesta otettiin puolet (60 ml, 12 mmol) seuraavaan reaktioon. Liuokseen lisättiin tässä järjestyksessä tyminietikkahappoa **4** (2,4 g, 13,2 mmol), DIPEA:a (4,2 ml, 24 mmol) ja BOP:ia (5,8 g, 13,2 mmol). Reaktioliuosta sekoitettiin noin 48 tuntia. Reaktion etenemistä seurattiin LC-MS:n avulla. Reaktioseos suodatettiin ja sakkaa huuhdeltiin DMF:llä, jonka jälkeen suodos haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (150 ml), ja tätä pestiin 10 % monokaliumfosfaatilla (35 ml), kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:lla (35 ml) ja vedellä (2 x 35 ml). Tuotetta takaisinuuutettiin vesifaaseista etyyliasetaatilla, kunnes sitä ei enää juurikaan havaittu TLC:llä. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin natriumsulfaatilla, jonka jälkeen liuos suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin

silikageelikromatografisesti eluenttina metanoli/dikloorimetaani (5:95, v/v). Tuote karakterisoitiin NMR:n ja MS:n avulla. Tuotetta **5** saatiin 1,66 g (saanto 43 %). ESI<sup>+</sup>-MS: m/z 324,1507 [M+H]<sup>+</sup>, 346,1368 [M+Na]<sup>+</sup>, 362,1087 [M+K]<sup>+</sup>. Laskettu: 324,1561 [M+H]<sup>+</sup>, 346,1379 [M+Na]<sup>+</sup>, 362,1118 [M+K]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.1 (t, J=20 Hz, 1H), 5.8 (m, 1H), 5.0 (m, 2H), 4.5 (s, 2H), 3.7 (m, 2H), 3.6 (s, 3H), 3.1 (m, 2H), 2.1 (m, 2H), 1.9 (m, 3H), 1.8 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 169, 166, 163, 151, 141, 136, 116, 111, 55, 52, 48, 43, 37, 31, 12

#### 4.2.2. Hapetus

Yhdiste **5** (1,66 g, 5,14 mmol) liuotettiin vesi/asetonitriili (1:8, v/v) -liuokseen (95 ml). Joukkoon lisättiin *N*-metyylimorfoliini-*N*-oksidia (1,2 g, 10,28 mmol) ja *tert*-butanoliin liuotettua osmiumtetroksidia (2,5 m-%, 2,62 ml, 0,1964 mmol) Reaktioliuosta sekoitettiin yön yli. Reaktio pysäytettiin lisäämällä joukkoon Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-liuosta (0,2 M, 41 ml), jonka jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimella. Tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti (vesi/asetonitriili, 10:90, v/v). Tuotetta **6** saatiin 1,2 g (saanto 65 %), ja se karakterisoitiin MS ja NMR avulla. ESI<sup>+</sup>-MS: m/z 358,1657 [M+H]<sup>+</sup>, 380,1477 [M+Na]<sup>+</sup>, 396,1226 [M+K]<sup>+</sup>. Laskettu: 358,1616 [M+H]<sup>+</sup>, 380,1434 [M+Na]<sup>+</sup>, 396,1173 [M+K]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.3 (d, J=21 Hz, 1H), 4.7 (s, 2H), 4.1 (s, 2H), 3.7 (s, 3H), 3.5 (m, 5H), 1.8 (s, 3H), 1.5 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 171, 169, 167, 152, 143, 110, 65, 64, 53, 49, 48, 43, 29, 23, 11

#### 4.2.3. Diolin suojaus

Yhdiste **6** (1,2 g, 3,36 mmol) liuotettiin kuivaan asetoniin (12 ml). Liuokseen lisättiin p-tolueenisulfonihappoa (84 mg, 0,44 mmol) sekä 2,2-dimetoksipropania (2,90 ml, 23,3 mmol). Reaktion etenemistä seurattiin ohutlevykerroskromatografisesti, ja tunnin kuluttua lähtöaine oli reagoinut. Reaktio pysäytettiin lisäämällä reaktioseokseen natriummetoksidin metanoliliuosta niin, että liuoksen pH oli neutraali. Neutraloitu reaktioseos haihdutettiin kuiviin ja puhdistettiin silikageelikromatografisesti (metanoli/dikloorimetaani, 5:95, v/v). Tuotetta **7** saatiin 0,73 g (saanto 55 %), ja se karakterisoitiin MS ja NMR avulla. ESI<sup>+</sup>-MS: m/z 398,1927 [M+H]<sup>+</sup>, 420,1795 [M+Na]<sup>+</sup>, 436,1525 [M+K]<sup>+</sup>. Laskettu: 398,1929 [M+H]<sup>+</sup>, 420,1747 [M+Na]<sup>+</sup>, 436,1486 [M+K]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.6 (d, J=37 Hz, 1H), 7.0 (d, J=15 Hz, 1H), 4.6 (s, 2H), 4.4 (s, 2H), 4.0 (m, 3H), 3.7 (d, J=37 Hz, 3H), 3.4 (m, 2H), 1.9 (s, 3H), 1.7 (m, 2H), 1.5

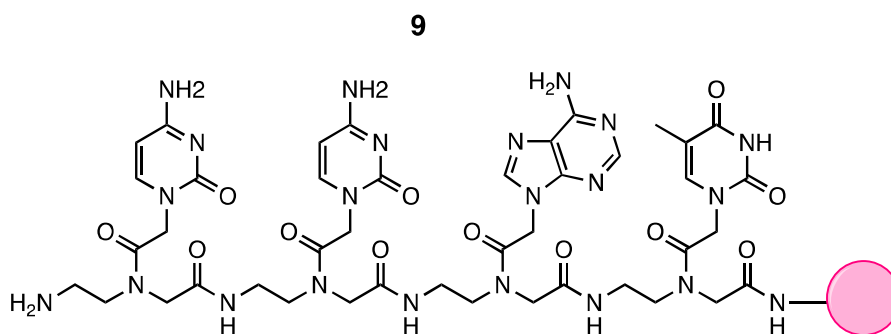
(*m*, 2*H*), 1.3 (*d*, *J*=5 Hz, 3*H*). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169, 167, 163, 151, 141, 110, 109, 75, 69, 53, 49, 48, 47, 30, 27, 26, 13

#### 4.2.4. Hydrolyysi

Yhdiste **7** (0,73 g, 1,84 mmol) liuotettiin dioksaaniin (49 ml). Kaliumhydroksidi (0,29 g) liuotettiin veteen (2,8 ml), ja tämä lisättiin dioksaanin joukkoon. Reaktioseoksen annettiin reagoida yön yli, jonka jälkeen reaktioseos neutraloitiin pyridiinihydrokloridilla (0,7044 g). Neutraloinnin jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimella. Tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti (vesi/asetonitriili/pyridiini, 10:90:0,2, *v/v/v*). Tuotetta **8** saatiin 0,79 g (saanto 111 %), joka sisälsi epäpuhtautena HMPA:ta 0,31 g. Tuote karakterisoitiin MS:n ja NMR:n avulla. Pieni osa tuotteesta puhdistettiin HPLC:llä puhtaan NMR-spektrin saamiseksi. ESI<sup>+</sup>-MS: *m/z* 406,1673 [M+Na]<sup>+</sup>, 422,1398 [M+K]<sup>+</sup>. Laskettu: 406,1591 [M+Na]<sup>+</sup>, 422,1330 [M+K]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.3 (*d*, *J*=14 Hz, 1*H*), 4.5 (*s*, 2*H*), 4.1 (*m*, 2*H*), 3.6 (*m*, 1*H*), 3.3 (*m*, 2*H*), 1.8 (*s*, 3*H*), 1.6 (*m*, 2*H*), 1.5 (*m*, 2*H*), 1.2 (*t*, *J*=7 Hz, 6*H*). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 169, 168, 167, 152, 143, 110, 109, 71, 68, 65, 49, 48, 30, 25, 23, 11

### 4.3. Aldehydimodifioitu PNA

#### 4.3.1. PNA-synteesi



Kuva 9 PNA-sekvenssi kiinni kantajalla

Syntetisaattorilla valmistettiin neljämerinen PNA-sekvenssi (NH<sub>2</sub>-CCAT-COOH). Rakenneyksikköinä käytettiin Fmoc-suojattuja kaupallisia monomeerejä ja kantajana H rink amidia. Aktivaattorina synteesissä käytettiin PyBOP:ia ja emäksenä DIPEAa. Synteesiä varten valmistettiin kunkin emäksen rakennepalikasta liuokset (0,08 M) DMF:ään. DMF:ään valmistettiin liuokset myös PyBOP:ista (0,05 M) ja DIPEA:sta (0,2 M). Lisäksi valmistettiin CAP-liuos, joka sisälsi 2 % etikkahappoanhydridia ja se

liuotettiin DMF:n ja pyridiinin seokseen (1:1, v/v). Aminoterminuksen suojauksen poistoa varten valmistettiin liuos, joka sisälsi 20 % piperidiiniä DMF:ssä. Kiinteää kantajaa otettiin synteesiin 10  $\mu\text{mol}$  (0,02 g). PNA-ketjun automatisoidun synteesin jälkeen pieni osa valmistetusta PNA:sta irrotettiin kantajalta, ja synteesin onnistuminen varmistettiin ajamalla tästä HPLC käyttäen Aeris PEPTIDE XB-C18 (250 x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) kolonnia. Eluenteina käytettiin vettä ja asetonitriiliä, jotka sisälsivät 0,1 % TFA:ta. Gradientissa asetonitriilin määrää kasvatettiin nolasta prosentista 25 prosenttiin 25 minuutissa. Virtausnopeutena käytettiin 2,5 ml  $\text{min}^{-1}$  ja detektioaallonpituutena 260 nm.

#### 4.3.2. Aldehydiprekursorin manuaalikytkentä kantajalla

Kantajaan sidottu PNA **9** (4  $\mu\text{mol}$ ) turvotettiin käyttäen DMF:ää. PNA-rakenneyksikkö **8** (11,24 mg epäpuhdasta seosta, josta rakenneyksikön osuus oli 6,8 mg, 18  $\mu\text{mol}$ ) liuotettiin DMF:ään (200  $\mu\text{l}$ ). Lisäksi valmistettiin PyBOP:ista (0,01 g, 20  $\mu\text{mol}$ ) 0,1 M liuos DMF:ään (200  $\mu\text{l}$ ). PyBOP-liuoksen joukkoon lisättiin DIPEA (7  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{mol}$ ), jonka jälkeen seos pipetoitiin rakenneyksikön sisältävään liuokseen. Tämän jälkeen rakenneyksikön, PyBOP:in ja DIPEA:n seos lisättiin kantajan joukkoon Eppendorf-putkeen, ja näiden annettiin reagoida tunnin ajan. Tämän jälkeen reaktioseos suodatettiin imussa lasisintterin läpi. Sakkaa huuhdeltiin DMF:llä, metanolilla sekä dikloorimetaanilla. Dikloorimetaanihuuhdelun jälkeen sakka siirrettiin Eppendorf-putkessa kuivumaan eksikaattoriin yön yli. PNA-sekvenssi irrotettiin kantajalta TFA/anisoli/vesi -seoksella (85:10:5, v/v/v). Seos lisättiin kuivuneen kantajan joukkoon, ja tämän annettiin reagoida kahden tunnin ajan. Reaktioliuos suodatettiin imusuodatuksella lasisintterin läpi Falcon-putkeen. Suodos pipetoitiin tipoitain jääkylmän eetterin joukkoon, jolloin tuote sakkautui. Seosta fuugattiin 15 minuuttia, jonka jälkeen eetteri kaadettiin pois sakan päältä. Sakka kuivattiin varovasti typpikaasulla, jonka jälkeen se liuotettiin 0,1 % TFA:ta sisältävän vesi-asetonitriili (50:50, v/v) -liuoksen (500  $\mu\text{l}$ ) joukkoon. Tuote puhdistettiin HPLC:llä. Eluenteina käytettiin vettä ja asetonitriiliä, jotka sisälsivät 0,1 % TFA:ta. Gradientissa asetonitriilin määrää kasvatettiin nolasta prosentista 25 prosenttiin 25 minuutissa. Puhdistuksessa käytettiin Aeris PEPTIDE XB-C18 (250 x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) kolonnia, virtausnopeutena 2,5 ml  $\text{min}^{-1}$  ja detektioaallonpituutena 260 nm. Tuote karakterisoitiin käyttäen massaspektrometriä (ESI<sup>+</sup>-MS:  $m/z$  1386,6423 [M+H]<sup>+</sup>, laskettu: 1386,3492 [M+H]<sup>+</sup>). Tuotteen absorbanssi mitattiin UV-spektrofotometrillä käyttäen aallonpituutena 260 nm,

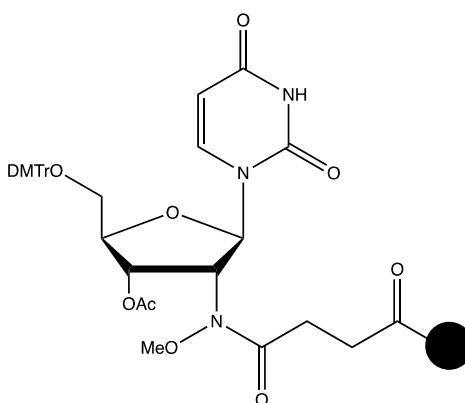
valotien pituutena 0,5 mm ja molaarisena absorptiokertoimena  $46280 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Tämän perusteella tuotteen määräksi laskettiin 0,13  $\mu\text{mol}$  (saanto 3,2 %).

#### 4.3.3. Hapetus aldehydiksi

Yhdiste **11** (0,07  $\mu\text{mol}$ ) liuotettiin veteen (100  $\mu\text{l}$ ). Vesiliuoksen joukkoon lisättiin 20  $\mu\text{l}$  fosfaattipuskuria (1 M, pH 7), jonka jälkeen puskuroituun liuokseen lisättiin 120  $\mu\text{l}$  natriumperjodaattiliuosta (50 mM). Reaktion etenemistä seurattiin HPLC:n avulla. Tunnin kuluttua reaktio oli lopussa, ja se sammutettiin natriumsulfiittiliuoksella (0,89 M, 22,5  $\mu\text{l}$ ). Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä käyttäen 0,1 % TFA-eluentteja sekä Aeris PEPTIDE XB-C18 (250 x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) kolonna. Puhdistuksessa asetonitriilin määrä nostettiin nollasta prosentista sataan minuutissa, ja sitä pidettiin sadassa, kunnes tuote oli eluoitunut. Tuote kylmäkuivattiin varovaisesti vahtien, ettei se pyöri kuivana kylmäkuivurissa. Noin puolikkaasta tuotteen määrästä mitattiin absorbanssi UV-spektrofotometrillä. Tämän osan ainemäärä oli absorbanssista laskettuna 0,03  $\mu\text{mol}$ , joten tuotetta saatiin vähintään 50 %:n saannolla.

#### 4.4. Hiusneulamainen $\text{U}^{\text{NOMe}}$ -modifioitu DNA

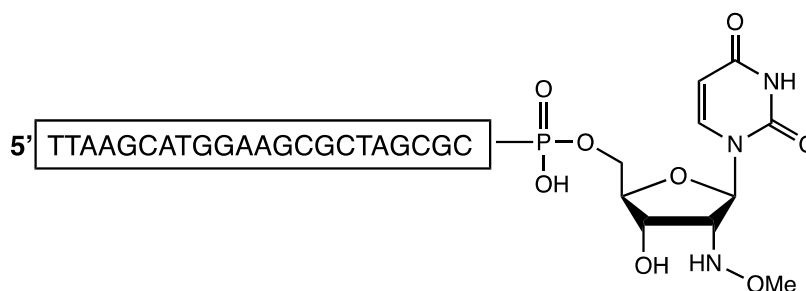
Hiusneulamainen  $\text{U}^{\text{NOMe}}$ -modifioitu DNA ( $\text{Hp}^{\text{NOMe}}$ , kuva 11) syntetisoitiin 1  $\mu\text{moolin}$  skaalalla käyttäen automatisoitua DNA/RNA-syntetisaattoria. Rakenneyksikköinä käytettiin kaupallisia fosforamidiittirakenneyksiköitä ja kantajana LCAA-CPG-kantaja, johon oli liitetty 2'-deoksi-2'-*N*-metoksiuridiini (kuva 10).



Kuva 10 2'-deoksi-2'-*N*-metoksimodifioitu uridiini liitettynä kantajaan

Synteesin jälkeen DNA:t irrotettiin kantajistaan liuottamalla ne 25 prosenttiseen ammoniakkin vesiliuokseen (1 ml), ja tämän annettiin reagoida 55°C:ssa yön yli. Reaktion jälkeen ammoniakkiliuos pipetoitiin sakan päältä keittopulloon. Sakkaa huuhdeltiin vielä vedellä, joka lisättiin ammoniakkiliuoksen joukkoon. Ammoniakkiliuos haihdutettiin

kuiviin pyöröhaihduksella. DNA-ketju puhdistettiin HPLC:n avulla käyttäen oligo-RP-kolonnia. Eluenteina käytettiin 50 mM TEA-puskuroitua vettä sekä 50 mM TEA-puskuroitua veden ja asetonitriilin seosta (1:1, v/v). Gradientissa vesi/asetonitriili-seoksen pitoisuutta kasvatettiin 10 %:sta 70 %:iin 20 minuutissa. Virtausnopeutena käytettiin 2,5 ml min<sup>-1</sup> ja detektioaallonpituutena 260 nm. Pääpiikki kerättiin talteen ja se kylmäkuivattiin. Haihdutettu tuote liuotettiin 500 µl:aan vettä. Vesiliuoksesta selvitetiin UV-spektrofotometrin avulla absorbanssi, josta laskettiin saannoksi tuotteelle 0,14 µmol (14 %). Tuote karakterisoitiin massaspektrometrin avulla. (ESI-MS:  $m/z$  1778,8 [M-4H]<sup>4+</sup> (havaittu), 1778,9 [M-4H]<sup>4+</sup> (laskettu)).



Kuva 11 U<sup>NOMe</sup>-modifioitu DNA

#### 4.5. DNA-templatoitu N-metoksioksatsolidiiniligaatio

Reaktion toimivuutta kokeiltiin aluksi neljällä erilaisella testireaktiolla, jotka suoritettiin pH 5 puskuriliuoksessa (reaktiot 1-4, taulukko 2). Kustakin reaktiosta otettiin seuraavana aamuna näytteet (15 µl), jotka sammutettiin neutralisoimalla ne natriumhydroksidiliuoksella (0,4 M, 0,95 µl). Näytteet laimennettiin 100 µl:aan vedellä, ja ne ajettiin HPLC:llä, jonka perusteella saannot laskettiin. Testireaktioiden tulosten perusteella reaktionopeutta tutkittiin reaktiosta 5 (taulukko 2), jonka puskuriliuos sisälsi magnesiumkloridia. Reaktioseos valmistettiin uudelleen isommalla skaalalla. Reaktiosta otettiin näytteitä (15 µl) kahden tunnin välein, sekä seuraavana aamuna. Näytteiden reaktiot sammutettiin lisäämällä kunkin joukkoon 1,35 µl natriumhydroksidiliuosta (0,4 M). Kukin näyte laimennettiin 100 µl:aan vedellä, jonka jälkeen ne ajettiin HPLC:llä. Eluenteina HPLC-ajoissa käytettiin asetonitriiliä sekä 50 mM TEAA-puskuria. Gradientissa asetonitriilin pitoisuus nostettiin viidestä prosentista kahteenkymmeneen 20 minuutissa. Virtausnopeutena käytettiin 1,0 ml min<sup>-1</sup>, detektioaallonpituutena 260 nm ja kolonnina C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm. Oletettu tuotepiikki eristettiin, ja se karakterisoitiin massaspektrometrisesti. ESI-MS:  $m/z$  2112,4 [M-4H]<sup>4+</sup>, 1689,9 [M-5H]<sup>5-</sup> laskettu: 2112,7 [M-4H]<sup>4+</sup>, 1690,0 [M-5H]<sup>5-</sup>.

Taulukko 2 Reaktiot 1–5

	Hp-DNA (nmol)	PNA (ekv.)	Reaktio-tilavuus ( $\mu$ l)	MgCl puskuriliuoksessa	Reaktion saanto (%)
<b>Reaktio 1</b>	0,25	0,5	50	ei	16
<b>Reaktio 2</b>	0,25	1,0	50	ei	28
<b>Reaktio 3</b>	0,25	2,0	50	ei	36
<b>Reaktio 4</b>	0,25	1,0	50	kyllä	39
<b>Reaktio 5</b>	1,50	1,0	300	kyllä	43

HPLC-grammeista saatiin tuotteelle sekä lähtöaineille pinta-alat, joiden perusteella piirrettiin kuvaaja tuotteen muodostumisesta ajan funktiona. Verrattaessa tuotepiikin pinta-alaa muiden piikkien pinta-aloihin tuotetta on muodostunut 43 % kun reaktio on saavuttanut tasapainotilan. Tämän avulla reaktiolle  $5 \text{ DNA} + \text{PNA} \rightleftharpoons \text{tuote}$  laskettiin tasapainovakioksi  $2,65 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

$$\text{Reaktion 5 saanto} = \frac{494,4}{494,4 + 308,8 + 58,8 + 40,3 + 98,0 + 155,6} \cdot 100 = 42,7 \%$$

Tuotetta muodostunut:  $n(\text{tuote}) = 0,43 \cdot 1,5 \text{ nmol} = 0,645 \text{ nmol}$

$$[\text{tuote}] = \frac{0,645 \text{ nmol}}{300 \mu\text{l}} = 2,15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

DNA:ta ja PNA:ta jäljellä:

$$n(\text{DNA}) = n(\text{PNA}) = 1,5 \text{ nmol} - 0,645 \text{ nmol} = 0,855 \text{ nmol}$$

$$[\text{DNA}] = [\text{PNA}] = \frac{0,855 \text{ nmol}}{300 \mu\text{l}} = 2,85 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$K = \frac{[\text{tuote}]}{[\text{DNA}][\text{PNA}]} = \frac{2,15 \cdot 10^{-6} \text{ M}}{2,85 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot 2,85 \cdot 10^{-6} \text{ M}} = 2,65 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$$

## 5. Lähdeluettelo

1. Li X, Liu DR. DNA-templated organic synthesis: Nature's strategy for controlling chemical reactivity applied to synthetic molecules. *Angew Chemie - Int Ed*. 2004;43(37):4848-4870. doi:10.1002/anie.200400656
2. Calderone CT, Puckett JW, Gartner ZJ, et al. Directing Otherwise Incompatible Reactions in a Single Solution by Using DNA-Templated Organic Synthesis. *J Am Chem Soc Submitt*. 2002;41(21):4104-4108. doi:10.1002/1521-3773(20021104)41:21<4104::AID-ANIE4104>3.0.CO;2-O
3. Gorska K, Winssinger N, Winssinger N, Gorska K. Reactions Templated by Nucleic Acids: More Ways to Translate Oligonucleotide-Based Instructions into Emerging Function *Angewandte Reviews*. *Angew Chem Int Ed* 2. 2013;52:6820–6843. doi:10.1002/anie.201208460
4. Naylor R, Gilham PT. Studies on Some Interactions and Reactions of Oligonucleotides in Aqueous Solution. *Biochemistry*. 1966;5(8):2722-2728. doi:10.1021/BI00872A032/ASSET/BI00872A032.FP.PNG\_V03
5. Weimann BJ, Lohrmann R, Orgel LE, Schneider-Bernloehr H, Sulston JE. Template-Directed Synthesis with Adenosine-5'-phosphorimidazolidine. *Science (80- )*. 1968;161(3839):387. doi:10.1126/SCIENCE.161.3839.387
6. Christof Bohler PEN& LEO. Template switching between PNA and RNA oligonucleotides. *Nature*. 1995;376(6541):578–581. doi:DOI: 10.1038/376578a0
7. Gartner ZJ, Liu DR. The generality of DNA-templated synthesis as a basis for evolving non-natural small molecules. *J Am Chem Soc*. 2001;123(28):6961-6963. doi:10.1021/ja015873n
8. Li X, Gartner ZJ, Tse BN, Liu DR. Translation of DNA into Synthetic N-Acyloxazolidines. *J AM CHEM SOC*. 2004;126:5090-5092. doi:10.1021/JA049666
9. Gartner ZJ, Kanan MW, Liu DR. Expanding the Reaction Scope of DNA-Templated Synthesis\*\*. *Angew Chem Int Ed*. 2002;41(10). doi:10.1002/1521-3773(20020517)41:10<1796::AID-ANIE1796>3.0.CO;2-Z
10. Gartner ZJ, Kanan MW, Liu DR. Multistep Small-Molecule Synthesis Programmed by DNA Templates. *J AM CHEM SOC*. 2002;124:10304-10306. doi:10.1021/ja027307d
11. Brudno Y, Birnbaum ME, Kleiner RE, Liu DR. An in vitro translation, selection

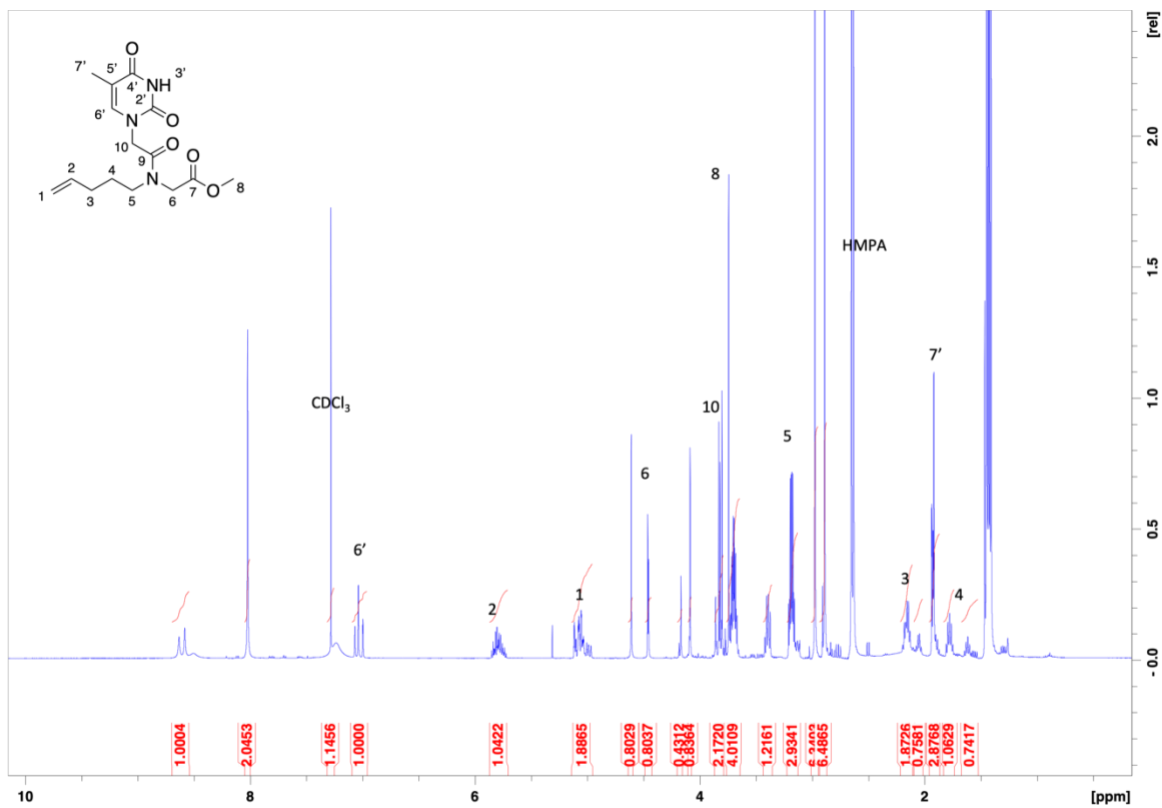


- and amplification system for peptide nucleic acids. *Nat Chem Biol.* 2009;6.  
doi:10.1038/NCHEMBIO.280
12. Niu J, Hili R, Liu DR. Enzyme-free translation of DNA into sequence-defined synthetic polymers structurally unrelated to nucleic acids. *Nat Chem* |. 2013;5.  
doi:10.1038/NCHEM.1577
  13. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science (80-)*. 1991;254(5037):1497-1500. doi:10.1126/science.1962210
  14. Pellestor F, Paulasova P. The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(9):694-700.  
doi:10.1038/sj.ejhg.5201226
  15. Egholm M, Buchardt O, Christensen L, et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules. *Nat.* 1993;362(6446):566-568. <https://doi.org/10.1038/365566a0>. Accessed January 12, 2023.
  16. Shakeel S, Karim S, Ali A. Peptide nucleic acid (PNA)-a review. *J Chem Technol Biotechnol J Chem Technol Biotechnol.* 2006;81:892-899. doi:10.1002/jctb.1505
  17. Demidov, V. V., Potaman, V. N., Frank-Kamenetskii, M. D., Egholm, M., Buchard, O., Sönnichsen, S. H., & Nielsen PE. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol.* 1994;48(6):1310-1313. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90171-6). Accessed January 12, 2023.
  18. Wittung P, Nielsen P, Nordén B. Direct Observation of Strand Invasion by Peptide Nucleic Acid (PNA) into Double-Stranded DNA. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Accessed December 16, 2022.
  19. Owczarzy R, Moreira BG, You Y, Behlke MA, Wälder JA. Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry.* 2008;47(19):5336-5353.  
doi:10.1021/BI702363U/SUPPL\_FILE/BI702363U-FILE013.PDF
  20. Misra VK, Draper DE. *On the Role of Magnesium Ions in RNA Stability.* Vol 48.; 1998.
  21. Swenson CS, Lackey HH, Reece EJ, Harris JM, Heemstra JM, Peterson EM. Evaluating the effect of ionic strength on PNA:DNA duplex formation kinetics. *RSC Chem Biol.* 2021;2(4):1249-1256. doi:10.1039/d1cb00025j
  22. Tomac S, Sarkar M, Ratilainen T, et al. Ionic Effects on the Stability and

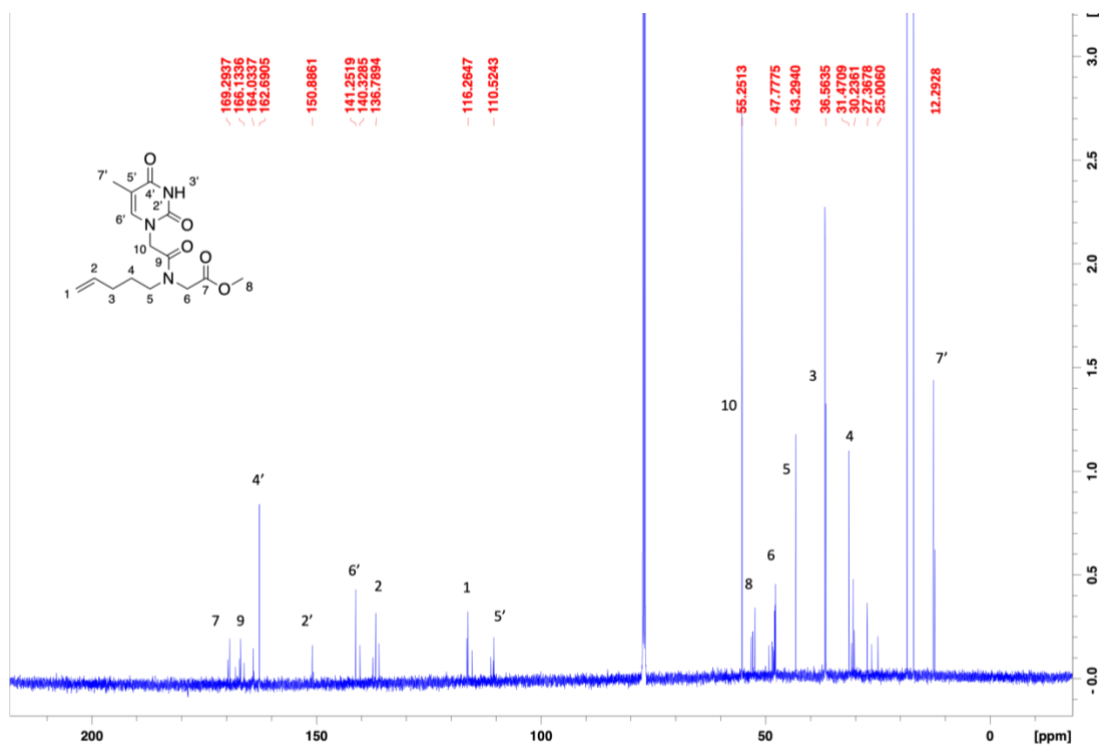
- Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes. *J Am Chem Soc.* 1996;118(24):5544-5552. doi:10.1021/JA960495L
23. Wilson DS, Szostak JW. IN VITRO SELECTION OF FUNCTIONAL NUCLEIC ACIDS. 1999. www.annualreviews.org. Accessed January 11, 2023.
  24. Ficht S, Mattes A, Seitz O. Single-Nucleotide-Specific PNA-Peptide Ligation on Synthetic and PCR DNA Templates. 2004. doi:10.1021/ja048845o
  25. Daguer JP, Ciobanu M, Alvarez S, Barluenga S, Winssinger N. DNA-templated combinatorial assembly of small molecule fragments amenable to selection/amplification cycles. *Chem Sci.* 2011;2(4):625-632. doi:10.1039/c0sc00574f
  26. Schmidt JG, Christensen L, Nielsen PE, Orgel LE. Information transfer from DNA to peptide nucleic acids by template-directed syntheses. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(23).
  27. Li X, Zhan Z-YJ, Knipe R, Lynn DG. DNA-Catalyzed Polymerization †. *J AM CHEM SOC.* 2002;124(5):746. doi:10.1021/ja017319j
  28. Rosenbaum DM, Liu DR. Efficient and Sequence-Specific DNA-Templated Polymerization of Peptide Nucleic Acid Aldehydes. *J AM CHEM SOC.* 2003;125:13924-13925. doi:10.1021/ja038058b
  29. Barluenga S, Winssinger N. PNA as a Biosupramolecular Tag for Programmable Assemblies and Reactions. 2015. doi:10.1021/acs.accounts.5b00109
  30. Chouikhi D, Barluenga S, Winssinger N. Clickable peptide nucleic acids (cPNA) with tunable affinity. *Chem Commun.* 2010;46(30):5476-5478. doi:10.1039/c0cc01081b
  31. Dose C, Ficht S, Seitz O, Seitz O. Reducing Product Inhibition in DNA-Template-Controlled Ligation Reactions\*\*. *Angew Chem Int Ed.* 2006;45:5369-5373. doi:10.1002/anie.200600464
  32. Roloff A, Seitz O. Reducing product inhibition in nucleic acid-templated ligation reactions: DNA-templated cycligation. *ChemBioChem.* 2013;14(17):2322-2328. doi:10.1002/cbic.201300516
  33. Aho A, Sulkanen M, Korhonen H, Virta P. Conjugation of Oligonucleotides to Peptide Aldehydes via a pH-Responsive N-Methoxyoxazolidine Linker. 2020. doi:10.1021/acs.orglett.0c01815
  34. Aho A, Österlund T, Rahkila J, Virta P. DNA-Templated Formation and N,O-Transacetalization of N-Methoxyoxazolidines. 2022. doi:10.1002/ejoc.202200583

35. Peri F, Dumy P, Mutter M. Chemo-and Stereoselective Glycosylation of Hydroxylamino Derivatives : A Versatile Approach to Glycoconjugates. *Pergamon Tetrahedron*. 1998;54:12269-12278.
36. Österlund T, Korhonen H, Virta P. DNA-Templated N (Me)-Alkoxyamine Glycosylation. *Org Lett*. 2018;20(6):1496-1499.  
doi:10.1021/ACS.ORGLETT.8B00113/ASSET/IMAGES/LARGE/OL-2018-001132\_0004.JPEG
37. Aho A, Äärelä A, Korhonen H, Virta P. Expanding the Scope of the Cleavable N-(Methoxy)oxazolidine Linker for the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates. *Mol 2021, Vol 26, Page 490*. 2021;26(2):490.  
doi:10.3390/MOLECULES26020490
38. Wu JC, Meng QC, Ren HM, Wang HT, Wu J, Wang Q. Recent advances in peptide nucleic acid for cancer bionanotechnology. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(6):798-805. doi:10.1038/aps.2017.33

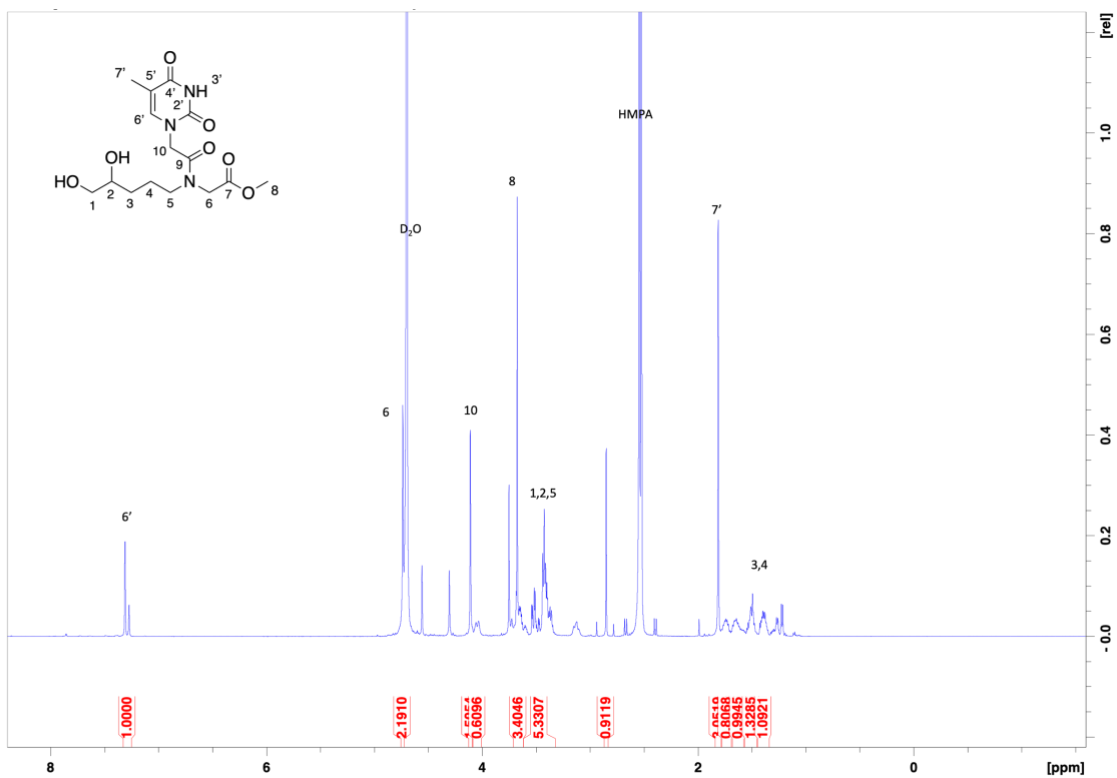
## 6. Liitteet



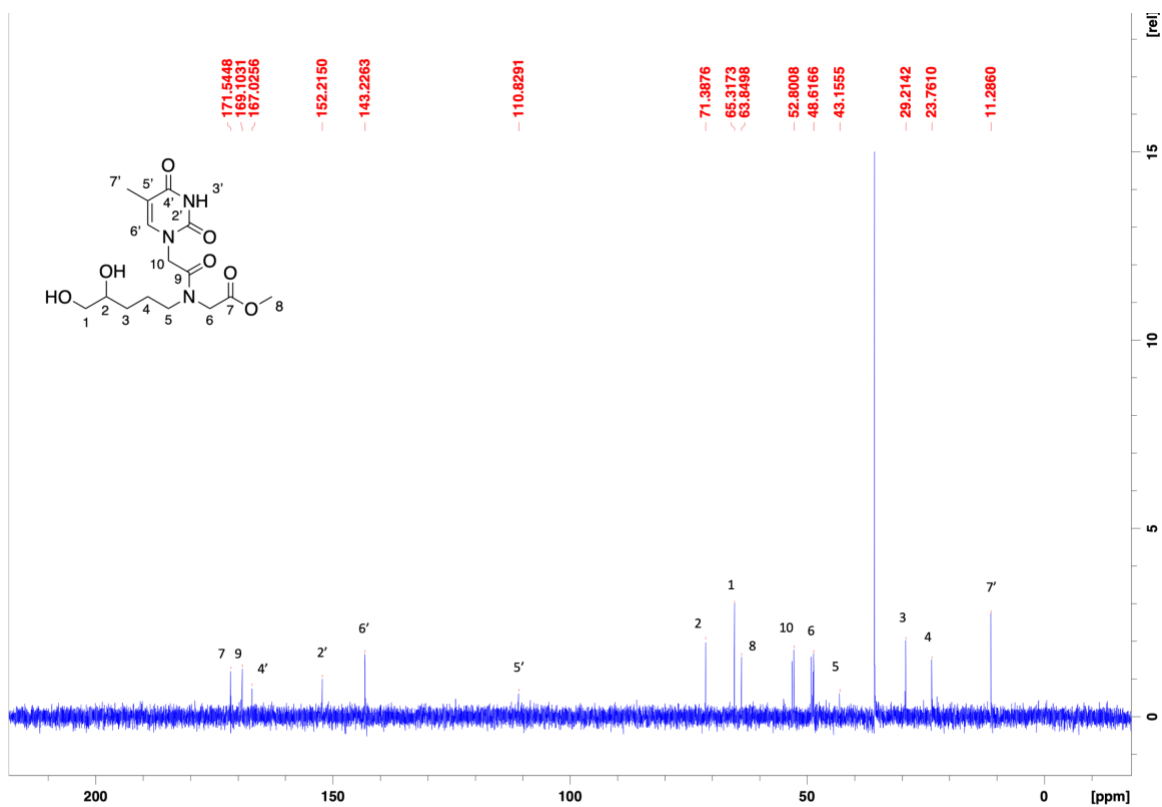
Liite 1 <sup>1</sup>H NMR alkylaatio- ja asylaatio tuotteesta 5



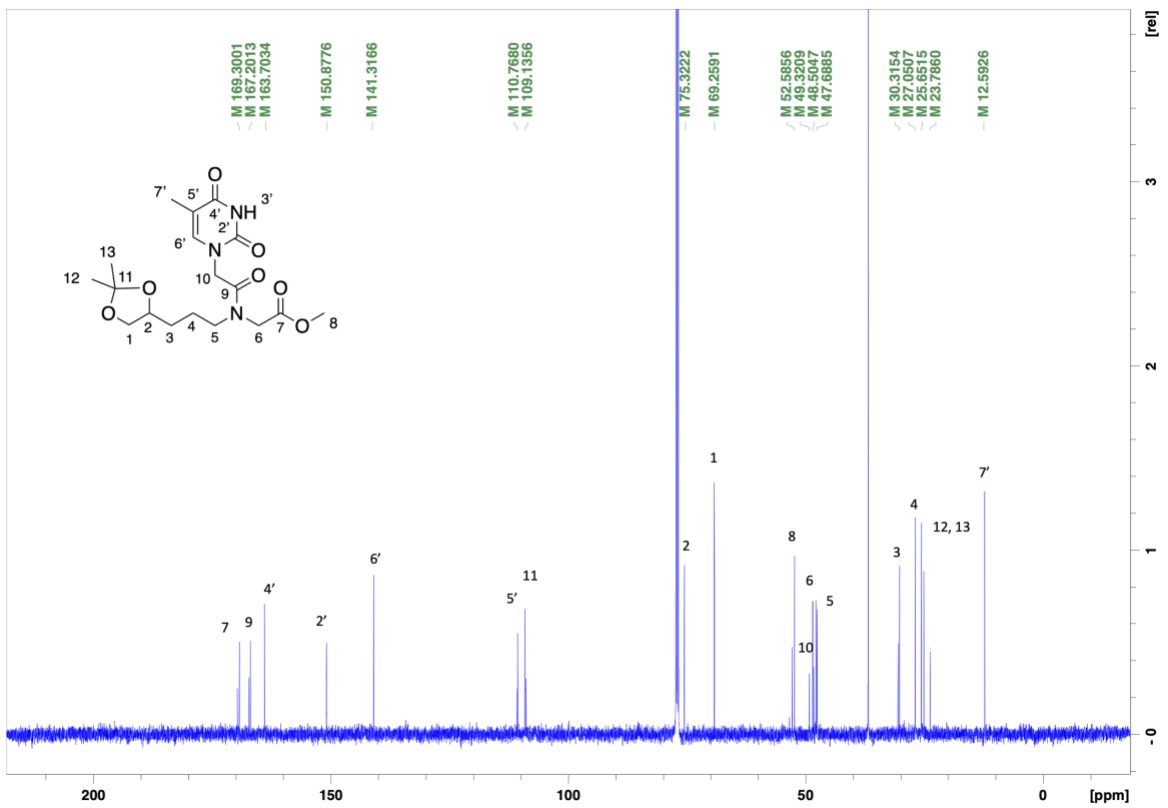
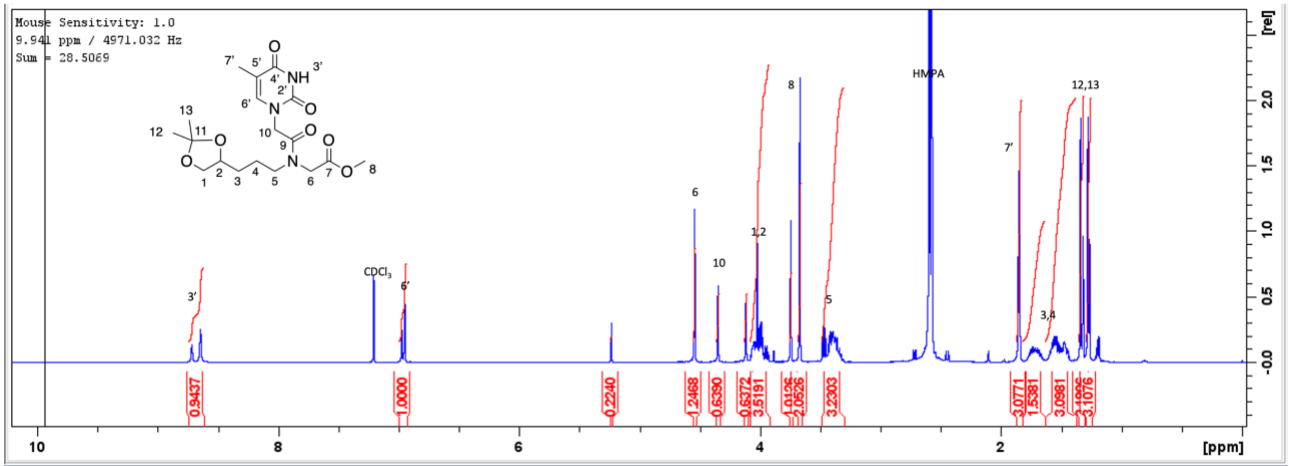
Liite 2 <sup>13</sup>C NMR alkylaatio- ja asylaatio tuotteesta 5

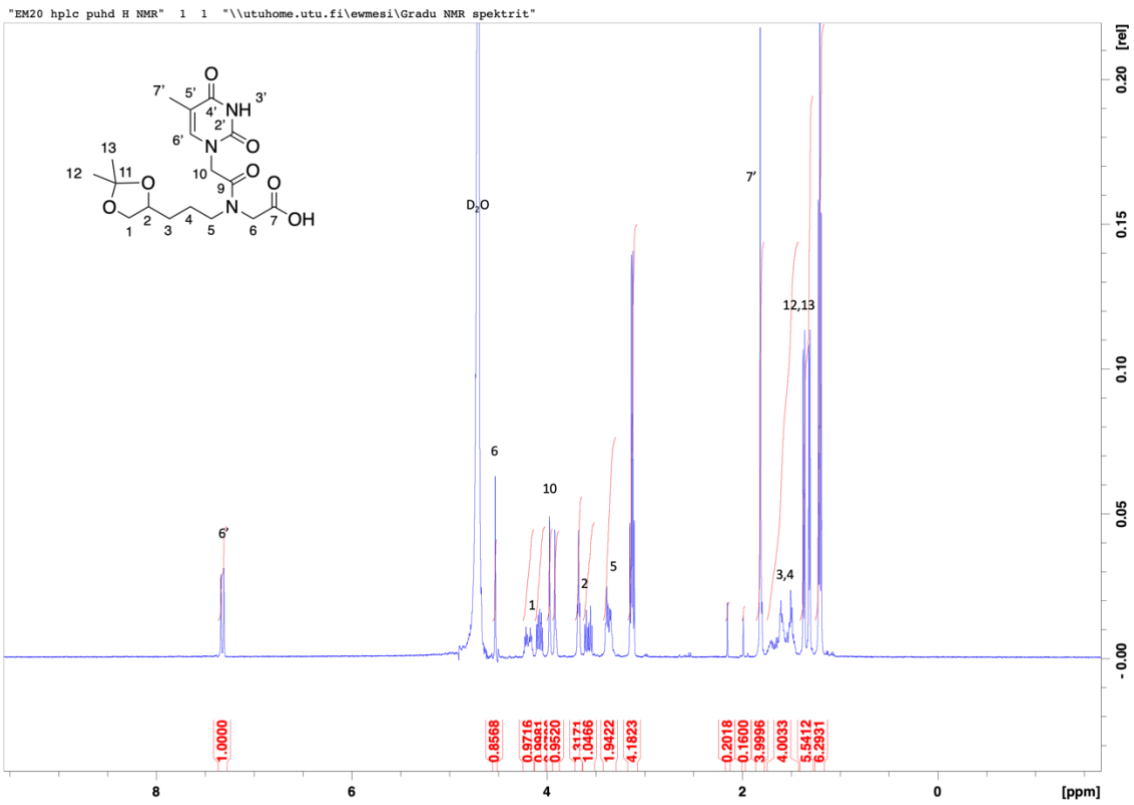


Liite 3 <sup>1</sup>H NMR hapetetusta tuotteesta 6

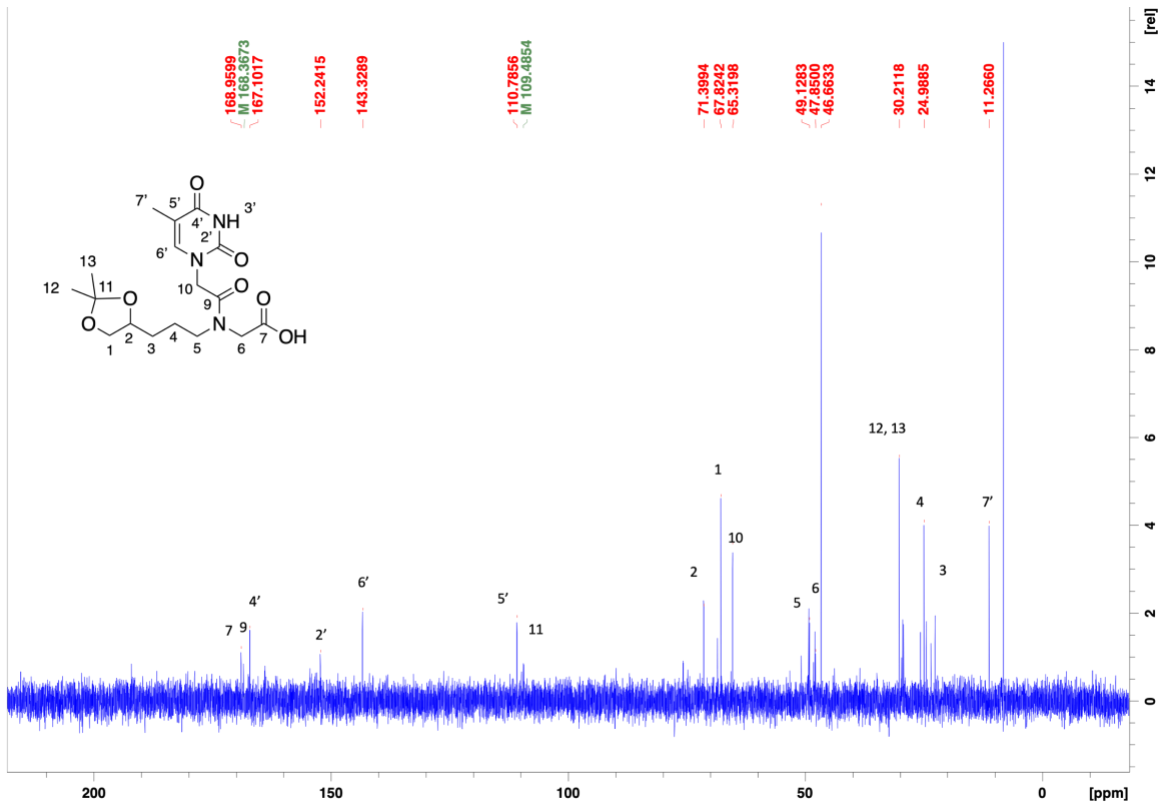


Liite 4 <sup>13</sup>C NMR hapetetusta tuotteesta 6





Liite 7  $^1\text{H}$  NMR hydrolyysituotteesta 8



Liite 8  $^{13}\text{C}$  NMR hydrolyysituotteesta 8

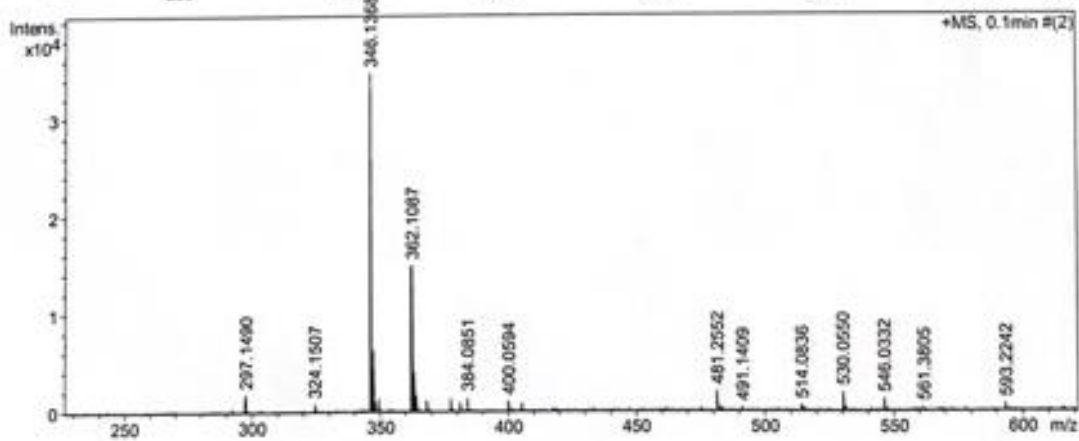
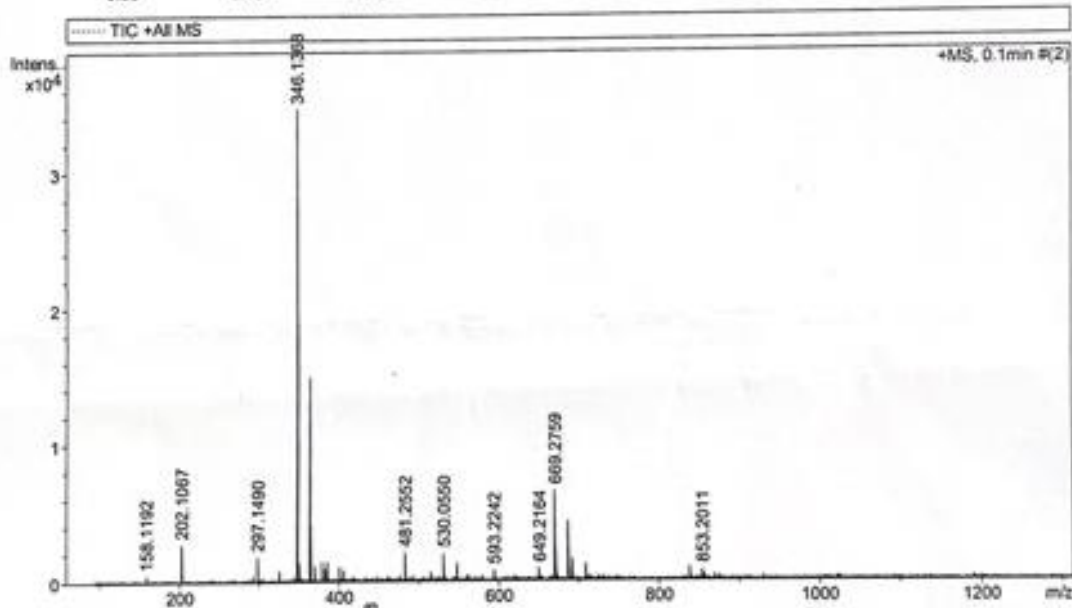
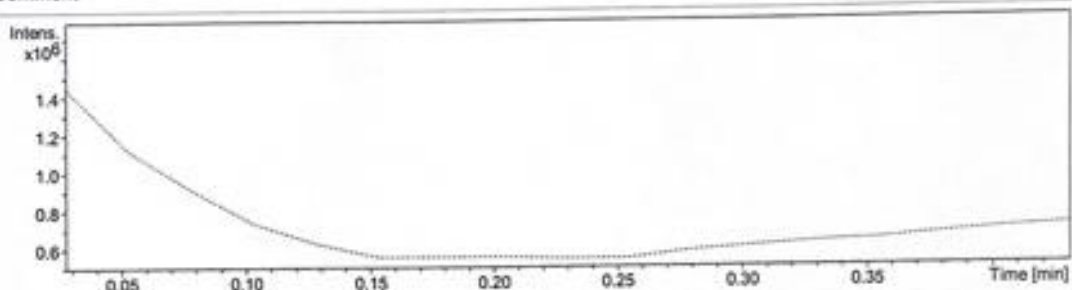
# Generic Display Report

## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Erika Mesimäki\EM11 fraktio 2.d  
Method wide\_pos.m  
Sample Name EM11 fraktio 2  
Comment

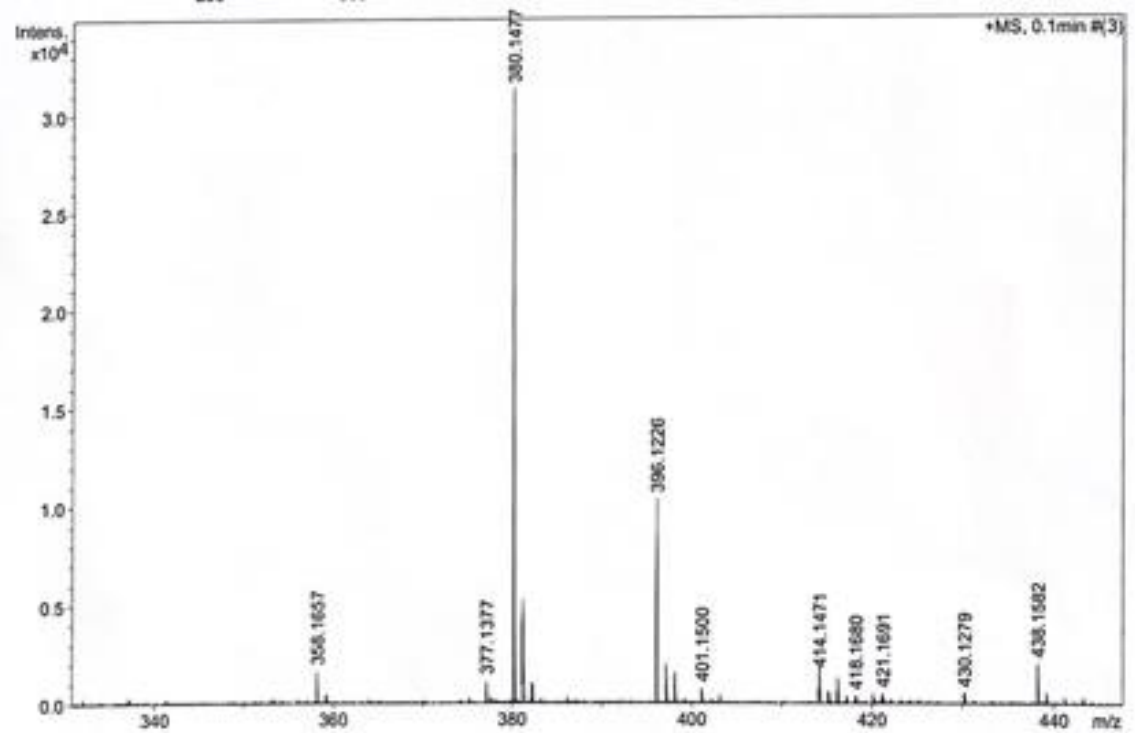
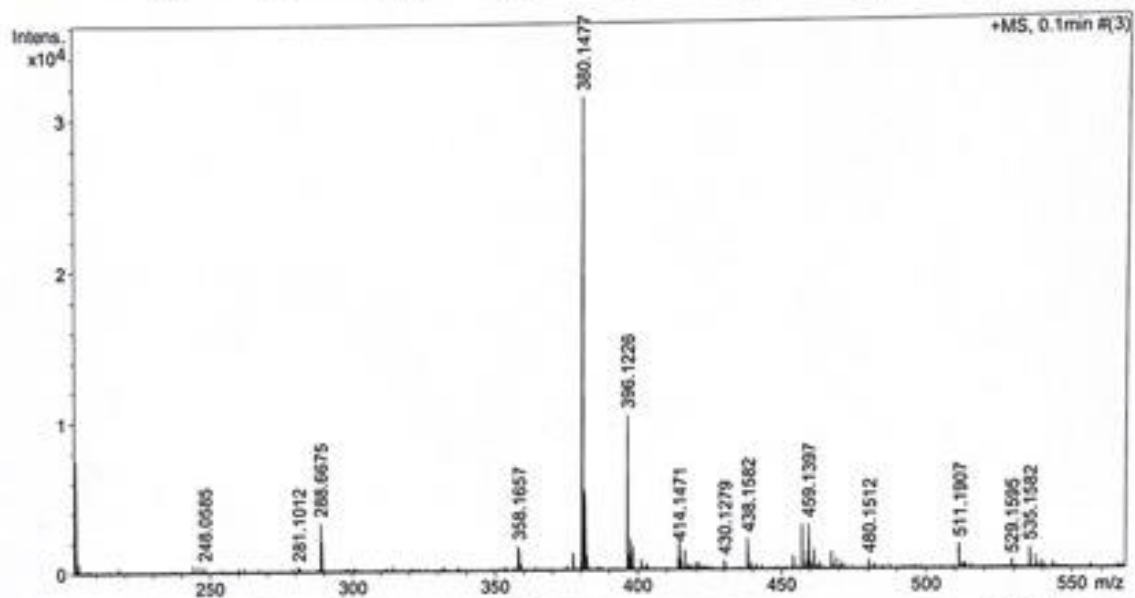
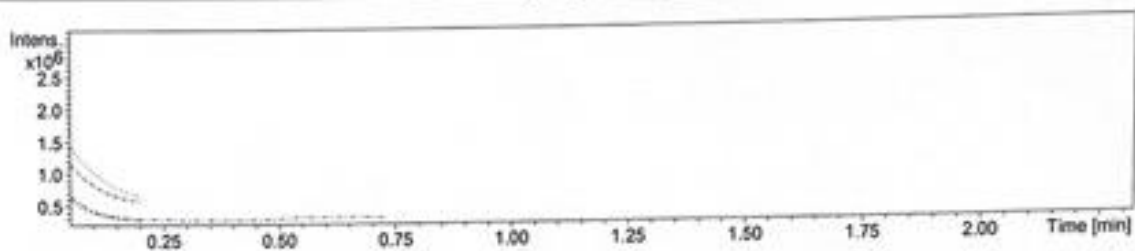
Acquisition Date 1/17/2022 9:19:02 AM

Operator Bruker07  
Instrument micrOTOF-Q

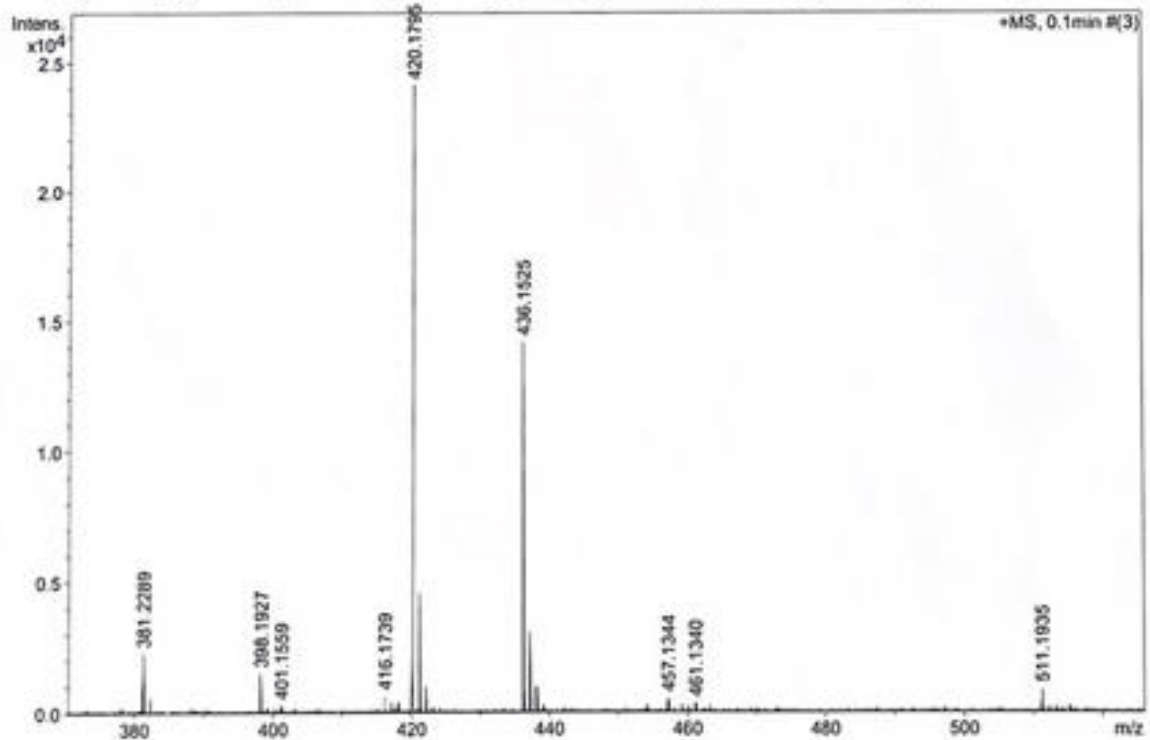
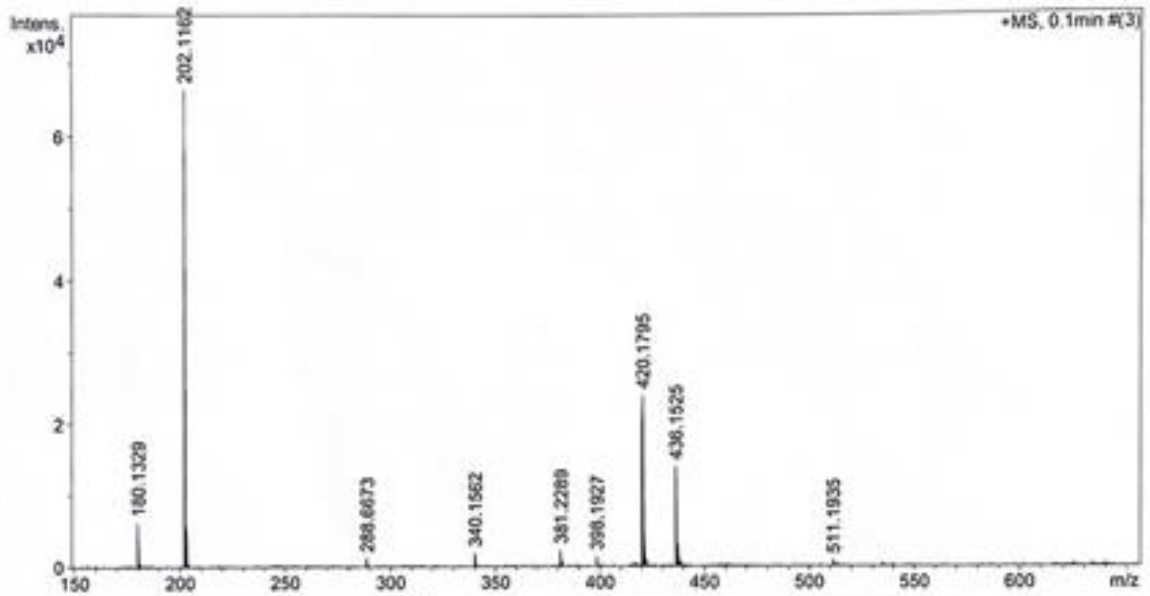
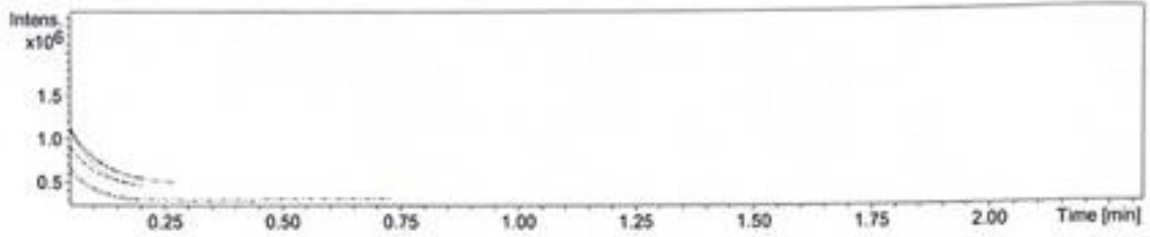




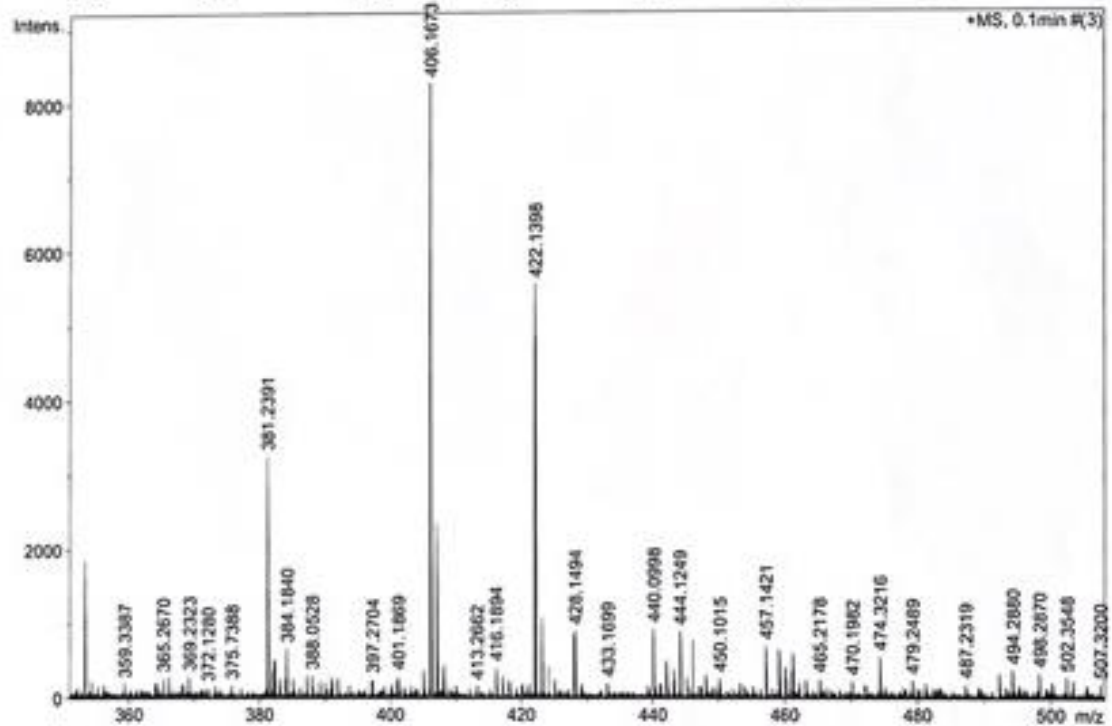
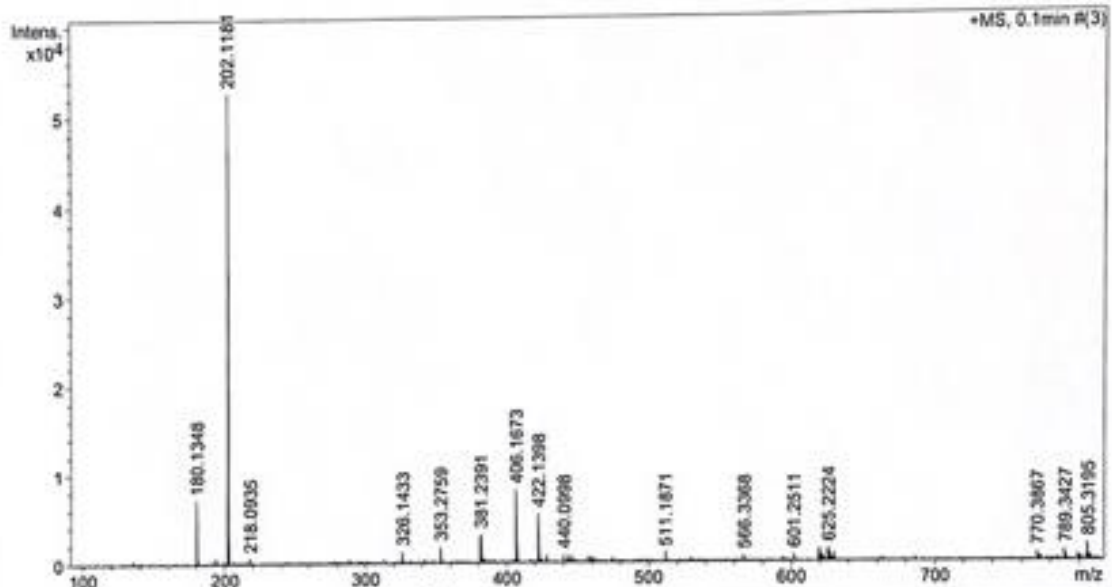
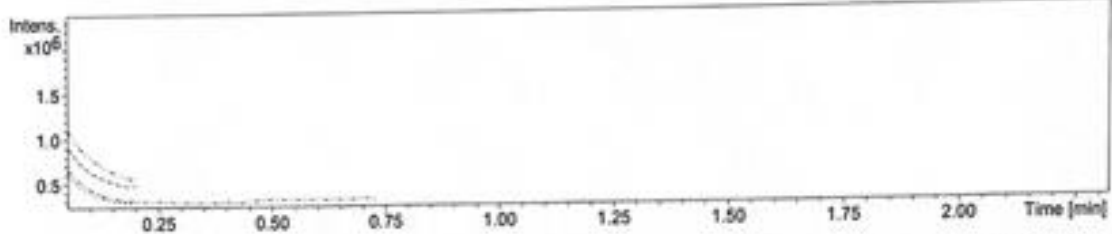
# Generic Display Report (all)



# Generic Display Report (all)



# Generic Display Report (all)



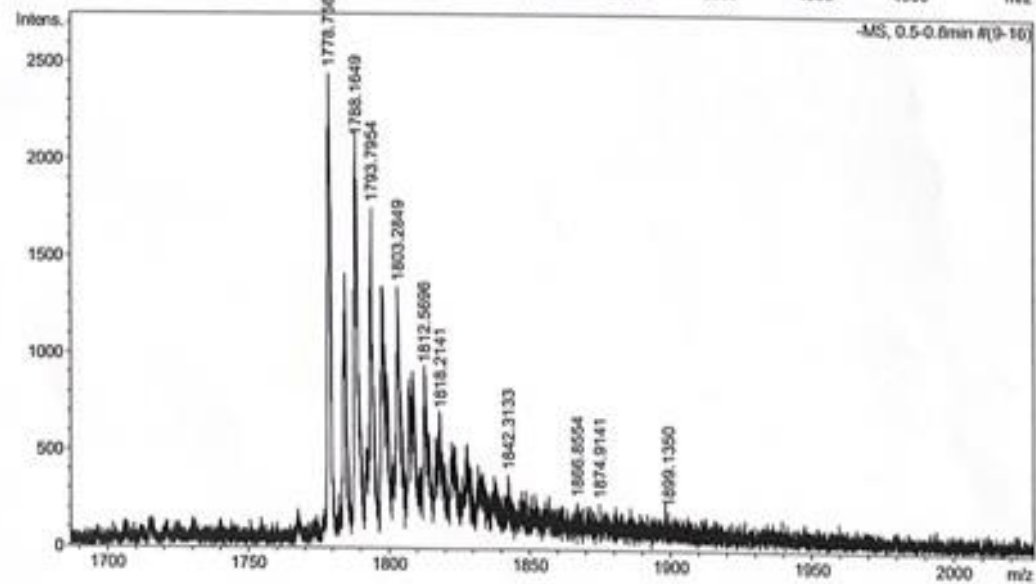
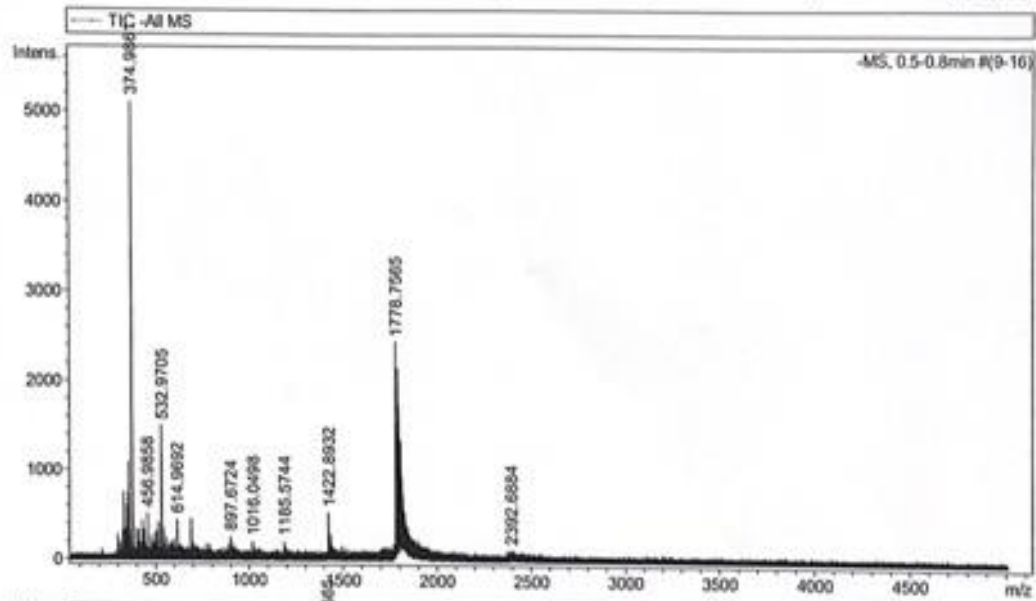
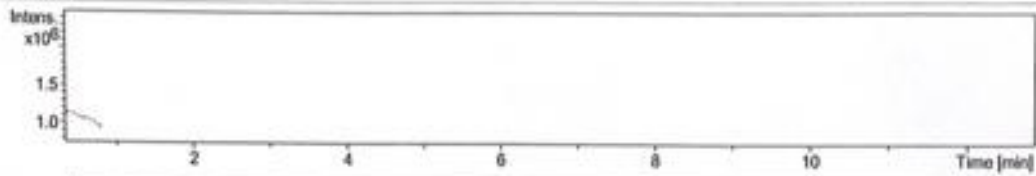
# Generic Display Report

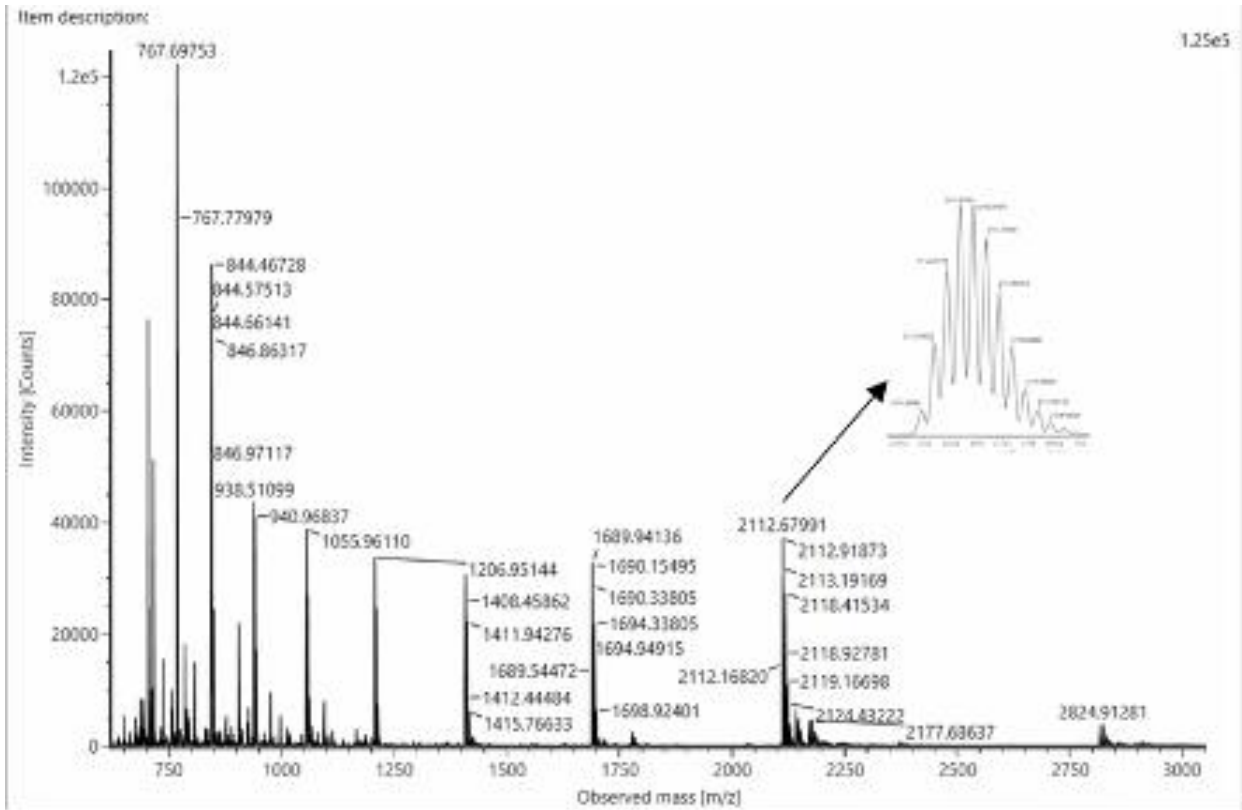
## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Erika Mesimak\EM22 oligo paapikki.d  
Method oligometodi.m  
Sample Name EM22 oligo paapikki  
Comment

Acquisition Date 2/24/2022 12:13:43 PM

Operator Bruker07  
Instrument micrOTOF-Q





*Liite 14 Massaspektri ligaatiotuotteesta*