

***N*-metoksioksatsolidiiniligaatiolla silloitetut G-kvadrupleksit**

Tuomas Rätty
Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Kemian laitos
Bio-orgaaninen kemia
Joulukuu 2023

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

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

RÄTY, TUOMAS: *N*-metoksioksatsolidiiniligaatiolla silloitetut G-kvadrupleksit

Pro Gradu -tutkielma, 40 s., 18 liitettä

Kemia

Joulukuu 2023

2000-luvulla alkaneen lääkinnällisesti aktiivisten nukleiinihappojen biomolekyylikonjugaattien tutkimuksen myötä on noussut tarve erilaisille katkeaville linkkerirakenteille. Yleisesti nämä linkkerit jaetaan kahteen ryhmään: kemiallisesti hajoavat linkkerit ja entsyymaattisesti hajoavat linkkerit. Kemiallisten linkkerien toiminta perustuu verenkierrossa pysyvään rakenteeseen, joka hajoaa kohdesolun tai kudoksen olosuhteissa ja seurauksena on kuljetettavan lääkeaineen vapautuminen. Esimerkkejä kemiallisesti hajoavista linkkerirakenteista ovat hydratsonit, jotka hajoavat happamissa olosuhteissa, ja disulfidit, jotka hajoavat pelkistävässä olosuhteissa. Tässä tutkimuksessa käytetty *N*-metoksioksatsolidiinilinkkeri on uusi pH-herkkä rakenne. Kuten hydratsonit, se on suhteellisen pysyvä neutraaleissa tai emäksisissä olosuhteissa. Happamissa olosuhteissa *N*-metoksioksatsolidiinit kuitenkin hajoavat hapon katalysoiman hydrolyysin kautta.

G-kvadrupleksit (G4) ovat DNA:n sekundäärirakenteita, jotka muodostuvat genomien perättäisiä guaniineja sisältäviin alueisiin, kuten telomeereihin. G4-rakenteet ovat pinoutuneita, neljän guaniinin muodostamia ”kvartetteja”. G4-rakenteiden muodostuminen ja niiden pysyvyys on vahvasti sidoksissa K⁺-ionin konsentraatioon.

G4-rakenteella, joka olisi dynaaminen, pH herkkä ja stabiili neutraaleissa oloissa, olisi potentiaalia toimia lääkekuljettimena, biosensorina tai nanoteknologiassa. Tämän tutkielman tarkoituksena oli tutkia G-kvadruplekseja muodostavan wtTel26 geenistä pilkottujen oligonukleotidien hybridisaation ajamaa *N*-metoksioksatsolidiiniligaatiota. Tutkimus aloitettiin valmistamalla päistään modifioituneita oligonukleotideja, jotka pareittain muodostaisivat *N*-metoksioksatsolidiiniligaation kautta wtTel26 sekvenssin. Tutkimuksessa käytettiin kolmea eri mallia, joissa ligaation kohta olisi hybridisoituneen rakenteen eri silmukoissa. Alustavissa kokeissa todistettiin reaktion toimivuus, jonka jälkeen tutkittiin sen riippuvuutta K⁺-ionin konsentraatiosta. Reaktion muodostumisen nopeutta mitattiin pH:ssa 5, + 20 °C lämpötilassa. Syntyneet G-kvadrupleksit karakterisoitiin massaspektrometrisesti. Lisäksi niiden G-kvadrupleksinen laskostuminen todennettiin CD-spektroskopiolla vertailemalla eristettyjen tuotteiden spektrejä puhtaan wtTel26 CD-spektriin.

Avainsanat: *G*-kvadrupleksi, *N*-metoksioksatsolidiini, happolabiili, oligonukleotidi

Sisällys

Lyhenneluettelo.....	1
1. Johdanto.....	3
1.1 Hoogsteen -emäspariutuvat DNA:n sekundäärirakenteet	3
1.2 G-kvadrupleksit	7
1.3 Happolabiili linkkeri.....	14
1.4 Työn tarkoitus.....	17
2 Tulokset ja niiden tarkastelu.....	19
2.1 Aldehydiprekursorin valmistus	19
2.2 Oligonukleotidien synteesi	20
2.3 Kineettiset mallit	21
2.4 Osoitusreaktiot.....	22
2.5 Kalium-ionista riippuvainen reaktiokinetiikka.....	23
2.6 G-kvadrupleksin tuottaminen puhdistusta ja CD-mittauksia varten	26
2.7 CD-mittaukset	27
3 Materiaalit ja menetelmät	28
3.1 Yleiset menetelmät	29
3.2 2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamiini)-uridiini (2).....	29
3.3 <i>N</i> -metoksioksatsolidiini-UT-dimeeri (4).....	30
3.4 <i>N</i> -metoksioksatsolidiini-UT-dimeerin 5'-asetylointi (5).....	31
3.5 <i>N</i> -metoksioksatsolidiini-UT-dimeerin 3'-silyylin poisto (6)	32
3.6 <i>N</i> -metoksioksatsolidiini-UT-dimeerin fosfitylointi (7).....	33
3.7 Oligonukleotidien synteesi	34
3.7.1 2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamino)uridiinin immobilisointi kiinteään kantajaan	34
3.7.2 Oligonukleotidien wtTel26-UNOMe synteetit	35
3.7.3 Oligonukleotidien T _{ald} -wtTel26 synteetit.....	36
3.8 G-kvadrupleksien reaktiot	37
3.8.1 Kvalitatiiviset reaktiot.....	37
3.8.2 K ⁺ -ionin konsentraatiosta riippuvat kinetiikkamittaukset.....	37
3.9 G-kvadrupleksin tuottaminen puhdistusta ja CD-mittauksia varten	38
3.10 CD-mittaukset	38
4 Johtopäätökset ja yhteenveto	39
5 Viitteet	41
6 Liitteet.....	56

Lyhenneluettelo

6-FAM	6-carboxyfluorescein
ACN	Asetonitriili
ADC	Vasta-aine-lääkekonjugaatti
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
CD	Circular dichroism
DCM	Dikloorimetaani
DIPEA	Di-isopropylietyyliamiini
DMAP	4-dimetyyliaminopyridiini
DMF	Dimetyyliformamidi
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
dsDNA	Kaksoiskierteinen deoksiribonukleiinihappo
dT-CPG	Tymidiini kiinteäkantaja
ESI	Elektronisumu ionisaattori
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Förster resonanssi energian siirto
G4	G-kvadrupleksi
G4BP	G-kvadrupleksiin sitoutuva proteiini
H-DNA	Kolmoiskierteinen deoksiribonukleiinihappo
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HPLC-MS	Korkean erotuskyvyn nestekromatografi-massaspektrometri
mQ	Tyypin 1 ultrapuhdas vesi
NaCl	Natriumkloridi
NGS	Next generation sequencing
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
PTFE	Polytetrafluorieteeni
PyBOP	Bentsotriatsol-1-yylioksitripyrrolidino-fosfoniumheksafluorifosfaatti
Q-TOF	kvadropoli lentoaika-massaspektrometri
RHPS4	3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quinol[4,3,2,kl]acridinium methosulfate
RNA	Ribonukleiinihappo
RP-HPLC	Korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografia
siRNA	Lyhyt häiritsevä RNA

SNA	Pallomainen nukleiinihappo
T _{ald.}	5'-asetaldehydi-tymidiini
TBAF	Tetrabutyyliammoniumfluoridi
TBDMS	Tert-butyylidimetyylisilyylikloridi
TBE	Tetrabromoetaani
TEA	Trietyyliamiini
TEAA	Trietyyliammoniumasetaatti
TF	Translaatiotekijä
TFO	Kolmoiskierteitä muodostava oligonukleotidi
THF	Tetrahydrofuraani
TLC	Ohutkerroskromatografia
TMPyP4	TMPyP4, meso-5,10,15,20-Tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)porphine
U _{NOMe}	2'-deoksi-2'-(N-metoksiamiini)-uridiini
UT	Uridiini-Tymidiini
UTR	Ei-koodaava alue
wtTel26	G-kvadrupleseja muodostava geeni

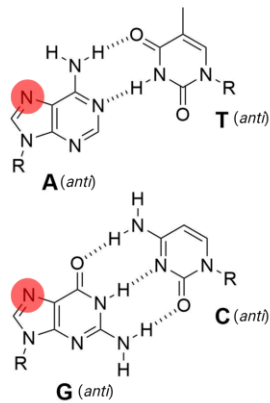
1. Johdanto

1.1 Hoogsteen -emäspariutuvat DNA:n sekundäärirakenteet

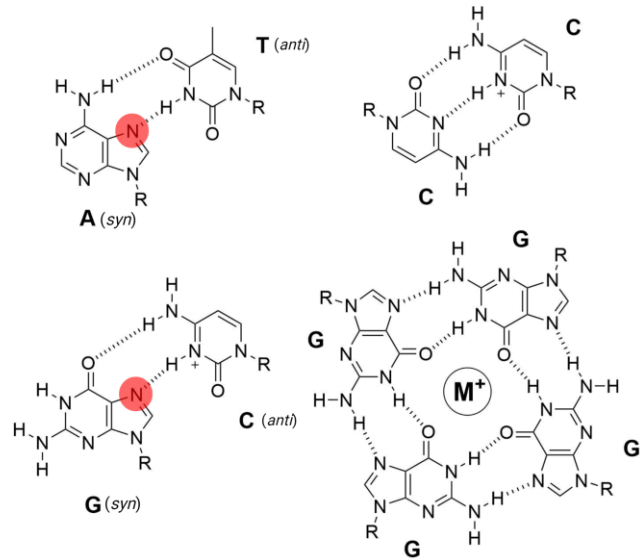
Deoksiribonukleiinihappo (DNA) on geneettisen informaation varasto, joka ohjaa kaikkien elämänmuotojen toimintaa. DNA perusrakenteessa Watson-Crick-emäsparit, A – T ja G – C ovat kahden deoksiriboosin välissä kietoutuneena kaksoiskiarteeksi, B-DNA:ksi. DNA on kuitenkin molekyylinä monimuotoinen ja se voi sisältää esimerkiksi hiusneuloja ja pullistumia. Tämän lisäksi DNA voi muodostaa korkeamman asteen sekundäärirakenteita hyödyntämällä Watson-Crick-emäsparien ulkopuolista vetysitoutumista. Tämä avaa uuden, laajemman käsityksen DNA:n rakenteesta ja siitä mihin kaikkeen se molekyylinä kykenee. Huomionarvoisia näiden poikkeavien sitoutumismallien joukossa ovat G-kvadrupleksit (G4)¹, I-muotoinen DNA² ja DNA:n kolmoiskiarteet³.

Näitä kaikkia edellä mainittuja rakenteita yhdistää se, että ne tapahtuvat Hoogsteen -emäspariutumisen kautta (Kuva 1.). Toisin kuin Watson-Crick -emäspariutumisessa, jossa adenosiini ja tymidiini (tai uridiini RNA:ssa) sekä guaniini ja sytydiini muodostavat kaksi ja kolme vetysidosta, Hoogsteen -emäspariutumisessa käytetään puriiniemästen N7-typen puolta, joka ei normaalisti osallistu emästen väliseen sitoutumiseen.⁴ Toisen puolen käyttäminen mahdollistaa erilaisia sitoutumismahdollisuuksia, joita ei normaalissa Watson-Crick pariutumisessa ole. Esimerkiksi kahden guaniinin sitoutumisen G4-rakenteissa, jossa puriinin toisen puolen N7-tyyppi osallistuu sitoutumiseen tai kolmannen emäksen sitoutumista kolmoiskiarteisessä DNA:ssa, jossa sama puriinin N7-tyyppi, toimii sidoksessa donorina. Rakenteesta riippuen tällainen sitoutuminen ei kuitenkaan usein ole pysyvää fysiologisissa olosuhteissa ja rakenteet ovat väliaikaisia. Kolmoiskiarteiden muodostuminen edellyttää esimerkiksi sytydiinin N3-typen protonoitumisen, joka tapahtuu vain lievästi happamissa olosuhteissa.⁵

Watson-Crick



Hoogsteen

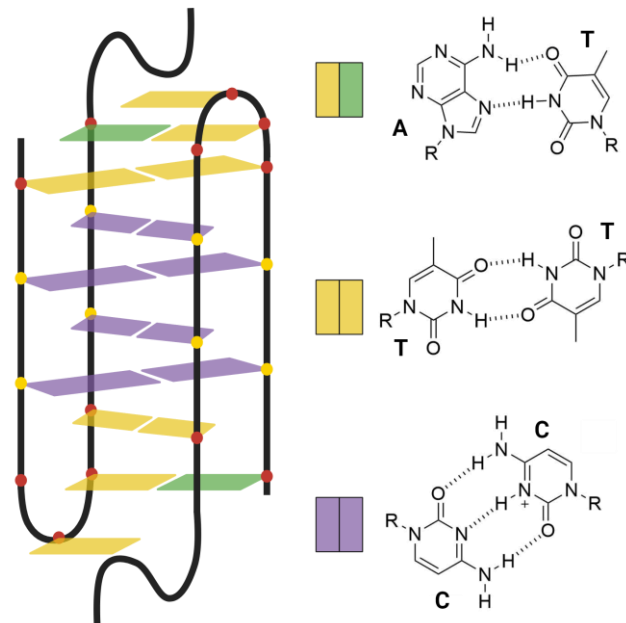


Kuva 1. Vertailu yleisemmin tunnetun Watson-Crick -emäspariutumisen ja Hoogsteen -emäspariutumisen välillä. Hoogsteen -emäspariutumisen hyödyntää puriinin N7 typen puolta, joka ei normaalisti osallistu emästen väliseen sitoutumiseen. Hoogsteen -vetyisitouminen edellyttää sytosiinin protonoitumista. Puriinin N7 on merkitty kuvan punaisella.

I-muotoinen DNA muistuttaa G-kvadrupleksia. Rakenteena I-muotoinen DNA on lähimpänä G-kvadrupleksia oleva DNA:n sekundäärirakenne. Siinä paraleelit, paljon sytosiinia sisältävät sekvenssit, muodostavat pareittain interkaloituneen, I:n muotoisen rakenteen² (Kuva 2.). Muodostuakseen, tämä rakenne vaatii lievästi happaman pH:n sillä rakenteen muodostamiseen osallistuvista sytosiineista toisen täytyy olla protonoituneessa tilassa (N3: $pK_a = 4.57$).^{6,7,8} N3-tyyppien välistä löytyvä protoni on delokalisoitunut ja hyppii kahden typen välillä.⁹ G4-rakenteen tavoin, I-muotoinen DNA voi olla intramolekulaarinen, muodostaen silmukoita.⁸ Rakenne voi muodostua myös kahdesta eri juosteesta ollen intermolekulaarinen. G4-rakenteiden tavoin I-muotoinen DNA hyödyntää π -pinoutumista interkaloituneiden sytosiinien kasaamisessa. G4-rakenteesta poiketen, I-muotoinen DNA ei sisällä kationia joka stabiloi rakenteen, vaan se on korvattu hemiprotonoituneella N3-H-N3⁺-sidoksella.⁹

I-muotoisen DNA:n olemassaolo pystyttiin havaitsemaan hiljattain in vivo, vasta-aineella, joka kykenee sitoutumaan selektiivisesti tähän rakenteeseen.¹⁰ I-muotoinen DNA muistuttaa paitsi rakenteeltaan, myös ominaisuuksiltaan G-kvadrupleksia, osallistuen geenien ilmenemisen säätelyyn erilaisten proteiini- ja pienmolekyylivuorovaikutusten kautta.¹¹⁻¹³ Käyttämällä samaa laskennallista mallia, joka tehtiin alunperin mahdollisten G4-rakenteiden etsimistä varten, I-muotoisen DNA:n mahdollisten paikkojen huomattiin keskittyvän lähinnä geenien promoottorien alueelle.¹⁴ Tästä syystä I-muotoisen DNA:n käyttöä terapeuttisena kohteena on tutkittu, varsinkin koska moni näistä edellä mainituista kohdista liittyvät onkogeneenisten geenien

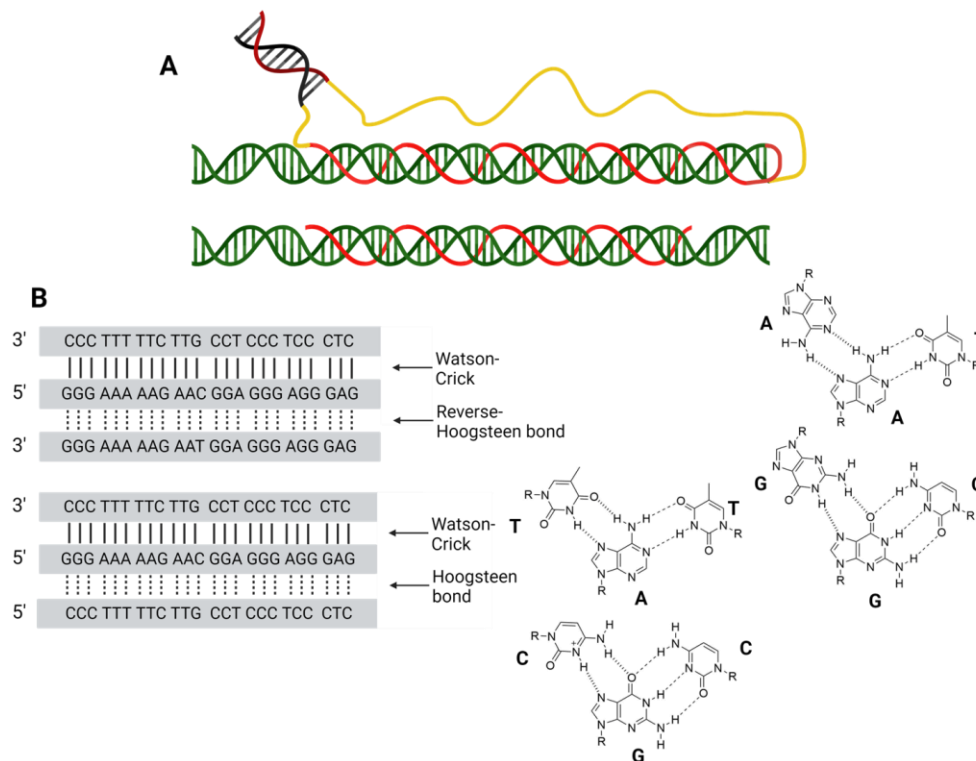
hallitsemiseen.¹⁵ ¹⁵ Paitsi, että I-muotoisen DNA:n rakenteella ja ominaisuuksilla on merkitystä *in vivo*, sitä voitaisiin hyödyntää myös esimerkiksi analytiikassa tai nanoteknologiassa. Sen konformaation muutos on nopea, reversiibeli ja pH-riippuvainen, täydellinen käytettäväksi esimerkiksi erilaisissa sensoreissa tai kytkimissä. Suoraviivaisin sovellutus on käyttää rakennetta pH-mittarina. Sytosiinia sisältävä oligonukleotidi on usein liitetty toiseen rakenteeseen konformaation muutoksen havaitsemiseksi esimerkiksi kultananopartikkeliin väriin perustuvissa menetelmissä¹⁶ tai elektrodiin elektrokemiallisessa anturissa.¹⁷ Solun sisäisessä *in vivo* analytiikassa on käytetty DNA-rakenteisiin perustuvaa nanolaitetta, jonka konformaation muutosta mitataan fluoresenssilla.¹⁸ Konformaation muutos tuo fluoresenssin sammuttajan leiman lähelle, laskien mitattua fluoresenssia. Liu et. al.¹⁸ tutkivat tämän kaltaista sensoria. Heidän mallissa konformaation muutoksen todettiin tapahtuvan noin viidessä sekunnissa. He myös tutkivat konformaation muutoksen toistettavuutta. 30 syklin aikana signaalin maksimin vaihteluväli oli 3% eikä reaktiossa havaittu merkittävää signaalin alenemaa ensimmäisen ja viimeisen syklin välillä.



Kuva 2. Kuva I-muotoisesta DNA:sta ja siinä esiintyvistä sytosiini-sytosiini Hoogsteen-emäsparista. Sytosiiniparin N3-tyypet ovat hemiprotonoituneessa tilassa, eli parista toisen sytosiinin typpi on protonoituneena sitoutumisen mahdollistamiseksi. Rakenteessa voi olla muitakin Hoogsteen-emäspareja, kuten rakenteen päädyissä olevat Tymiini-Tymiini parit (kelt-kelt).

DNA:n kolmoiskierteessä kaksoiskiarteeseen DNA:han sitoutuu Hoogsteen-emäspariutumisen avulla kolmas juoste.^{3,19} Kuten aikaisemmin esitelty I-muotoinen DNA, kolmoiskierre voi olla joko intra- tai intermolekulaarinen (Kuva 3. A). Intramolekulaarista DNA:n kolmoiskierrettä tunnetaan kahta erilaista; *H-DNA ja H-DNA. Rakenteet eroavat sitoutuvan kolmannen juosteen koostumuksessa, H-DNA:ssa

kolmas juoste koostuu pääasiassa pyrimidiiniemäksistä eli tymiinistä ja sytosiinista ja *H-DNA:ssa pääasiassa puriiniemäksistä eli guaniinista ja adeniinista.²⁰ Rakenteiden muodostumiseen tarvittavat olosuhteet myös eroavat. H-DNA vaatii hieman happamat olosuhteet, että homopyrimidiini juosteen adensiiniemäs pääsee protonoitumaan, jolloin koko juoste taipuu taakse sitoutuen paralleeliksi edeltävää puriini juosteeseen.²¹ *H-DNA muodostuu neutraaleissa olosuhteissa ja sitoutuva kolmas juoste on antiparalleeliksi asettuneena. Rakennetta stabiloi Mg^{2+} -ioni.²² Intermolekulaarisessa kolmoiskierteessä kolmas juoste on irrallinen rakenne esimerkiksi kolmoiskierteitä muodostava oligonukleotidi (triplex forming oligonucleotide, TFO). Kolmannen juosteen sitoutuminen riippuu sen ja kohde DNA:n rakenteesta. Paljon pyrimidiiniemäksiä eli sytosiiniä ja tymiiniä sisältävä kolmas juoste sitoutuu paljon puriiniemästä sisältävään kaksoiskierteeseen DNA:han paralleeliksi Hoogsteen-emäspariutumisella. Paljon puriiniemästä eli adeniinia ja guaniinia sisältävä kolmas juoste sitoutuu antiparalleeliksi (Kuva 3. B).²³ H-DNA:ssa kolmas DNA:n juoste sitoutuu olemassa olevan kaksoiskierrteen leveään uraan. Alkuperäisen DNA molekyylin kiertyneisyys vaikuttaa kolmannen juosteen sitoutumiseen. DNA:n kolmoiskierre ja erityisesti H-DNA toimii useiden geenien ilmentämisen säätelijänä pääasiassa eukaryoottisissa soluissa, missä niitä löytyy eniten geenien promoottorien alueelta.²⁴



Kuva 3. A) Yllä intramolekulaarinen DNA:n kolmoiskierre, jossa peilikuvainen juoste on taittunut taakse ja sitoutunut kolmanneksi juosteeksi Hoogsteen -emäspareilla. Alla intermolekulaarinen, B-DNA:han sitoutunut kolmas juoste on erillinen molekyyli, kuten TFO. **B)** Esimerkit antiparalleelista H-DNA:sta, joka käyttää käännteistä Hoogsteen-pariutumista ja paralleelista H-DNA:sta, joka käyttää normaalia Hoogsteen pariutumista.

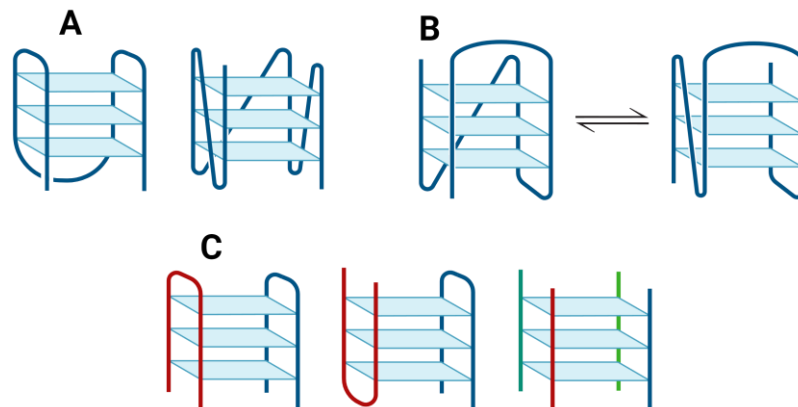
Kolmoiskierteiden tutkiminen oli aluksi 1990-luvulla kiivasta, johtuen sen kyvystä reguloida yksittäisten geenien ilmentymistä, kuten erityisesti syövässä keskeistä c-myc transkriptio faktoria.²⁵ Kolmoiskierteiden muodostumiseen perustuvat ratkaisut eivät kuitenkaan ole päässeet esikliinisestä testivaiheesta eteenpäin. Verrattuna I-muotoiseen DNA:han ja G4-rakenteisiin, joissa rakenteita muodostavien pienmolekyylien ja kohteena käyttävien entsyymien tunnistusmekanismit perustuvat sekvenssien homogeenisyydestä johtuen rakenteellisiin eroihin, TFO:n tunnistus perustuu sekvenssiin ja on täten paljon spesifisempi ja helpompi kohdentaa tiettyyn geeniin. Ongelmat TFO:n käyttöön lääkkeenä liittyvät enemmän oligonukleotidien yleisiin ongelmiin, kuten kohteeseen pääsyyn ja riittävän tehokkaaseen sitoutumiseen. Oligonukleotidit eivät esimerkiksi sellaisenaan pääse soluun, vaan ne tarvitsevat usein aktiivisen kuljettimen. Lisäksi guaniinipitoinen TFO voi herkästi muodostaa G-kvadrupleksin solussa.²⁶ Vaikka TFO:n luoman tripleksin muodostuminen on hidasta, muodostuva tripleksi on suhteellisen pysyvä.²⁷ Näistä haasteista huolimatta TFO:n potentiaali on suuri.

Tässä tutkielmassa tullaan pääsääntöisesti keskittymään kolmanteen esimerkkiin Hoogsteen-pariutuvista DNA:n sekundäärirakenteista: G-kvadruplekseihin. I-muotoisen DNA:n ja H-DNA:n tavoin, G4-rakenteet ovat normaalista kaksoiskierteisestä DNA:sta muodostuva erityinen rakenne, joka hyödyntää Hoogsteen -emäspariutumista. Kuten I-muotoinen DNA ja H-DNA, G4-rakenteet omaavat myös samanlaisia geneettiseen säätelyyn ja solusykliin liittyviä ominaisuuksia.

1.2 G-kvadrupleksit

Yksittäisten guanosiinimonofosfaattien taipumuksesta aggregoitua konsentroidussa liuoksessa geeliksi on tiedetty jo yli sata vuotta.²⁸ Tuolloin käsiteltiin vain yksittäisiä monofosfaatteja, joita löydettiin haimasta, eikä aggregoitumisen syytä tiedetty tarkemmin. Ensimmäinen julkaisu guaniinin muodostamasta heliksimäisestä rakenteesta tehtiin 50 vuotta myöhemmin optisilla mittausmenetelmillä ja 13 vuotta tämän jälkeen rakenteen nelisäikeisyys varmistettiin röntgendiffraktiolla ja tietokonemallinnuksella.^{1,29} NMR-spektroskopian ja modernien tietokonemallien avulla on tunnistettu useita erilaisia G4-rakenteita, intramolekulaarisista intermolekulaarisiin ja multimeerisiin G4-rakenteisiin asti (Kuva 4.).^{30,31} G4-rakenteen muodostuminen tarvitsee guaniinipitoisen sekvenssin ja kationin, jonka ympärille koordinoitua. Kumpikaan näistä ei ole solussa harvinainen; kationina G4 käyttää monovalenttisiä kationeita kuten kalium- tai natriumioneja, joista ensimmäinen muodostaa noin 98% solun sisäisistä kationeista.³² Tästä syystä in vivo G4-rakenteet ovat käytännössä aina koordinoituneet kaliumin ympärille.

Litium-iona on yleisesti käytetty kontrollina, joka ei juurikaan muodosta G4-rakenteita, mutta yhdessä natriumin tai kaliumin kanssa litium parantaa rakenteen muodostumista voimakkaamman DNA:n kondensoitumisen kautta.³³ Aikaisemmat tietokone-mallinnukset löysivät ihmisen genomista noin 375 000 mahdollista kohtaa G4-rakenteiden muodostumiselle.^{34,35} Nämä ovat kuitenkin vain arvioita, jotka on saatu laskemalla. Uudemmat tutkimukset, joissa on käytetty uuden sukupolven sekvensointia (next generation sequencing, NGS), löydettiin 715 000 mahdollista kohtaa.³⁶ Suuri määrä uusista kohdista koostui epätavallisen pitkiä silmukoita omaavista G4-rakenteista, joita laskennallinen malli ei kyennyt huomioimaan.³⁷ Tämä ei kuitenkaan tarkoita, että kaikissa näissä kohdissa olisi riittävät olosuhteet G4-rakenteiden muodostamiselle, tai muodostuva G4-rakenne olisi riittävän stabiili pysyäksään kasassa. Tarkka tieto G4-rakenteiden oikeasta määrästä in vivo on käytännössä mahdotonta tietää, koska mahdollisia rakenteita on yksinkertaisesti liikaa ja niiden havaitseminen komiuloitteisessa muodossa on vaikeaa. Lisäksi G4-rakenteet ovat väliaikaisia ja muodostuvat vain tiettyjen prosessien aikana.^{38,39}



Kuva 4. Erilaisia mahdollisia G4-rakenteita. **A)** Kaksi esimerkkiä intramolekulaarisesta G-kvadrupleksista. **B)** Kaksi hybridi-tyyppin G-kvadrupleksia. Tutkimuksessa käytetty wtTel26 muodostaa päätuotteena hybridi-2-tyyppin G4-rakenteita (oikealla). Rakenteet ovat tasapainossa, jonka liikkumiseen voi vaikuttaa esimerkiksi olosuhteet tai rakenteessa käytetyn kationin tyyppi. **C)** Intramolekulaarisia G-kvadruplekseja.

G4-rakenteet ovat monimutkaisia rakenteita joiden topologiaan vaikuttavat monet eri asiat kuten sekvenssi, kationi, muodostuuko se yhdestä vai monesta eri nukleotidinauhasta ja rakennetta ympäröivät olosuhteet.⁴⁰ Perusrakenteena G4 koostuu päällekkäin kasautuneista guaniinin kvarteteista, näitä yhdistävistä silmukoista sekä rakenteen keskellä olevasta kationista.⁴¹ G4-rakenteiden muodostumisen Gibbssin vapaaenergia on kuitenkin negatiivinen, joten nämä rakenteet voivat muodostua spontaanisti.⁴² Guaniinien kvartetteja pitää olla päällekkäin vähintään kolme tai enemmän, ja välissä olevien silmukoiden pituus vähintään kaksi nukleotidia, mutta

silmukka voi olla useita kymmeniä nukleotidejä pitkä. Silmukan pituus korreloi käänteisesti G4-rakenteen pysyvyyden kanssa, kestäen jopa 21 nukleotidiä pitkiä silmukoita, mutta yleisesti hyvin pitkät silmukat tai useampi pitkä silmukka heikentävät huomattavasti rakenteen pysyvyyttä.⁴³ Yleisin G4-rakenne on kolme kvartettia, yhdistettynä kolmen nukleotidin silmukalla. Kvartettien määrän ja silmukoiden pituuksien lisäksi G4-rakenteet voivat muodostua kahdesta, komesta tai neljästä eri nukleotidinauhasta. Näitä rakenteita kutsutaan intramolekulaarisiksi G-kvadruplekseiksi^{31,44}. Lisäksi kaikki edellä mainitut intra- ja intermolekulaariset G-kvadrupleksit voivat keskenään muodostaa multimeerisiä rakenteita.³⁰ Toisin sanoen erilaisten mahdollisten rakenteiden määrä on valtava.

G4-rakenteen kationi on tärkein osa rakenteen muodostamista. Ilman sitä kvartetit eivät koordinoitu, eikä rakennetta muodostu. Kationi myös joissain tapauksissa ohjaa mihin kolmiulotteiseen muotoon G4 päättyy. Kationi on koordinoituneena rakenteen keskellä, kahden kvartetin välissä. Solun sisällä vallitsevien olosuhteiden takia tämä kationi on käytännössä aina kalium-ioni. Tämä ei kuitenkaan tarkoita etteivät erilaiset kationit, joita ei ole saatavilla solussa, jopa divalentit kationit, sopisi. Näistä eksoottisista monovalenttisista kationeista rubidium, cesium, tallium ja ammoniumioni⁴⁵ ovat G4-rakenteita stabiloivia. Vastaavasti divalenteista kationeista strontium, barium ja lyijy⁴⁶ omaavat edellä mainittuja kationeja vastaavat ominaisuudet. Kationien välillä on kuitenkin eroja stabiloivan vaikutuksen vahvuudessa ($\text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+$). Monilla kationeilla on myös G4-rakenteita häiritseviä vaikutuksia. Mangaani, koboltti ja nikkeli destabiloivat G-4 rakenteita jo pienissä määrissä ja tietyissä olosuhteissa ne voivat jopa estää rakenteiden muodostumisen kokonaan.⁴⁷ Hyvä esimerkki kationin vaikutuksesta G4:n rakenteeseen on tässäkin tutkimuksessa käytetty ihmisen telomeerinen DNA. Se muodostaa kaksi hyvin erilaista rakennetta: korimaisen G-kvadrupleksin natrium-ionin läsnäollessa ja hybridi-tyypin kvadrupleksin kalium-ionin toimiessa kationina.^{48,49,50}

DNA-sekvensointi ja vasta-ainetutkimuksissa on huomattu, etteivät mahdolliset G4-rakenteita muodostavat alueet ole sattumanvaraisesti pitkin genomia, vaan keskittyvät erityisesti geenien promoottorialueisiin, DNA:n ei-koodaviin alueisiin (untranslated region, UTR) ja genomien päätyihin, telomeereihin.^{35,51} Tämä tiettyille alueille keskittyminen ja G4-rakenteiden esiintymisen in vivo, viittaavat siihen, että G-kvadruplekseilla on vaikutus solun kasvuun ja geenien ilmentämisen prosesseihin, kuten DNA:n replikaatioon, transkriptioon ja muihin DNA- ja RNA-proteiini-vuorovaikutuksiin.⁵²⁻⁵⁶ Vaikka G4-rakenteet ovatkin stabiileja rakenteita, eivät ne voi

muodostua spontaanisti kaksoiskierteiseen DNA:han ilman apua. Yksijuosteista DNA:ta löytyy kahdesta paikasta, telomeereistä ja hetkellisesti DNA:n replikaation, transkription, tai korjauksen aikana. Tällöin normaalit Watson-Crick emäsparit rikkoutuvat ja sopiva yksijuosteinen DNA:n pätkä voi DNA-hiusneulan sijaan muodostaa G4-rakenteen Hoogsteen -emäspariutumisen kautta. DNA:n lisäksi G4-rakenteita voi muodostus myös RNA:han, jossa ne myös toimivat eri proteiinien kohteina ja DNA:n G4-rakenteiden tapaan ne voivat säädellä geneettisiä prosesseja, kuten translaation tehokkuutta.^{57,58} RNA G4-rakenteista ei pitkään ollut varmaa näyttöä in vivo ja useat tutkimukset väittivät, ettei G4-rakenteita muodostuisi RNA:han.⁵⁹ RNA sekvenssoinnin kehittymisen myötä on kuitenkin saatu varmaa tietoa siitä, että RNA sisältää G4-rakenteita.⁶⁰ Koska G4-rakenteet ovat sekä DNA:ssa että RNA:ssa huomattavasti pysyvämpiä kuin hiusneulat, täytyy niiden muodostumista myös jotenkin hallita ja rajoittaa.⁶¹

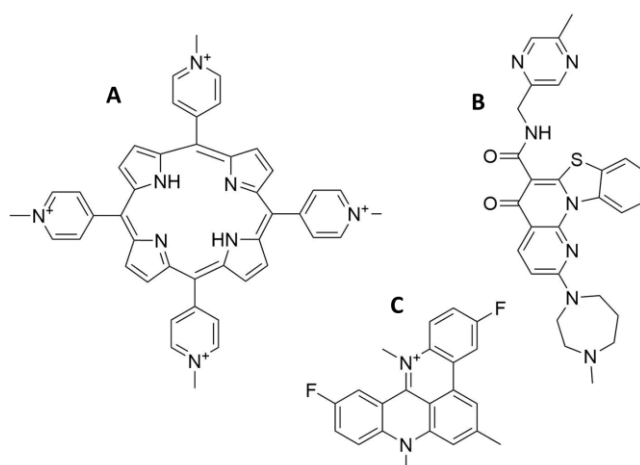
G-kvadruplekseiin sitoutuvien proteiinien tutkimus on vielä hyvin tuore ala, mutta useiden proteiinien on huomattu kontrolloivan G-kvadrupleksien muodostumista ja hajoamista. Nämä proteiinit on yhdistetty esimerkiksi neurologisiin sairauksiin, kuten amyotrofiseen lateraalikleroosiin (ALS)⁶²⁻⁶⁴ ja frontotemporaaliseen dementiaan (FTD)^{63,64}, sekä degeneratiivisiin sairauksiin kuten nivelreumaan⁶⁵ ja jälkeenjääneisyyttä aiheuttava Fragile-X (FraX)^{66,67} geneettiseen häiriöön, jonka aiheuttaa mRNA:n G4-rakenteet, jotka hiljentävät tärkeiden proteiinien translaatiota. Tästä tautien laajasta kirjosta johtuen G4-rakenteisiin sitoutuvat proteiinit (G4BP, G4 binding protein) ovatkin yksi mielenkiintoinen kohde uusille lääkeaineille ja hoidoille. Nämä proteiinit jaetaan kahteen eri ryhmään niiden toiminnan perusteella: G4-rakenteita muodostaviin proteiineihin ja G4-rakenteisiin sitoutuviin proteiineihin. Proteiinit kuten helikaasit^{68,69}, nukleolinit⁷⁰⁻⁷² ja saperonit⁷³ säätelevät kvadrupleksien muodostumista ja hajoitusta, jottei stabiili G4-rakenne häiritsisi muita DNA:han tai RNA:han sitoutuvia proteiineja ja niiden toimintaa. G4-rakenteisiin sitoutuvat proteiinit taas käyttävät jo muodostunutta kvadrupleksia sitoutumiskohteena vaikuttaen esimerkiksi DNA-replikaatioon tai RNA:n translaatioon.^{74,75} Nämä proteiinit toimivat usein biologisia prosesseja ohjaavina proteiineina, kuten transkriptiotekijänä (transcription factor, TF) tai BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein), joka ohjaa DNA:n korjausta.⁷⁶ Näiden proteiinien kohteentunnistamisen mekanismien selvittäminen on erittäin tärkeää, jos G4BP halutaan hyödyntää lääkkeiden kohteena. Näiden vuorovaikutusten selvittäminen on kuitenkin osoittautunut vaikeaksi, koska toisin kuin monilla muilla proteiineilla, joiden kohde on pysyvä ja helposti ennustettava, G4BP:n kohde voi olla joko normaalissa B-DNA muodossa, tai G4-rakenteena. Tämä G4-rakenteen luontainen väliaikaisuus vaikeuttaa

vuorovaikutusten tutkimista in vivo. Lisäksi G4-rakenteiden muodostumista in vivo on vaikea ennustaa. Kuten aikaisemmin mainittu, erilaisten G4-rakenteiden kirjo on myös suuri ja ne ovat hyvin dynaamisia. Lisäksi erona muihin DNA:han ja RNA:han sitoutuviin proteiineihin, joiden kohteentunnistus perustuu tietty sekvenssiin, G4-rakenteiden sekvenssi on hyvin homogeeninen, jolloin kohteentunnistus perustuu enemmän G4-rakenteen kolmiulotteiseen muotoon, vaikeuttaen niihin sitoutuvien proteiinien vuorovaikutuksen selvitystä.⁷⁷ Muita ongelmia ovat muun muassa proteiinien selektiivisyys ja erilaisten G4-rakenteiden erottelun spesifisyys toisistaan eli miten G4-proteiini erottaa halutun G4-rakenteen. Yhdessä kaikki edellä mainitut seikat, kuten G4-rakenteiden väliaikaisuus ja niihin vuorovaikuttavien entsyymien mekanismi, selektiivisyys ja spesifisyys, tekevät G4-rakenteista erittäin monimuotoisia ja proteiini vuorovaikutuksista vaikeita tutkia.

G4-proteiinien vuorovaikutusten havaitsemiseen ja karakterisointiin voidaan käyttää spektroskooppisia menetelmiä, kuten NMR-spektroskopiaa tai röntgenkristallografiaa.⁷⁸ Tarkempaan G4-G4BP-vuorovaikutusten mittaamiseen käytetään usein monimutkaisempaa ja työläämpää menetelmää, kuten kromatiinien immunosaostusta (ChIP).⁷⁹ G4BP-vuorovaikutusten tutkiminen suuren läpimenon seulonnalla (high throughput screening, HTS) on vielä puutteellista. Useat eri menetelmät kuten Försterin resonanssienergiansiirto (FRET) ovat tehokkaita, mutta ovat rajoittuneet käyttöön in vitro.⁸⁰ Kun taas in vivo HTS menetelmät, kuten ChIP, eivät kykene tunnistamaan, oliko sitoutumiskohta G4-muodossa vai normaalina kaksoiskiirteenä.⁷⁹ Tämä tarkoittaa että G4-G4BP-vuorovaikutusten tutkimisessa täytyy tukeutua moniin erilaisiin menetelmiin ja rakennekirjaston luominen on työlästä.

Kuten on aikaisemmin jo todettu, G-kvadrupleksit ovat rakenteina ainutlaatuisia ja hyvin monimuotoisia. Tämä sama malli jatkuu myös G4-rakenteisiin sitoutuvien ligandien osalta. G4 ligandit ovat joukko pienmolekyylejä, joiden rakenteelliset ominaisuudet mahdollistavat niiden spesifin vuorovaikutuksen G-kvadrupleksien kanssa normaalin DNA:n kaksoiskiirteen sijaan.⁸¹ G4-rakenteiden merkitys monien geneettisten toimintojen hallinnassa, sekä niiden yhteys moniin erilaisiin sairauksiin on herättänyt mielenkiintoa G4-rakenteisiin ligatoituvien pienmolekyyliden käytöstä hoitona tai apuna diagnostiikassa.^{63,64,67,82} Näitä pienmolekyylejä on tunnistettu tuhansia ja löydetyistä rakenteista on luotu tietokanta (www.G4ldb.com). Näitä pienmolekyylejä yhdistää yleisesti kolme päärakennetta, jotka mahdollistavat interaktion G4-rakenteiden kanssa: aromaattiset rengasrakenteet, positiiviset varaukset sekä useita vetysidoksia muodostavia ryhmiä, kuten fluori, amiini ja ketoni (Kuva 5). Samasta ligandista ei välttämättä löydy

kaikkia kolmea osarakenteita, mutta useat sisältävät kaikkia kolmea. Aromaattiset rakenteet, joko yksittäiset bentseenirenkaat tai suuremmat konjugoituneet rakenteet, mahdollistavat samantyyppisen π -pinoutumisen jolla G4-rakenteen kvartetit kasautuvat.⁸³ π - π -interaktiot ovat yleisiä biomolekyylien välillä. Aromaattiset rakenteet tekevät yhdisteestä lipofiilisemmän, parantaen erilaisten kalvojen, kuten soluseinämän tai veri-aivoesteen, läpäisevyyttä. Aromaattiset rakenteet kuitenkin sitoutuvat tehokkaasti verenkierrassa oleviin proteiineihin, mahdollisesti heikentäen aineen pääsyä tarkoitettuun kohteeseen. Positiiviset varaukset mahdollistavat pienmolekyylin interaktiot DNA- tai RNA-nauhan fosfaattien kanssa sekä mahdollistavat G-kvadrupleksia stabiloivan kationin korvaamisen. Positiivisesti varautuneet molekyylit omaavat korkean affiniteetin negatiivisesti varautuneisiin rakenteisiin, kuten solukalvoon ja proteiineihin. Tämä affiniteetti johtaa samoihin ongelmiin kuin aromaattisilla yhdisteillä, mutta varaukselliset molekyylit eivät läpäise veri-aivoestettä, tai muita kalvoja yhtä tehokkaasti. Vetysidoksia muodostavat ryhmät vuorovaikuttavat erityisesti guaniiniemästen kanssa, vahvistaen sitoutumista.⁸⁴ Nämä ligandit eivät kuitenkaan omaa suurta spesifisyyttä erilaisten G4-rakenteiden välillä ja kykenevät muuttamaan G4-rakenteen topologiaa sitoutumisen vahvistamiseksi.⁸⁵ G4-ligandien käyttöä terapeuttisina aineina voitaisiin tehostaa kehittämällä niille sopiva kuljetin, jolla saataisiin pienmolekyyli selektiivisemmin haluttuun kohteeseen. Kuljettimen käyttö vapauttaisi myös ligandien suunnittelua, kun rakenteen mahdollisia haittoja voitaisiin lieventää.



Kuva 5. G4 ligandeja; TMPyP4 (A), Pidnarulex (B), RHSP4 (C)

Kuljettamisen lisäksi G4-ligandien käytössä lääketieteessä on toinen, vaikeampi haaste: ligandien huono spesifisyys eri G4-rakenteiden välillä. Vaikka nämä ligandit omaavat hyvän selektiivisyyden G4-rakenteille, verrattaessa normaaliin B-DNA:n kaksoiskierteeseen, niiden spesifisyys erilaisten G4-rakenteiden välillä on huono.⁸⁶ Tämä johtuu siitä, että G4-rakenteet ovat keskenään hyvin samanlaisia, joka vaikeuttaa

lääkeaineen kohdentamista tiettyyn geeniin muodostuvaan G4-rakenteen. Spesifisyyden puuttuminen taas voi johtaa vakaviin sivuvaikutuksiin. Tietyillä ligandeilla on havaittu olevan jonkin asteista selektiivisyyttä G4-rakenteeseen sitoutumisen kanssa, mutta tämä ei päde yleisesti kaikkiin ligandeihin.⁸⁷ G4-rakenteen adaptiivisuus ja kyky muuttaa topologiaansa ligandille sopivammaksi aiheuttaa suuren haasteen näiden pienmolekyylien selektiivisyyden osalta. Juuri tämä adaptiivisuus vaikeuttaa vaikutuksen kohdentamista tiettyyn G4-rakenteeseen, sillä toinen G4-rakenne muualla genomissa tai erillinen RNA:han muodostunut G4 voisi sitoa ligandin tarkoitetun kohteen sijaan.⁸⁸ Erona proteiineihin verrattaessa on toisaalta se, että pienmolekyylien tapauksessa vuorovaikutusten ja tehokkaiden rakenteiden selvittäminen on helpompaa, sillä pienmolekyyliellä on useita G4-ligandeille tarkoitettuja suuren läpimenoseulontaan perustuvia menetelmiä kuten interkalaattorin syrjäyttämiseen perustuva G4-FID (G4-fluorescence intercalator displacement). G4-FID perustuu pienmolekyylin syrjäyttämän interkaloituvan aineen fluoresenssin hiljentämiseen.⁸⁹ Lisäksi pienmolekyylielle on helpompi tehdä rakenne-reaktiivisuustutkimuksia ja sitä kautta luoda suuri kirjasto erilaisista rakenteiden osista.⁸⁸

Edellä mainittujen haasteiden takia vain yksi G4-ligandi, fluorokinoloni-johdannainen CX-3543 (Quarfloxin), on aikaisemmin edennyt faasi II tutkimusvaiheeseen, mutta vedettiin pois tutkimuksen jälkeen heikosta imeytymisestä johtuneen huonon tehokkuuden takia.⁹⁰ Tutkimusta on tämän jälkeen jatkettu paljon Quarfloxin-johdannaisilla. Tällä hetkellä lupaavimmalta lääkkeeltä näyttää CX-5461 (Pidnarulex). Federal drug administration (FDA) myönsi Pidnarulexille ”Fast track designation” rintaja munasarjasyöpään onnistuneen faasi Ia testivaiheen jälkeen.⁹¹ Nopeutettu status myönnettiin tammikuussa 2022 ja faasi Ia tulokset julkaistiin Nature-lehdessä viisi kuukautta myöhemmin.⁹² Faasi I tutkimuksessa Pidnarulex aiheutti kohtalaisen syöpäsolujen vastaisen vasteen ilman merkittäviä sivuvaikutuksia tai yleistä solutoksisuutta.⁹² Faasi Ib tutkimukset ovat tällä hetkellä käynnissä ja niiden on suunniteltu valmistuvan kesäkuussa 2024. Pidnarulex toimii samalla tavalla kuin monet muutkin G4-ligandit, stabiloiden DNA replikaation aikana yksijuosteiseen nauhaan muodostuvan G4-rakenteen, pysäyttäen replikaation, aiheuttaen DNA:n rikkoutumisen ja solukuoleman.

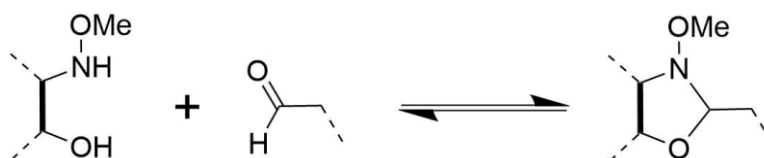
1.3 Happolabiili linkkeri

Tehokkaan lääkkeen kehittäminen tiettyä tautia vastaan on vasta ensimmäinen askel lääkekehityksessä. Tämän jälkeen täytyy kehittää tapa saada lääke haluttuun kohteeseen ja pitää mahdolliset sivuvaikutukset mahdollisimman lievinä. Tästä syystä herkät tai hyvin myrkylliset lääkeaineet ovat usein konjugoituneena toiseen rakenteeseen. Kaksi hyvää esimerkkiä näistä ovat terapeuttiset oligonukleotidit ja sytostaatit. Oligonukleotidit eivät sellaisenaan ole pitkäikäisiä verenkierrassa nukleaasien pilkkomisen takia.⁹³ Tästä syystä niiden rakennetta pitää muokata esimerkiksi fosforotioaatiksi. Lisäksi niiden kuljetinominaisuuksien parantamiseksi käytetään nanopartikkeleita sekä kudospesifisiä ligandeja. Sytostaatit ovat tehokkaita lääkkeitä, jotka tappavat tai herkistävät säteilylle nopeasti jakautuvia soluja, kuten syöpäsoluja. Ne eivät kuitenkaan ole kovin spesifisiä ja aiheuttavat paljon sivuvaikutuksia terveille soluille.^{94,95} Sytostaatit ovat myös annostukseltaan hyvin rajoitettuja niiden korkean toksisuuden takia.⁹⁶ Ratkaisuna näihin ongelmiin on kehitetty vasta-aine-lääke-konjugaatteja (ADC-läkkeitä), joissa terapeuttinen aine on liitetty vasta-aineeseen, joka ohjaa lääkeaineen kulkeutumista, vähentää ”off-target -vaikutuksia”, suojelee lääkeainetta estämällä pienmolekyylisiin kohdistuvan metabolian ja parantaa soluunottoa.^{97,98} Tämä kuitenkin tuo esiin uuden ongelman; miten terapeuttinen aine saadaan ligatoitua riittävän pysyvästi keskusrakenteeseen, mutta vapautettua, kun se on saatu halutulle alueelle?

Lääkeaineen ja sitä ohjaavan makromolekyylin välisellä linkkerillä tulisi olla kolme pääominaisuutta: sen tulisi olla stabiili verenkierrassa, hajota vain tietyissä olosuhteissa ja niiden tulisi toimia useiden erilaisten lääkeaineiden kanssa.⁹⁹ Muita edullisia ominaisuuksia linkkerille ovat yksinkertainen synteesi, yksinkertainen ja automatisoitava ligaatio ja biohajoavat metaboliatuotteet.¹⁰⁰ Verrattaessa pilkkottavia ja pilkkoutumattomia linkkereitä, pilkkoutumattomien linkkereiden toiminta perustuu vasta-aineen hajoamiseen. Tämän takia lääkeaineen vapautumisen prosessi muuttaa lääkeaineen rakennetta, vaikuttaen samalla sen tehokkuuteen. Tämän lisäksi pilkkoutumattomien linkkereiden käyttö on rajoittunut vain tiettyihin, niille sopiviin lääkeaineisiin.¹⁰¹ Toisaalta pilkkoutuvat linkkerit toimivat monien erilaisten rakenteiden kanssa, eikä linkkerin rakenne vaikuta vapautuvan lääkeaineen tehokkuuteen.

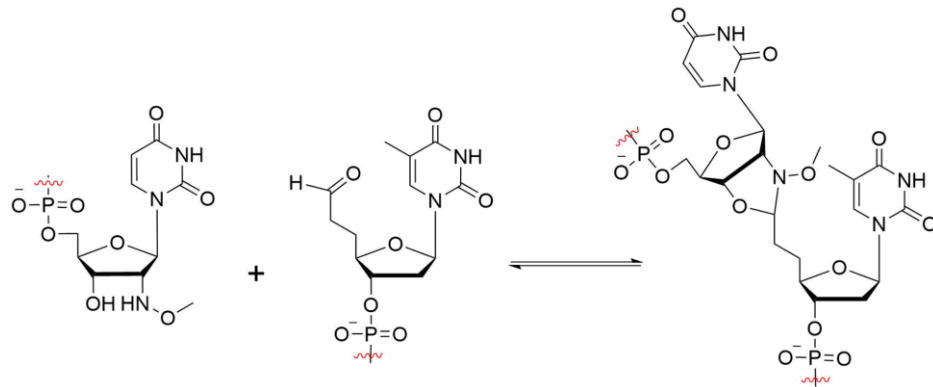
Happolabiilit linkkerit kuuluvat pilkkoutuviin linkkereihin. Yleisesti nämä rakenteet ovat stabiileja verenkierrassa (pH = 7.4¹⁰²), mutta hydrolysoituvat jo lievästi happamassa ympäristössä. Tämä happolabiilius hyödyntää lääkeaineen vapautuksessa solun aktiivista sisäänottoa, endosytoosia. Endosytoosin aikana pH laskee ensin

ensodommassa (pH = 5–6¹⁰³) ja endosomin muuttuessa lysosomiksi (pH = 4.8¹⁰⁴). Koska hydrolyysi perustuu puhtaasti vain ympäröiviin olosuhteisiin, on näillä linkkereillä ongelmia lähinnä spesifisyyden kanssa verrattaessa pilkkoutumattomiin linkkereihiin¹⁰⁵ tai entsyymaattisiin linkkereihiin¹⁰⁶. Tämä puhtaasti kemiallinen pilkkoutuminen voi tapahtua missä tahansa muuallakin kuin kohteessa. Ainoa vaatimus on hydrolyysiin tarvittavat olosuhteet. Entsyymaattisesti pilkkottava linkkeri voidaan suunnitella toimimaan vain tietyllä entsyymillä, esimerkiksi kasvaimessa yli-ilmennetyllä entsyymillä, parantaen lääkeaineen vapautumisen tarkkuutta ja vähentäen sivuvaikutuksia. Käytetyimpiä esimerkkejä happolabiileista linkkereistä ovat hydratsonit^{107–109}, oksiimit^{110,111} tai ortoesterit^{112,113}. Viimeaikoina on kehitetty myös uusia linkkereitä, kuten dimetoksibenzaldehydiasetaali¹¹⁴ ja tässä tutkimuksessa käytetty *N*-metoksioksaatsolidiini (Kaavio 1.).^{115–117}



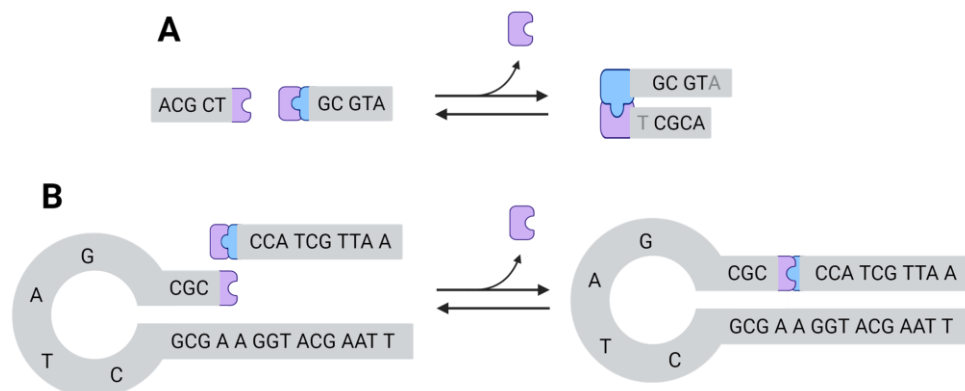
Kaavio 1. *N*-metoksioksaatsolidiinin muodostus. Reaktioon tarvitaan kolme osaa; aldehydi, sekundäärinen amiini sekä β -hydroksyyli.

Oksaatsolidiinien perusrakenne on heteroatominen viisijäseninen rengas, joka koostuu hiilestä, yhdestä tyypestä ja yhdestä hapesta. *N*-metoksioksaatsolidiinissa on vielä lisänä metoksiyhmä kiinnitettynä renkaassa olevaan tyypeen. Oksaatsolidiinit syntyvät aminoetanolin ja aldehydin välisellä kondensaatioreaktiolla.¹¹⁵ Tästä muodostuu raseeminen seos oksaatsolidiinin *R*- ja *S*-isomeerejä. *N*-metoksioksaatsolidiinissa ainoa ero on, että α -aseman tyyppi ei ole primäärinen, vaan siinä on kiinni metoksiyhmä. Reaktion alku on samanlainen kuin neoglykosylaatioissa, kun α -nukleofiili hyökkää aldehydin karbonyylihiileen muodostaen hemiaminaali-välituotteen. Tämän jälkeen välituotteesta lohkeaa vesi. Oksaatsolidiinissa β -hydroksyyliyhmä tekee muodostuneeseen imiiniumvälivaiheeseen molekyylin sisäisen nukleofiilisen hyökkäyksen. Tuloksena muodostuu tällöin *R*- ja *S*-isomeerien seos. *N*-metoksioksaatsolidiinin muodostuminen on reversiibeli ja pH-riippuvainen reaktio.¹¹⁸ Johtuen α -nukleofiilisen oksiamiinin nukleofiilisyydestä ja alhaisemmasta emäksisyydestä, verrattuna amiineihin, *N*-metoksioksaatsolidiinit muodostuvat lievästi happamissa olosuhteissa (Kaavio 2.).¹¹⁸



Kaavio 2. Tutkimuksessa käytettyjen modifioitujen oligonukleotidien ligaatioreaktio.

pH:n lisäksi lisäksi käytettävän aldehydin rakenne vaikuttaa reaktion nopeuteen.¹¹⁸ Yksinkertaisissa pienmolekyyleillä tehdyissä kokeissa havaittiin reaktion suosivan erityisesti alifaattisia aldehydejä.¹¹⁸ Sama riippuvuus havaittiin myös oligonukleotidien ja polypeptidien välisessä konjugaatiossa.¹¹⁶ Yksi tapa suojata oligonukleotidissa oleva aldehydi on muodostaa siitä *N*-metoksioksatsolidiini, joka poistetaan ennen reaktiota in situ. Vertailemalla suojatun ja suojaamattoman aldehydimodifoidun oligonukleotidin ligaatiota huomattiin suojaamattoman oligonukleotidin ligatoituvan kuusi kertaa nopeammin kuin suojattu, mutta reaktio suojaamattomalla aldehydillä johti myös sivureaktioihin.¹¹⁹ Oligonukleotidien konjugointia *N*-metoksioksatsolidiinilla on aikaisemmin tutkittu DNA templatoidulla ligaatiolla käyttäen toisilleen komplementaaraisia sekvenssejä jotka muodostivat hiusneulamaista DNA:ta (Kuva 6).¹¹⁹ Pienemmän DNA-hiusneulan ligaatiossa saavutettiin reaktion puoliväli 106 tunnissa ja reaktion lopullinen saanto oli 53% (pH 5,0 ja 22°C, Kuva 6. **A**). Vastaavassa reaktiossa pidemmällä hiusneulamaisella oligonukleotidilla reaktion puoliväli saavutettiin vasta 118 tunnin kohdalla ja saannoksi saatiin 49% (Kuva 6. **B**). Eli suuremmalla komplementaarisella rakenteella ei ollut merkitystä reaktionopeuden eikä reaktion tasapainon kannalta.¹¹⁹



Kuva 6. Aho et. al.¹¹⁹ tutkimuksessa käytetyt oligonukleotidimallit. **A** Kahden suoran oligonukleotidin *N*-metoksioksatsolidiiniligaatio ja siitä seuraava pieni hiusneulamainen rakenne. **B** Suuremman hiusneulamaisen oligonukleotidin ja sille komplementaarisen juosteen ligaatio.

1.4 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli tutkia G-kvadrupleksin itsejärjestäytymisen seurauksena tapahtuvaa *N*-metoksioksatsolidiiniligaatiota. Tutkimus aloitettiin selvittämällä tapahtuuko *N*-metoksioksatsolidiiniligaatio kahden oligonukleotidin välille G-kvadrupleksin itsejärjestäytymisen seurauksena ja millaisia vaikutuksia reaktioolosuhteilla on reaktioon. Kun ligaatio todettiin toimivaksi, mitattiin reaktion nopeutta vaihtelevissa kaliumin konsentraatioissa. Lopuksi varmistettiin vielä, että rakenne on G-kvadrupleksi vaikka sekvenssissä olisi *N*-metoksioksatsolidiinilinkkeri. Tutkimusryhmässämme on jo aikaisemmin tehty tutkimusta *N*-metoksioksatsolidiiniligaation käytöstä erilaisten biomolekyylien välissä, kuten oligonukleotidien ja polypeptidien¹¹⁸ välissä sekä DNA-templatoidussa synteesissä.¹¹⁹ Tälle työlle tärkeimpänä esimerkkinä tutkimusryhmän aikaisemmasta tutkimuksesta on *N*-metoksioksatsolidiiniligaation tutkiminen pätäkityn aptameerin itsejärjestäytymisen seurauksena.¹¹⁷ Siinä muodostettiin aptameeri kahdesta tai kolmesta oligonukleotidin pätäkstä, joissa oli päädyssä *N*-metoksioksatsolidiiniligaatioon tarvittavat ryhmät, eli aldehydi ja *N*-metoksi-2-aminoetanoli (osana *N*-metoksi-2'-amino-2'-deoksiuridiinia).

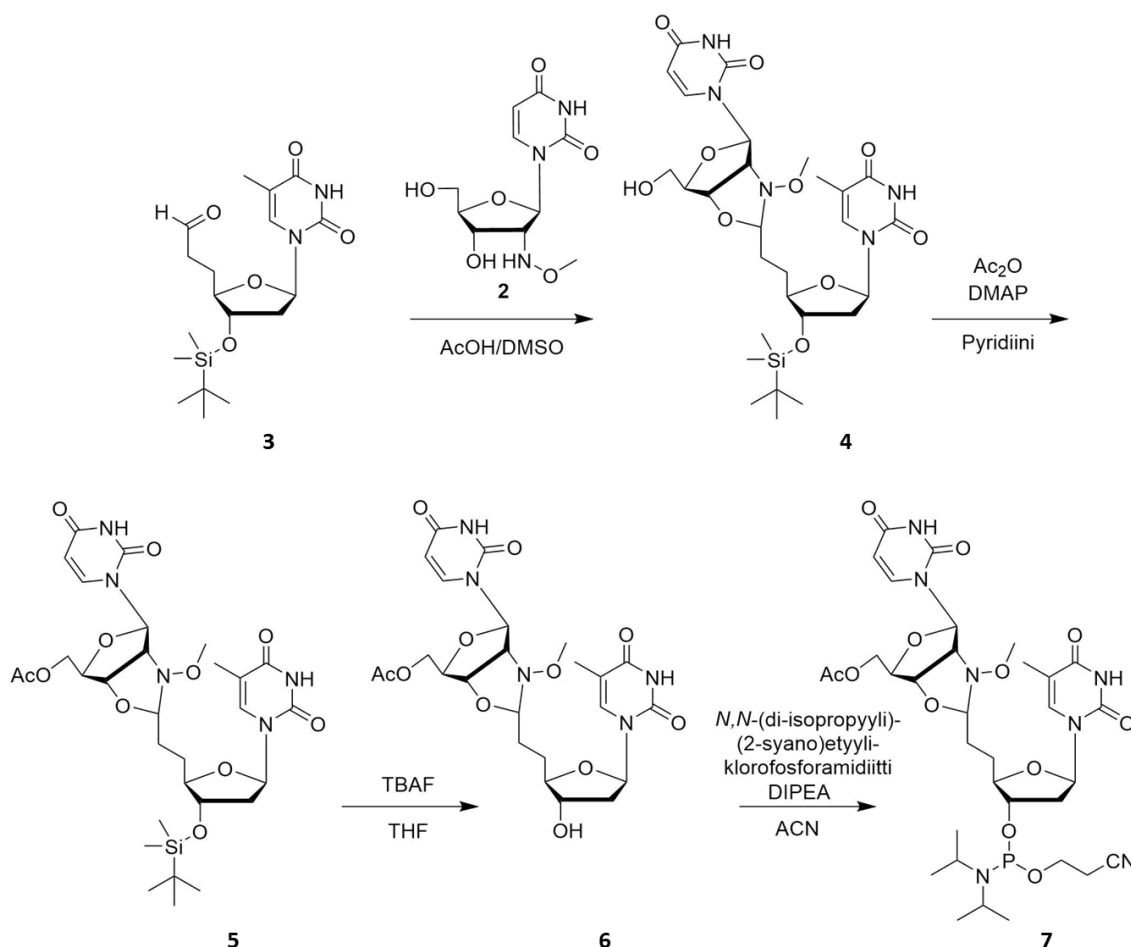
Tässä työssä käytettiin *N*-metoksioksatsolidiiniligaation kohteena G-kvadrupleksia. G-kvadrupleksit ovat paljon tutkittu kohde syöpätutkimuksessa, koska 85% kaikista tunnistetuista syöpätyypeistä yli-ilmentää telomeraasia¹²⁰, joka tuottaa tässäkin tutkimuksessa käytettyä G4-rakenteita muodostavaa sekvenssiä.¹²¹ Tähän työhön valittiin telomeraalinen G4-rakenne, koska sen tiedetään muodostavan päätuotteena hybridi-2 mallin G4-rakenteita. Tietyillä pienmolekyyleillä on havaitu olevan kyky luontaisesti sitoutua G4-rakenteisiin. Näitä pienmolekyylejä sanotaan G4-ligandeiksi. Nämä ovat molekyylejä, jotka luonnostaan sitoutuvat G4-rakenteisiin joko rakenteen pinnalle tai sen sisälle.¹²² Osalla näistä ligandeista on tunnistettu olevan terapeuttisia vaikutuksia erityyppisiin vaikeasti hoidettaviin syöpiin. Esimerkiksi RHPS4, joka herkistää säteilyresistantin glioblastooman ionisoivalle säteilylle¹²³ tai TMPyP4, joka riittävän korkeissa pitoisuuksissa vähentää etäpesäkkeiden muodostumista ja aiheuttaa solukuolemaa.¹²⁴ Näiden aineiden käyttö lääkkeenä on kuitenkin hyvin vaikeata ilman muokkauksia, sillä ne omaavat yleisesti huonot farmakokineettiset ominaisuudet. Esimerkiksi aikaisemmin mainittu Quarfloxin oli tehokas terapeuttinen aine, mutta se vedettiin tutkimuksista huonon imeytymisen takia. G4-rakenteet voisivat ratkaista tällaiset ongelmat ja toimia luontaisena kuljettimena näille aineille. Kuljettimena muokkaamaton G-kvadrupleksi on kuitenkin liian stabiili rakenne, eikä sen kuljettaman aineen vapautusta voitaisi hallita tehokkaasti. Tässä työssä rakenteeseen lisätty

happolabiili linkkeri mahdollistaisi G4-rakenteen selektiivisen pilkkomisen endosomissa, vapauttaen ligandit rakenteesta. G4-kompleksin voisi vastaavasti liittää vasta-aineeseen muodostaen ADC:n. Tämän ligaation ei tarvitsisi olla happolabiili, koska G4-rakenteen hajoaminen jo vapauttaisi lääkeaineen.

Muita reversiibelin G4-rakenteen käyttökohteita voisivat olla kuvantaminen, biosensorit ja nanoteknologia. Sytosiinista koostuvan I-muotoisen DNA:n tapaan G4-rakenteita voitaisiin käyttää kuvantamisessa. Tekniikka perustuu FRET-kuvantamisen ja ympäristön aikaansaamaan muutokseen rakenteessa. G4-rakenne, jonka päissä ovat fluorofori ja hiljentäjä tulisivat toistensa lähelle G4-rakenteen muodostuessa, hiljentäen signaalia.¹²⁵ Tällä voitaisiin mitata esimerkiksi pH:ta, kun tiedettäisiin ympäristön kationikonsentraatio, tai kationin määrää tietyssä pH:ssa. Vastaavasti *N*-metoksioksatsolidiiniligaation reversiibeli luonne mahdollistaisi mittauksissa käytettävien aineiden uudelleenkäytön, mikäli ne on mahdollista erottaa analyytistä. Samalla periaatteella tällaista reversiibeliä ja herkkää reaktiota voitaisiin hyödyntää nanoteknologiassa liikkeen suorittamiseksi ulkoisen ärsykkeen seurauksena.¹⁸ Päistään toiseen rakenteeseen kiinnitetyt oligonukleotidit voisivat muodostaa G4-rakenteen ja tätä kautta vetää oligonukleotidin päät ja niihin kiinnitetyt rakenteet lähemmäs toisiaan. Reversiibeli reaktio mahdollistaisi myös rakenteen käytön pH:n ohjaamana molekyyli-moottorina, missä syklinen pH:n muutoksen avulla voitaisiin saada aikaan jatkuvaa liikettä.¹²⁵

2 Tulokset ja niiden tarkastelu

2.1 Aldehydiprekursorin valmistus

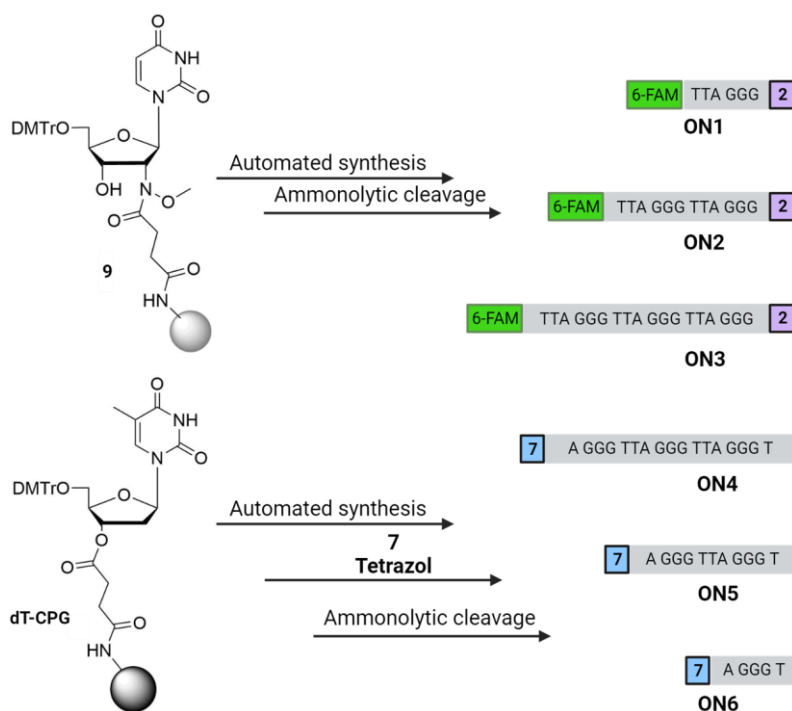


Kaavio 3. Tutkimuksessa käytetyn aldehydiprekursorin synteesikaavio. Lähtöaineet **2** ja **3** olivat aikaisemmin syntetisoituja.

Tutkimus aloitettiin valmistamalla oligonukleotidisynteesiin soveltuva aldehydiprekursori (**7**) yllä olevan kaavion mukaisesti (Kaavio 3.). Lähtöaineena käytettiin aikaisemmin syntetisoituja 5'-asetaldehydi-3'-tert-butyylidimetyylisilylytimidiiniä (**3**¹²⁶) sekä 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamiini)-uridiinia (**2**¹²⁷). Tymidiinin 5'-aldehydi suojattiin muodostamalla *N*-metoksioksatsolidiinilla kondensoiden se nukleosidi **2**:n kanssa. Muodostuneen tuotteen (**4**) saannoksi saatiin 58%. Seuraavaksi tuotteen **4** 5'-hydroksyyli-ryhmä asetyloitiin, jotta viimeisessä vaiheessa fosfitylointi tapahtuisi selektiivisesti 3'-OH-ryhmään. Seuraavaksi välituotteen **5** 3'-OH-ryhmässä ollut TBDMS-suojaryhmä poistettiin. Reaktiossa muodostui tuotetta **6** 51%:n saannolla. Lopuksi yhdiste **6** fosfityloitiin, jolloin saatiin oligonukleotidisynteesissä toimiva fosforamidiitti **7**. Tuote **6** liuotettiin kuivaan asetonitriiliin ja joukkoon lisättiin [(2-syanoetyyli)-(*N,N*-di-isopropyyli)]klorofosforamidiittiä ja DIPEA:a. Reaktio

lopputuote **7** oli kellertävä öljy. Lopputuote karakterisoitiin NMR-spektroskopiolla ja massaspektroskooppisesti ja sen saannoksi saatiin 55%.

2.2 Oligonukleotidien synteesi



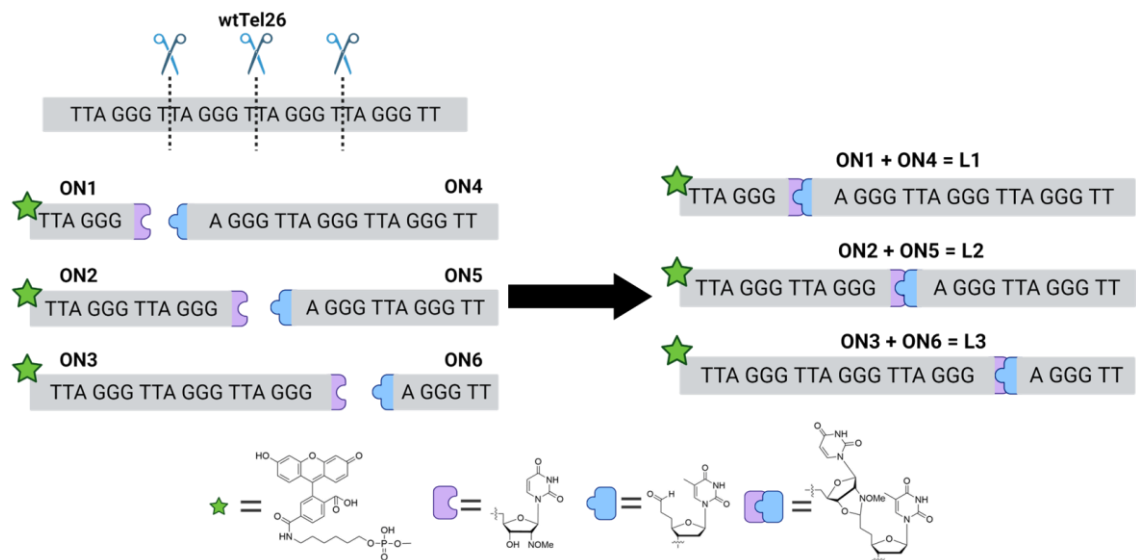
Kuva 7. Oligonukleotidit **ON1**, **ON2** ja **ON3** valmistettiin automaattisella oligonukleotidisyntetisaattorilla käyttäen kiinteää kantajaa **9**. Oligonukleotidit **ON4**, **ON5** ja **ON6** valmistettiin myös automaattisella oligonukleotidisyntetisaattorilla kaupallisesta kiinteästä kantajasta, jonka jälkeen oligonukleotidiin liitettiin manuaalisesti aldehydiprekursori **7**. Tämän jälkeen kaikki oligonukleotidit irrotettiin kiinteästä kantajastaan väkevällä ammoniakkin vesiliuoksella (55° C 18h).

Oligonukleotidit **ON1** - **ON6** (Kuva 7.) syntetisoitiin käyttäen kaupallisia DNA-fosforamidiittiyksiköitä, aldehydiprekursoria **7** ja kiinteää kantajaa **9** sekä kaupallista dT-CPG kiinteää kantajaa. Oligonukleotidit **ON1** – **ON3** syntetisoitiin 1 µmol skaalassa, käyttäen kiinteää kantajaa **9** (Kuva 7.). Sekvenssin 5'-päähän liitettiin 6-karboksyfluoreseeni-leima (6-FAM). Leiman liittämässä käytettiin pidempää kytentäaika nukleosideihin verrattuna paremman saannon saavuttamiseksi. Oligonukleotidien **ON1**, **ON2** ja **ON3** synteesien onnistuminen varmistettiin massaspektrometrisesti ja saannot määritettiin UV-spektrofotometrillä. (**ON1** = 10%, **ON2** = 16% ja **ON3** = 10%).

Oligonukleotidit **ON4**, **ON5** ja **ON6** syntetisoitiin 1 µmol skaalassa käyttäen kaupallista dT-CPG kantajaa (Kuva 7.) sekä kaupallisia DNA-fosforamidiittiyksiköitä. Koska synteesiä jatkettiin vielä yhdellä manuaalisella liittännällä, automaattisen syntetisaattorin ohjelma päätettiin detritylaatioon. Synteesin jälkeen oligonukleotideihin liitettiin aldehydiprekursori **7** manuaalisesti. Valmiit oligonukleotidit irrotettiin

kantajasta väkevällä ammoniakkin vesiliuoksella inkuboimalla liuoksia 55 °C:ssa 18 tuntia. Raakatuotteet puhdistettiin RP-HPLC:llä. Oligonukleotidien **ON4**, **ON5** ja **ON6** synteesien onnistuminen varmistettiin massaspektrometrisesti ja saannot mitattiin UV-spektrofotometrillä. (**ON4** = 2,6%, **ON5** = 2,7% ja **ON6** = 5,7%).

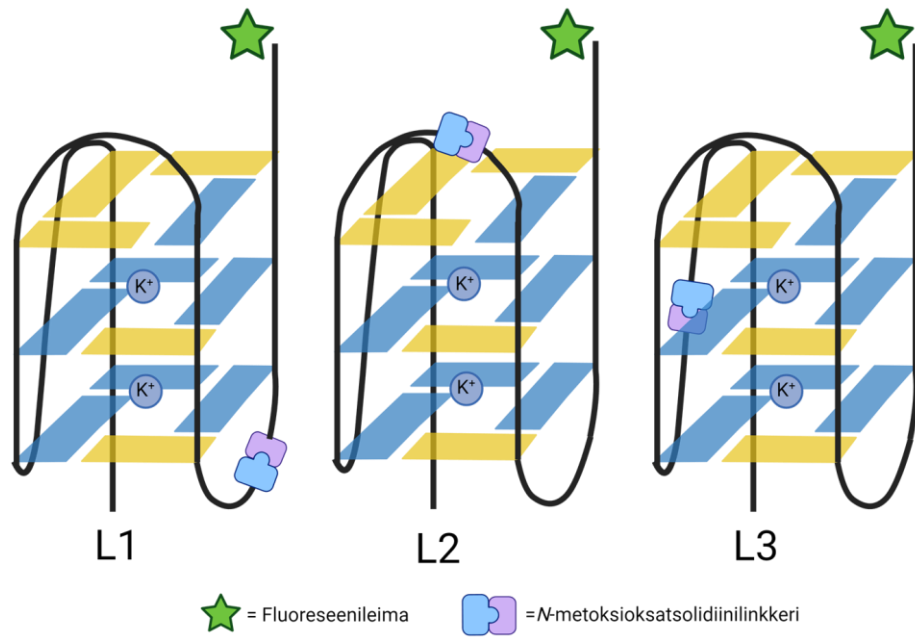
Tutkimuksessa käytetty wtTel26-sekvenssin tiedetään muodostavan käytännössä pelkästään hybridi-2 mallin G4-rakenteita.¹²⁸ Valmistetut oligonukleotidit edustivat osia wtTel26-sekvenssistä, joissa ligaation paikkaa vaihdeltiin Kuvan 8 mukaisesti.



Kuva 8. Tutkimuksessa käytettiin DNA:n telomeereistä löytyvää geeniä wtTel26, koska tämän tiedetään pääasiassa muodostavan hybridi-2 -mallin G-kvadrupleksin.⁴⁸ 26 nukleotidiä pitkä sekvenssi katkaistiin kolmesta kohdasta ja katkaisukohtiin lisättiin aikaisemmin valmistetut muokatut nukleosidit, jolloin saatiin kolme eri mallia ja kuusi eri syntetisoitavaa oligonukleotidia. Kaikki kolme mallia sisälsivät 6-FAM fluoroskeenileiman 5'-päässä.

2.3 Kineettiset mallit

Oligonukleotideista **ON1** – **ON6** muodostui ligaatio kautta pareittain täysi wtTel26 sekvenssi, joka hybridisoitui hybridi-2-malliseksi G4-rakenteeksi. Mallit **L1**, **L2** ja **L3** olivat valittu niin, että ligaatiokohta osuisi hybridi-2 G4-rakenteen kolmeen eri silmukkaan. Mallien **L1** ja **L2** ligaatiokohta osui kauemmas kvarteteista, niitä yhdistäviin silmukoihin (Kuva 9.). Mallilla **L3** ligaatiokohta ei ollut silmukassa, vaan kvartettien vieressä. Reaktioiden tasapainosta nähtiin, että ligaation kohdalla oli paljon vaikutusta lopputuotteen muodostumisen kannalta. Mallien **L1** ja **L2** ligaatioreaktioiden tasapaino olivat huomattavasti enemmän tuotteiden puolella, verrattuna malliin **L3**. Tämä viittaisi mallin **L3** kvartettien vieressä olevan ligaatiokohdan olevan estynyt, vaikuttaen ligaation tehokkuuteen.



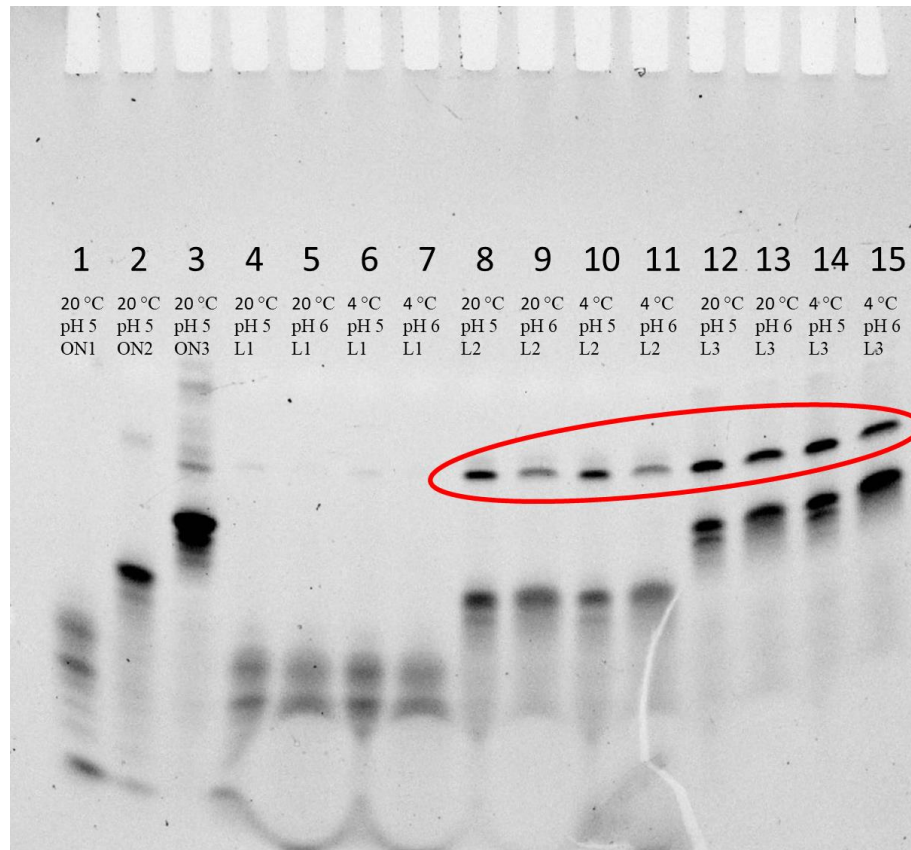
Kuva 9. Mallien L1, L2 ja L3 muodostamat hybridi-2 mallin G-kvadrupleksit ja niiden *N*-metoksioksatsolidiinilinkkerin sijainti. Malleissa L1 ja L2 linkkeri sijoittuu G-kvadrupleksin looppiin, mutta mallissa L3 linkkeri sijaitsee pinoutuneiden guaniinien vieressä. Tämä sijainti heikentää ligaation muodostumista.

2.4 Osoitusreaktiot

Koska reaktion toimivuudesta ei ollut varmuutta, aloitettiin G-kvadrupleksien muodostaminen kvalitatiivisilla reaktioilla. Kaikki reaktiot tehtiin suhteellisen laimeassa 1 μM oligonukleotidien konsentraatiossa. Laimea konsentraatio valittiin ei-templatoidun reaktion välttämiseksi.¹¹⁷ Alustavissa reaktioissa oli tarkoitus myös tutkia, vaikuttavatko reaktion olosuhteet, kuten pH ja lämpötila, reaktion nopeuteen tai tasapainoon.

Yhteen reaktioon laitettiin kahta oligonukleotidiä (kumpaakin 1 μM), KCl-vesiliuosta (100 mM) sekä pH 5 AcOH-liuosta. Tämän jälkeen reaktiota inkuboitettiin 55 °C uunissa yön yli, jotta aldehydissä ollut *N*-metoksioksatsolidiinisuojaus saatiin purettua. Välittömästi aldehydin vapautuksen jälkeen varmistettiin, ettei ligaatiota ollut tässä kohtaa tapahtunut. Näytteisiin lisättiin tämän jälkeen puskurit (50 mM, pH 5.0). Reaktion tilavuus oli 250 μl . Reaktion etenemistä seurattiin denaturoivalla geelielektroforeesilla. Geeli elektroforeesia varten reaktioliuoksesta otettiin 5 μl näyte, jonka reaktio pysäytettiin lisäämällä emäksistä Novex TBE Urea 2x puskuria 7,5 μl . Geelistä otetut kuvat käsiteltiin ImageJ-ohjelmalla. Geelillä havaitaan selkeä ligaatiotuotteiden L2 ja L3 muodostuminen (Kuva 10.). Vertaamalla ligaatiotuotteen ja lähtöaineen täplien voimakkuutta toisiinsa saatiin reaktioista saantoprosentit. Mallissa L1 oli toisessa tai molemmissa oligonukleotideissa jokin ongelma, eikä tuotetta tämän takia ollut muodostunut ollenkaan. Onnistuneen osoitusreaktion jälkeen syntetisoitiin ON1

uudestaan. Lisäksi **ON2** – **ON6** RP-HPLC puhdistus toistettiin ennen niiden käyttöä uudestaan.

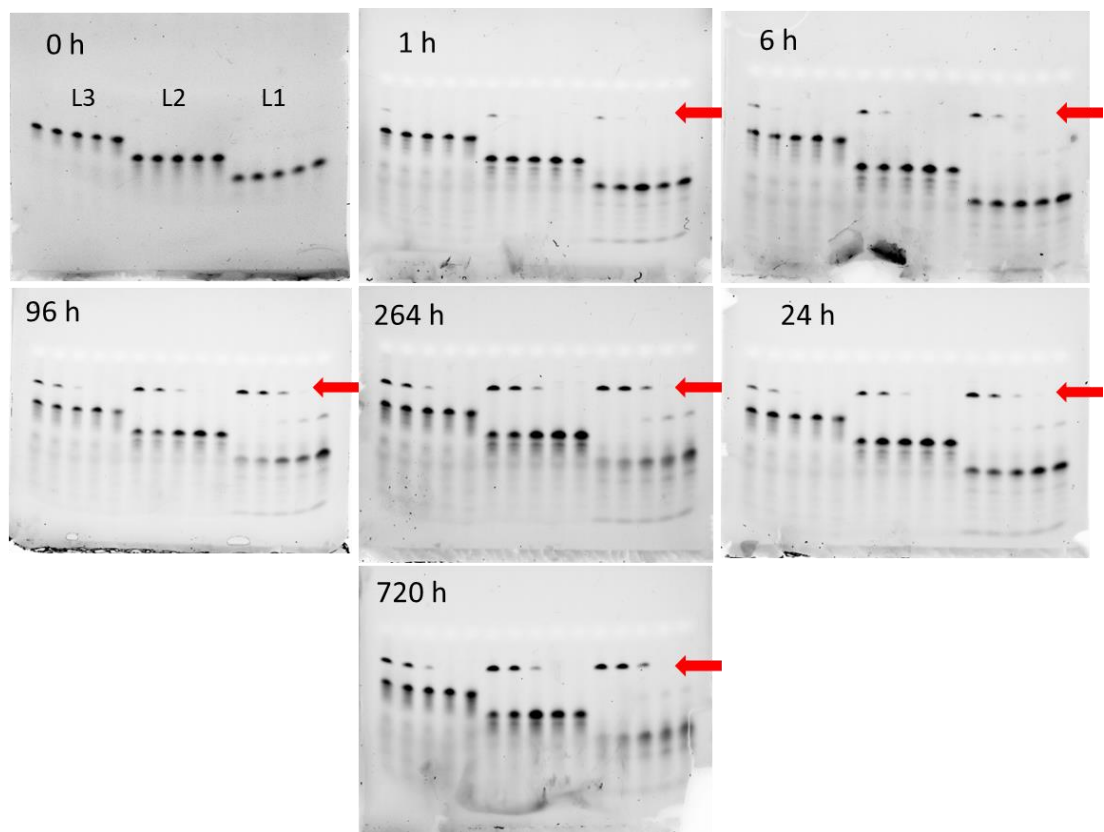


Kuva 10. Ensimmäinen onnistunut G-kvadrupleksin muodostumisen ajama *N*-metoksioksatsolidiiniligaatio. 1 – 3 ovat referenssejä, jotka sisältävät pelkästään **ON1**, **ON2** ja **ON3**. 4 – 7 ovat malli **L1**, 8 – 11 ovat malli **L2** ja 12 – 15 malli **L3**. Reaktio olosuhteet on merkitty kuvaan jokaiselle näytteelle. Geelillä nähdään selkeä täplä malleissa **L2** ja **L3** punaisella ympyröitynä, joka edustaa kahta ligatoitunutta oligonukleotidia. **L1** muodosti tuotetta vain vähän kontaminoituneen oligonukleotidin takia.

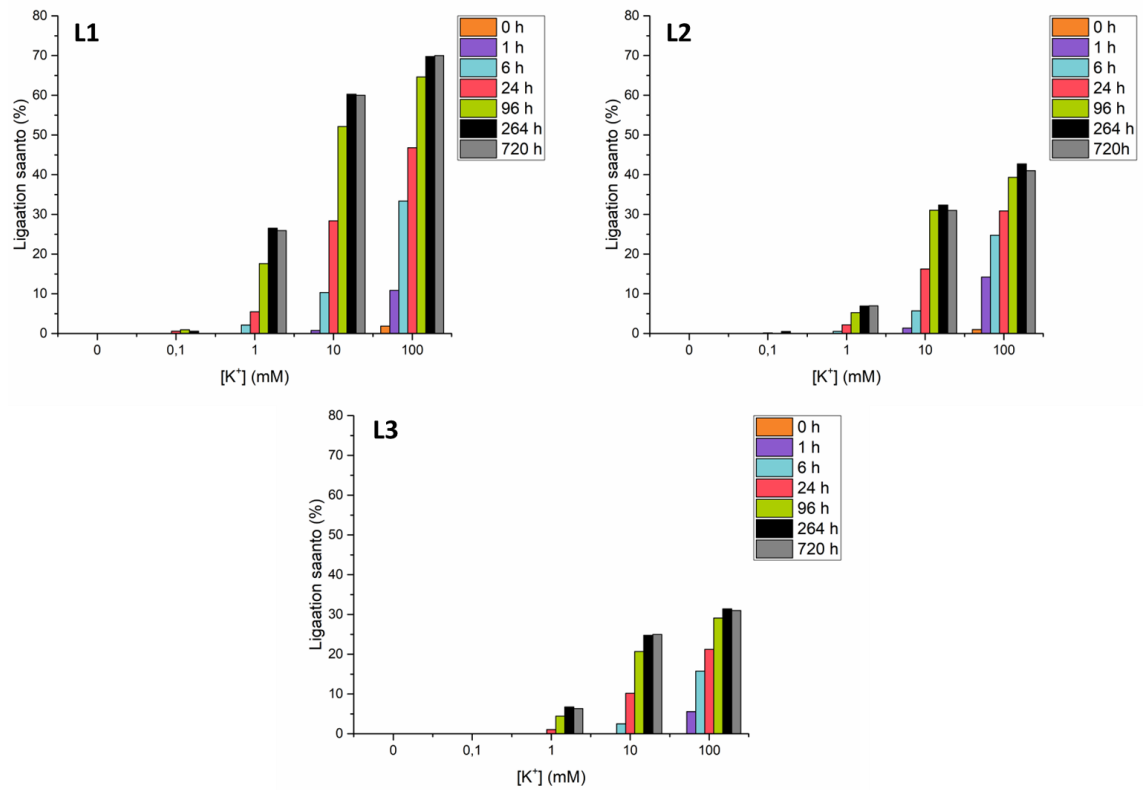
2.5 Kaliumionista riippuvainen reaktiokinetiikka

Tutkimuksen ensimmäisen onnistuneen ligaation jälkeen siirryimme selvittämään reaktion riippuvuutta kalium-ionin konsentraatiosta. Hypoteesin mukaan *N*-metoksioksatsolidiiniligaatio ei pääse tapahtuman ilman, että G-kvadrupleksi muodostuu edes osittain ensin ja G-kvadrupleksin muodostuminen on riippuvainen koordinoitumiseen vaadittavan keskuskationin konsentraatiosta. Ligaatiot suoritettiin 0; 0,1; 1; 10 ja 100 mM kaliumionikonsentraatiossa (KCl), pH 5, 20 °C. Yhteen reaktioon tuli kahta oligonukleotidimallia (1 μM), KCl-liuosta sekä pH 5 AcOH/AcOLi puskuria (50mM). Puskuroinnin jälkeen reaktion tilavuus oli 250 μL. Tämän jälkeen reaktiota inkuboitiin 55 °C uunissa yön yli, jotta aldehydyissä ollut *N*-metoksioksatsolidiinisuusojaus saatiin purettua. Reaktioista otettiin 0 tunnin näytteet ja varmistettiin, ettei ligaatiotuotetta ollut muodostunut ennen kinetiikkamittausten aloitusta.

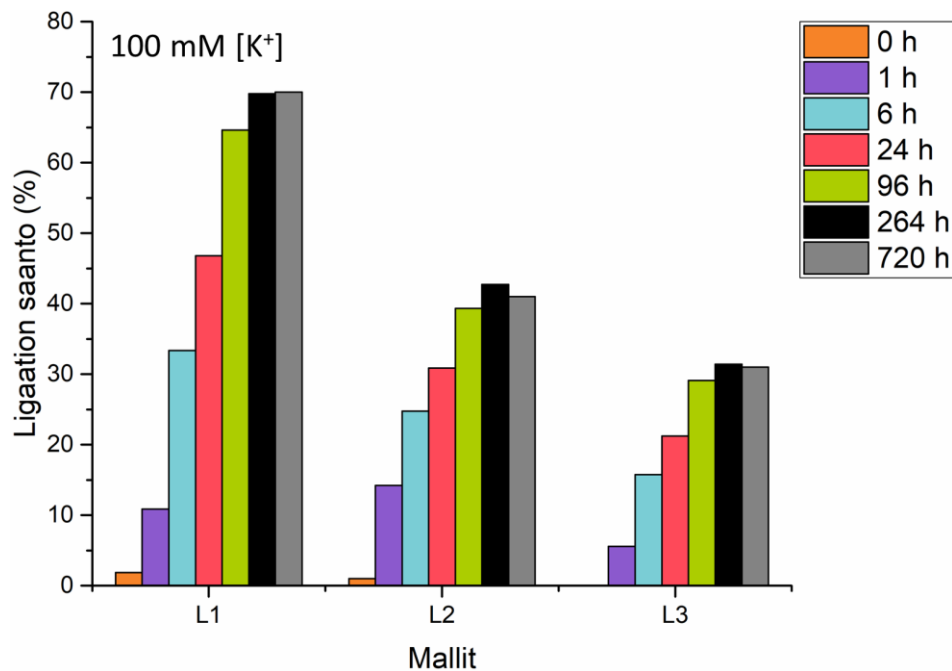
Reaktioseuranta toteutettiin 1 h, 6 h, 24 h, 96 h, 264 h ja 720 h aikapisteissä. Jo yhden tunnin näytteissä nähtiin tuotteen muodostuminen 100 mM kaliumionin konsentraatioissa ja 24 tunnin kohdalla kaikissa malleissa oli muodostunut tuotetta 100, 10 ja 1 mM kaliumionin konsentraatioissa (Kuva 11.). Kuvat geeleistä käsiteltiin Image-J-ohjelmalla, josta saatiin reaktioiden saannot (Kuva 12. ja Kuva 13.). Yksikään malli ei tuottanut tuotetta ilman K^+ -ionia. 0,1 mM K^+ -konsentraatioissa vain kaksi mallia kolmesta tuotti mitattavan määrän tuotetta. Sen lisäksi, että kationin konsentraatio tuotti eroja reaktioiden välille, myös ligaation kohdalla oli väliä reaktion tasapainon kannalta. Reaktioiden nopeudet olivat ensimmäisten tuntien aikana samanlaiset, mutta tasapaino suosi huomattavasti ligaatiokohtia, jotka asettuivat G-kvadrupleksin silmukoihin. Malli **L1** erottui selkeästi parhaalla saantoprosentilla. Malleissa **L1** ja **L2** ligaation kohta oli silmukassa. Mallissa **L1** ligaatioon käytetty pidempi oligonukleotidi pystyi koordinoitumaan kationin ympärille todennäköisesti enemmän kuin mallissa **L2**. Mallin **L3** ligaation kohta ei ole silmukassa, vaan G-kvadrupleksin kvartettien välissä, joka saattaa häiritä kvartettien pinoutumista. 96 tunnin jälkeen reaktioiden onnistuminen varmennettiin HPLC-MS spektroskooppisesti. Kaikkien kolmen mallin 100 mM KCl reaktioiden tuotteet onnistuttiin karakterisoimaan massaspektrometrisesti.



Kuva 11. G-kvadrupleksin K^+ -ionista riippuvan reaktiokinetiikan seurannassa käytetyt denaturoivat elektroforeesigeelit. Reaktioiden KCl pitoisuus nousee malleittain vasemmalta oikealle. Ligaatiotuotteen kohta on merkattu punaisella nuolella.



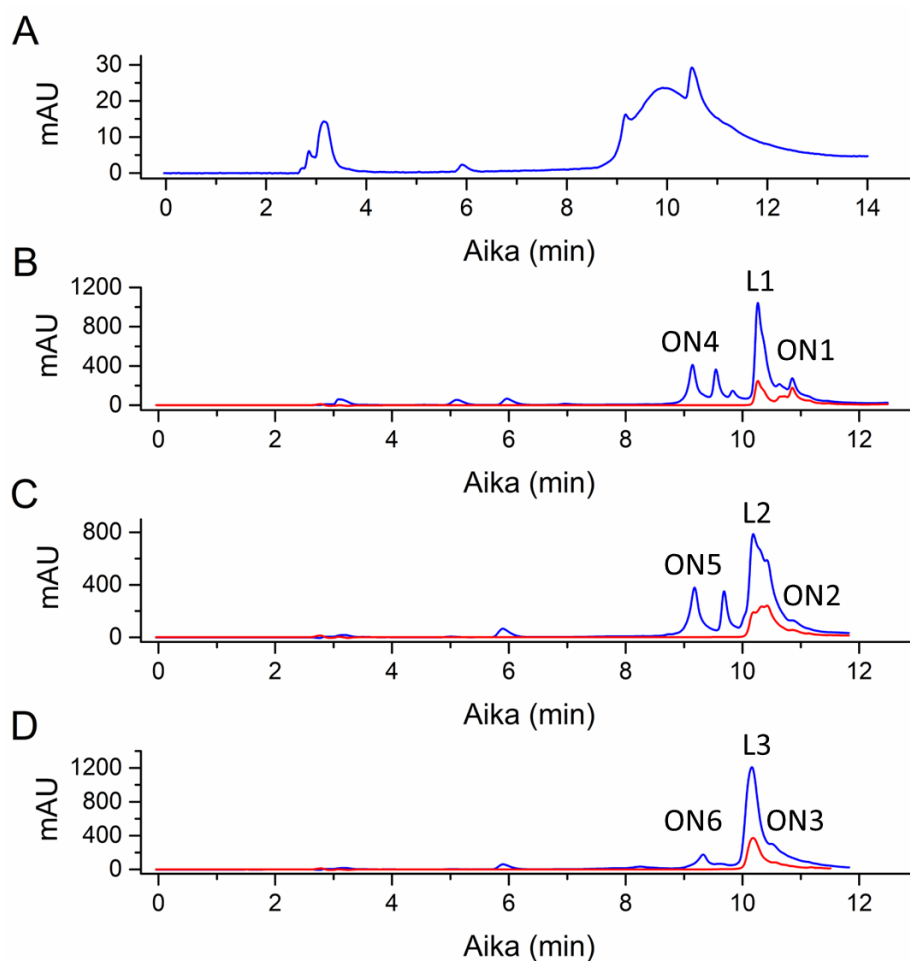
Kuva 12. *N*-metoksioksaatsolidiiniligaation reaktiokinetiikka mitattuna vaihtelevissa kalium-ionin konsentraatioissa. Reaktiota seurattiin denaturoivalla geielektrofooresilla. Reaktion saanto saatiin geelien kuvista käsittelemällä ne ImageJ -ohjelmalla. Reaktiosta nähdään selkeästi, ettei reaktiota havaittu 0h näytteissä, eikä ligaatiota tapahtunut ilman kationin läsnäoloa.



Kuva 13. *N*-metoksioksaatsolidiiniligaation mitattu reaktiokinetiikka 100 mM kalium-ionin konsentraatioissa. Vahvimma reaktioissa käytetystä kationin konsentraatiosta näkyy mallien L1, L2 ja L3 erot reaktion tasapainossa.

2.6 G-kvadrupleksin tuottaminen puhdistusta ja CD-mittauksia varten

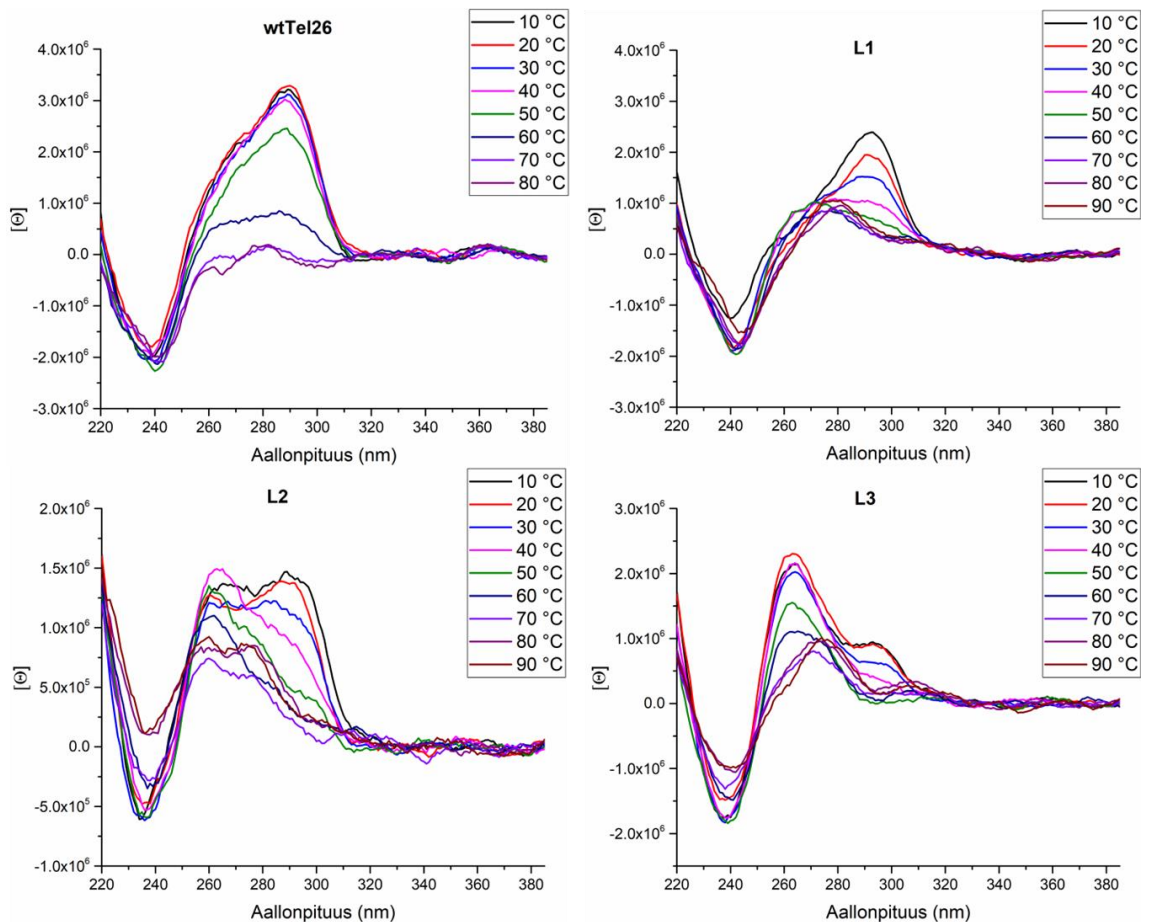
Jatkotutkimuksia varten reaktiotuotteet puhdistettiin HPLC:n avulla. Yhdisteiden puhdistus tavallisella RP C-18 kolonnilla, ilman kolonniuunia, ei onnistunut (Kuva 14. **A**). Sen sijaan erityisesti oligonukleotidien erottelemiseen tarkoitettu Phenomenex Biozen oligo -kolonni (5 – 90%, 50 mM TEAA in MeOH / 50 mM TEAA in H₂O, 20 min, Phenomenex 150 x 4,6 mm bioZen Oligo 2,6 µm, 60 °C) soveltui puhdistukseen hyvin (Kuva 14. **B-D**). Tällä menetelmällä onnistuimme erottelemaan reaktioliuoksesta lähtöaineena olleet oligonukleotidit sekä ligoituneen tuotteen. Onnistuneen lopputuotteen puhdistamisen jälkeen käynnistettiin uudet reaktiot joiden tarkoituksena oli valmistaa riittävästi lopputuotetta jatkotutkimuksia varten. Reaktioliuoksen oligonukleotidien ja KCl:n pitoisuutta kasvatettiin 40 µM ja 1 M konsentraatioon. Reaktioiden annettiin reagoida kaksi viikkoa. Tänä aikana reaktioiden etenemistä seurattiin yllä mainitulla HPLC menetelmällä. Kahden viikon jälkeen lopputuotteet eroteltiin reaktioliuoksesta viidessä eri injektiossa. Puhdistettuja lopputuotteita käytettiin jatkotutkimuksiin kuten CD-mittauksiin.



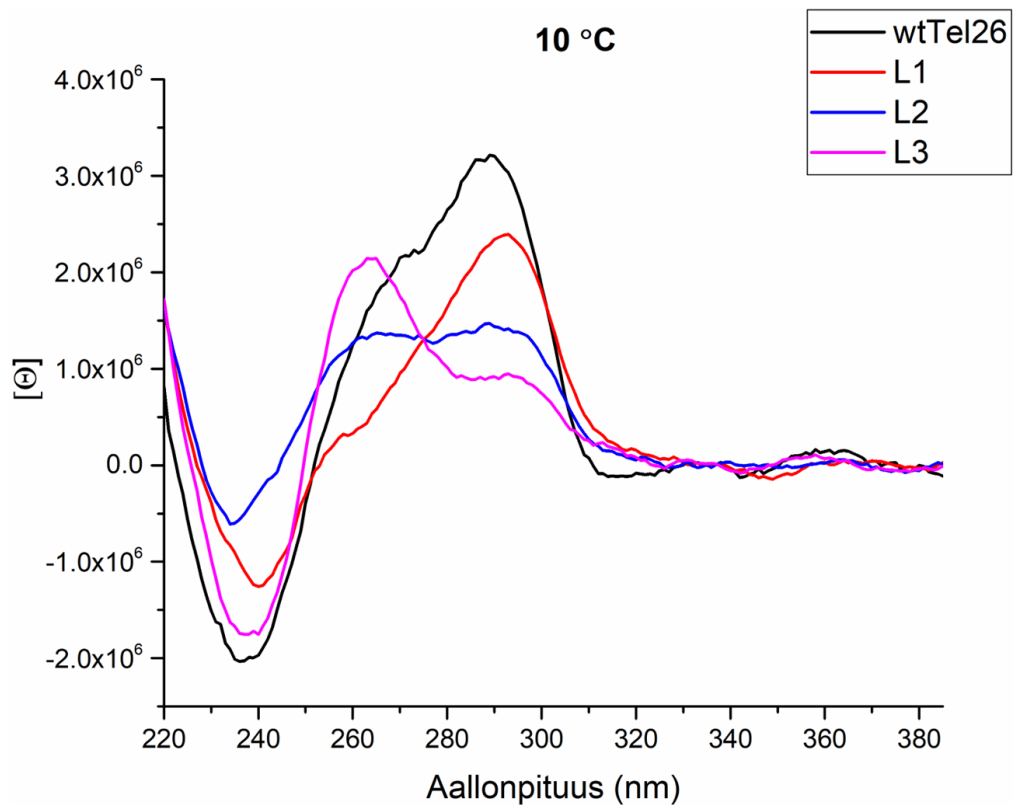
Kuva 14. *N*-metoksioksatsolidiiniligaation lopputuotteiden puhdistukset. **A)** Normaalilla C18-kolonnilla puhdistettu malli **L1**. **B-C)** Mallien **L1**, **L2** ja **L3** puhdistukset Phenomenex bioZen -kolonnilla. Sininen on 260 nm ja punainen 495 nm aallonpituus.

2.7 CD-mittaukset

CD-mittauksia varten valmistettiin referenssiksi normaali wtTel26 ilman leimaa. Mittauksista piirretyt kuvaajat ovat kolmen mittauksen keskiarvoja, joista on poistettu taustan signaali (Kuva 15.). CD-mittaukset suoritettiin 10 mM natriumkakydylaattipuskurissa (pH 7,4; I = 0,1 M) jossa oli 100 mM KCl:ia ja mitattavaa oligonukleotidia n. 1 μ M. **L1** spektri on muodoltaan lähimpänä wtTel26 muodostaman hybridi-2 mallisen G4-rakenteen CD-spektriä.¹²⁸ CD-spektrin maksimit, sekä käyrän yleinen muoto ovat samanlaiset kuin referenssiyhdisteellä. Kinetiikkamittauksissa heikoiten toiminut malli **L3**:n spektri on täysin erilainen verrattaessa referenssiin. Sen muoto ja CD-spektrin maksimikohta kohta muistuttavat enemmän paralleelia, kuin hybridi mallista G-kvadrupleksia.¹²⁹ Malli **L2** näyttäisi olevan yhdistelmä mallien **L1** ja **L3** spektreistä. Mallilta **L2** löytyy hybridirakenteen maksimikohta aallonpituudella 290 nm sekä paralleelin G4-rakenteen maksimikohta aallonpituudella 265 nm. Vertailemalla 10 °C lämpötilan spektrejä nähtiin ligaatiokohdan aiheuttamat erot rakenteissa parhaiten (Kuva 16.).



Kuva 15. Referenssinä käytetyn wtTel26 ja mallien **L1**, **L2** ja **L3** mitatut CD-spektrit. Jokainen mittaus suoritettiin kolmesti ja kuvaajaan on piirretty mittausten keskiarvo, joista on poistettu taustan signaali.



Kuva 16. 10 °C lämpötilassa mitatut CD-spektrit. Kuvajista nähdään selkeästi mallin **L1** samanlaisuus referenssin kanssa ja sillä on CD-spektrin maksimikohta noin aallonpituudella 295 nm. Malli **L3** CD-spektrin profiili on hyvin samanlainen paralleelin G4-rakenteen kanssa. Lisäksi 260 nm maksimikohta on sama kuin paralleelilla G4-rakenteella. Malli **L2** on yhdistelmä mallien **L1** ja **L3** CD-spektrien profiileista ja sillä on kaksi maksimikohtaa sekä aallonpituudella 260 nm että 295 nm.

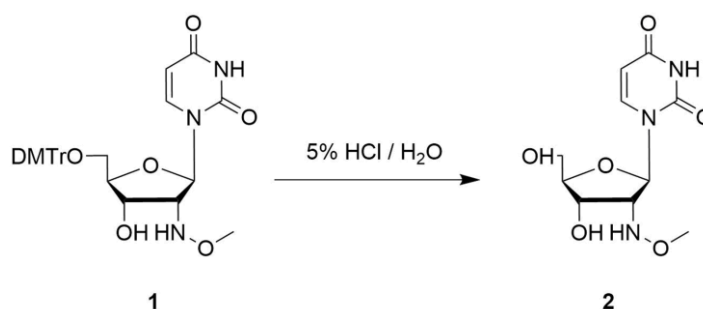
Spektreissä nähdään eroja myös eri rakenteiden pysyvyydessä lämpötilan noustessa. Referenssinä käytetty wtTel26 CD-spektrin maksimiarvo on lähes muuttumaton suuremmissa lämpötiloissa, kuin malleilla **L1** – **L3**. Mallin **L1** maksimi tippuu nopeiten ja jo 40 °C lämpötilassa sitä ei ole enää havaittavissa. Mallit **L2** ja **L3** kestävät jopa 50 °C lämpötilaa, kuten myös wtTel26. Mielenkiintoisimpana malleista erottuu **L2**, jonka G4-rakenteiden muotojen tasapaino muuttuu lämpötilan noustessa. Aallonpituuden 295 nm maksimikohta on käytännössä kadonnut 40 °C lämpötilassa, mutta aallonpituuden 260 nm huippu erottuu vielä 50 °C lämpötilassa. Tämä sama ilmiö on havaittavissa myös mallilla **L3**, mutta heikompana.

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Yleiset menetelmät

Synteeseissä käytettiin kaupallisia reagensseja ja liuottimia. Osa synteeseiden lähtöaineista oli aikaisemmin valmistettuja. Kuivattujen liuottimien vesipitoisuus tarkistettiin Karl Fischer-titraattorilla ennen niiden käyttöä synteeseissä. NMR-spektrit mitattiin Bruker BioSpin 500 MHz NMR-spektrometrillä. Massaspektreistä tarkat massat mitattiin Bruker micrOTOF-Q -massaspektrometrillä ja reaktioiden jälkeiset epätarkat massat reaktioseurantaan mitattiin käyttäen Agilent 1260 HPLC, jossa massadetektorina Agilent 6120. Oligonukleotidit syntetisoitiin käyttämällä ÄKTA oligopilot plus -automaattisella DNA/RNA syntetisaattorilla käyttämällä kaupallisia nukleotidejä ja kiinteitä kantajia, ellei toisin mainita. Oligonukleotidien HPLC-puhdistuksissa käytettiin semipreparatiivista Phenomenex-kolonnia (C-18, 250 × 10 mm, 5 μm).

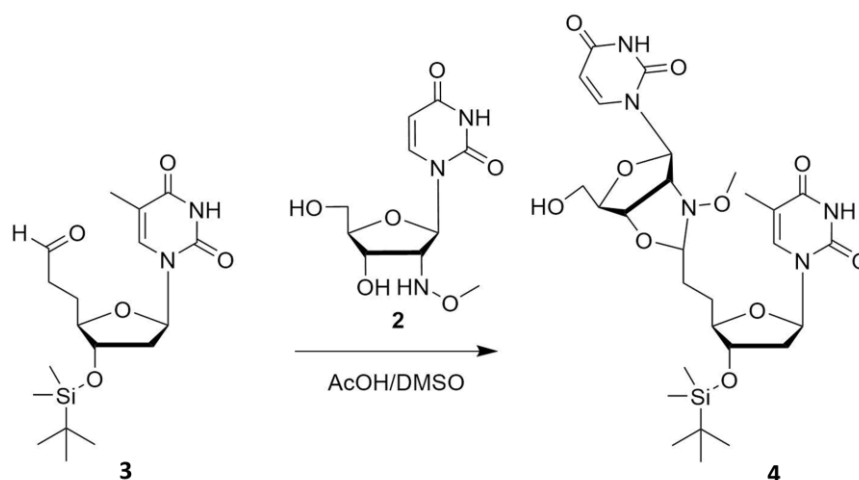
3.2 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamiini)-uridiini (2)



Kaavio 4. Aikaisemmin valmistetun 5'-O-(4,4'-dimetoksitriityli)-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamiini)-uridiinin 5'-suojarahmian poisto lievällä happokäsittelyllä.

Aldehydiprekursorin valmistus aloitettiin detrityloimalla aikaisemmin itse syntetisoitu 5'-O-(4,4'-dimetoksitriityli)-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamiini)-uridiini **1** 5% HCl-liuoksella (1,1 ml), joka lisättiin reaktioliuokseen erissä 90 minuutin aikana. Reaktiota seurattiin TLC:llä. Reaktioliuos haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen (100 ml). Vesifaasia uutettiin dikloorimetaanilla (5 x 80 ml). Uuton onnistuminen varmistettiin TLC:llä. Tuotteen karakterisointi suoritettiin käyttäen HPLC-MS, jossa positiivisella ionisaatiolla näkyi m/z 274,1 (tarkka m/z 273,0961) joka sopi tuotteen massaan. Tuotetta saatiin 0,94 g (99%). Tuotteesta ei karakterisoitu tarkkaa massa tai NMR-spektriä.

3.3 *N*-metoksioksatsolidiini-UT-dimeeri (4)



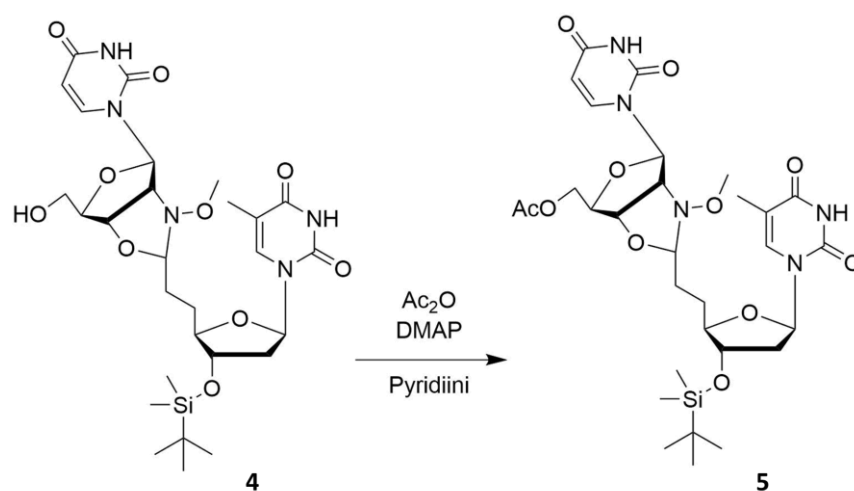
Kaavio 5. Muokatun tymidiinin 5'-aldehydin suojaaminen muodostamalla *N*-metoksioksatsolidiini aineen **2** kanssa.

Lähtöaine **2** (0,32 g; 1,2 mmol) ja 5'-asetaldehydi-tymidiini **3** (0,53 g; 1,4 mmol) lisättiin samaan keittopulloon kuivassa asetonitriilissä ja liuos haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin AcOH:n ja DMSO:n (25/75, 2 ml) seokseen ja reaktion annettiin edetä 30 minuuttia 40°C:ssa. Reaktioseos jäädytettiin ja reaktio pysäytettiin lisäämällä seokseen 25% ammoniakkin vesiliuosta (2 ml) tipoittain, sekä tämän jälkeen mQ-vettä (20 ml). Reaktioliuos uutettiin EtOAc:lla (2 × 50 ml, 1 × 20 ml). Orgaanista faasia pestiin tämän jälkeen kylläisellä NaHCO₃-vesiliukosella (25 ml) ja kylläisellä NaCl-vesiliukoksella (25 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina MeOH:n, TEA:n ja DCM:n seosta (5:1:94, v/v). Tuotetta **4** saatiin 0,46 g (58%). Tuote **4** karakterisoitiin NMR- (**Liite 1** ja **Liite 2**) ja massaspektrometrisesti.

HRMS (ESI): m/z 636,2706 [M-H]⁻ (laskettu); m/z 636,2685 [M-H]⁻ (havaittu) (3 ppm).
¹H-NMR δ_H (500 MHz, ACN-d₃): 7,54 (1H, d, J = 8,1 Hz, U H6), 7,14 (1H, s, T H6) 6,06 (1H, t, J = 6,7 Hz, H1'), 5,57 (1H, d, J = 8,2 Hz, U H5), 4,71 (1H, s, C2'-N-CH), 4,55 (2H, dd, J = 7,4 Hz, H4'), 4,16 (2H, m, H3'), 3,68 – 3,58 (2H, m, H5'a/b), 3,37 (3H, s, NOME), 2,06 (3H, m, H2'), 1,74 (3H, s, T C5-Me) 0,80 (9H, s, TBDMS).

¹³C-NMR δ_C (125 MHz, ACN-d₃): 163,3 (C4), 151,1 (C2), 141,9 (U C6), 136,4 (T C6), 111,0 (T C5) 102,8 (U C5), 102,0 (C2'-N-C), 84,6 (C1'), 79,2 (C4'), 75,4 (C3'), 62,5 (C5'), 61,3 (NOME), 40,0 (C2'), 30,0 (Si-C), 25,7 (Si-C-Me), 12,1 (T C5-Me), 10,7 (Si-Me).

3.4 *N*-metoksioksatsolidiini-UT-dimeerin 5'-asetylointi (5)

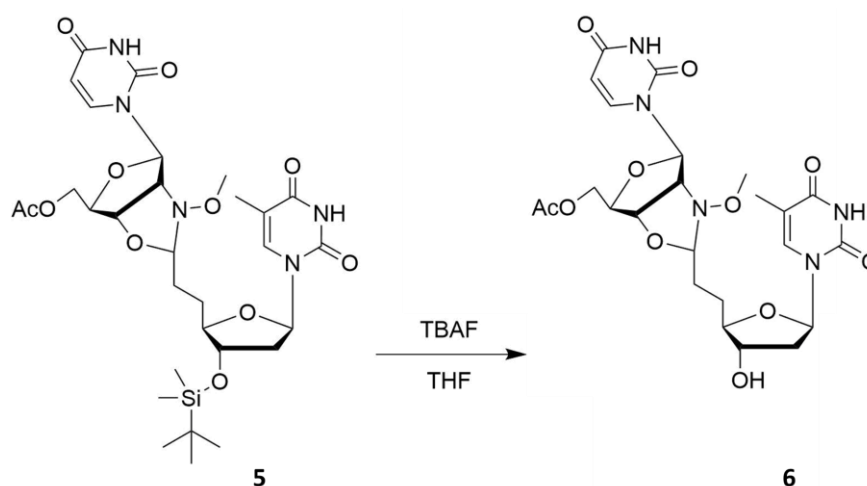


Kaavio 6. *N*-metoksioksatsolidiinilla liitettyjen uridiinin ja tymidiinin 5'-hydroksyylin asetylointi viimeisen reaktion ohjaamista varten.

Tuote **4** (0,43 g, 0,68 mmol) liuotetiin pyridiiniin (12 ml) ja joukkoon lisättiin Ac₂O:ia (130 µl, 0,68 mmol) sekä kide DMAP:ia. Reaktiota seurattiin ohutkerroskromatografisesti ja 60 minuutin kuluttua reaktio oli käynyt loppuun. Reaktioliuokseen lisättiin DIPEA:a (1 ml) ja se konsentroidiin pyöröhaihduksessa. Konsentroituu reaktioliuokseen lisättiin EtOAc:ia (60 ml). Orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO₃-vesiliuoksella (2 × 30 ml) ja kylläisellä NaCl-vesiliuoksella (1 × 30 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin. Välituotetta **5** saatiin 0,36 g (78%). Välituote karakterisoitiin käyttämällä HPLC-MS laitteistoa.

MS (ESI): m/z 678,2812 [M-H]⁻ (laskettu); m/z 678,1 [M-H]⁻ (havaittu)

3.5 *N*-metoksioksatsolidiini-UT-dimeerin 3'-silyylin poisto (6)

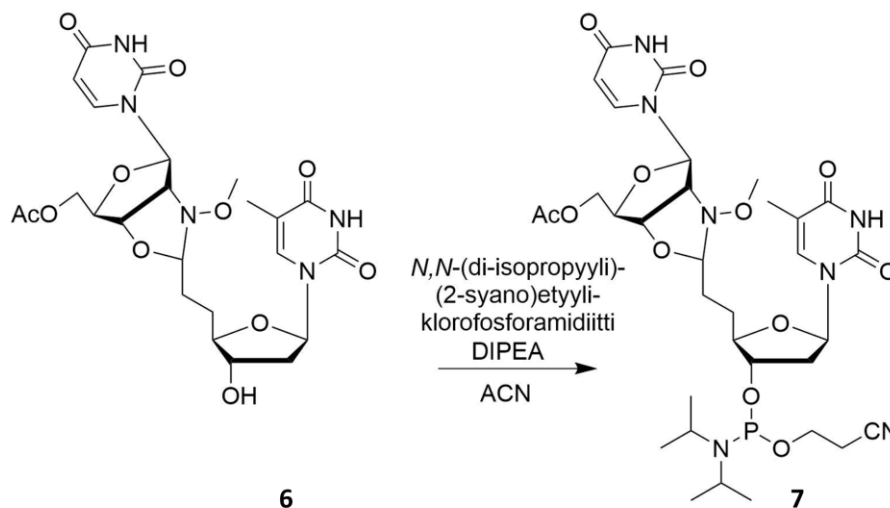


Kaavio 7. *N*-metoksioksatsolidiinilla liitettyjen uridiinin ja tymidiinin 3'-TBDMS suojarahmän poisto.

Väliaine **5** liuotettiin kuivaan THF:iin (7 ml, 32 ppm H₂O) ja lisättiin joukkoa TBAF:ia (1M, THF) (0,96 ml). Reaktioliuosta lämmitettiin öljyhauteessa (55 °C) sekoittaen. Reaktiota seurattiin ohutkerroskromatografisesti ja 50 minuutin kuluttua lähtöaine oli kulunut loppuun. Reaktio lopetettiin haihuttamalla se kuiviin pyöröhaihduksessa. Haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen (20 ml) ja vettä titrattiin NaClO₄ liuoksella (0,8 g, 2 ml H₂O), kunnes valkoista sakkaa ei muodostunut. Liuos suodatettiin lasisinterissä, jonka jälkeen vielä varmistettiin titrauksen onnistuminen lisäämällä tippa NaClO₄ liuosta. Liuos suodatettiin vielä PTFE suodattimen läpi (0,2 µm). Suodokseen liuotettiin NaCl:ia (9 g) ja vesifaasia uutettiin EtOAc:lla (4 × 80 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduksessa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti, käyttäen eluentina metanolin, trietyyliamiinin ja dikloorimetaanin seosta (7:1:92, v/v). Tuotetta **6** saatiin 0,20 g (51%). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskooppisesti (**Liite 3** ja **Liite 4**) ja massaspektrometrisesti. HRMS (ESI): *m/z* 564,1947 [M-H]⁻ (laskettu); *m/z* 564,1929 [M-H]⁻ (havaittu) (3 ppm). ¹H-NMR δ_H (500 MHz, ACN-d₃): 7,56 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, U H6), 7,31 (1H, d, *J* = 2,1 Hz, T H6), 6,18 (2H, t, *J* = 6,6 Hz, H1'), 5,75 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, U H5), 4,71 (1H, s, C2'-N-CH) 4,64 (H2, dd, *J* = 7,4 Hz, H4'), 4,30 – 4,22 (2H, m, H5'a/b), 4,15 (1H, dd, *J* = 9,1 Hz, H3'), 3,50 (3H, s, NOME), 2,20 (3H, t, *J* = 6,9 Hz, 2H'), 2,04 (3H, s, Ac-Me) 1,86 (3H, s, T C5-Me),

^{13}C -NMR δ_{C} (125 MHz, ACN- d_3): 171,0 (Ac-C), 164,4 (C4), 151,1 (C2), 141,8 (U C6), 136,5 (T C6), 111,0 (T C5), 103,0 (U C5), 102,1 (C2'-N-C), 84,6 (C1'), 79,3 (C4'), 74,1 (C3'), 64,6 (C5'), 61,3 (NO-Me), 39,5 (C2'), 20,6 (Ac-Me), 12,1 (T C5 Me).

3.6 *N*-metoksioksatsolidiini-UT-dimeerin fosfitylointi (7)



Kaavio 8. Viimeisessä vaiheessa *N*-metoksioksatsolidiinilla liitettyjen uridiinin ja tymidiinin 3'-hydroksyylin fosfitylointi.

Tuote **6** (0,11 g, 0,19 mmol) liuotettiin kuivaan asetonitriliin (1,6 ml; 38 ppm H_2O). Reaktioliuokseen lisättiin DIPEA:a (0,45 mmol; 78 μl) ja [(2-syanoetyyli)-(N,N-diisopropyyli)]klorofosforamidiittiä (0,223 mmol; 50 μl) tippikaapissa. Reaktioastia suljettiin septumilla, johon oli kiinnitetty tyypellä täytetty pallo, jotta reaktioon pääsisi mahdollisimman vähän ilmankosteutta. Reaktiota seurattiin TLC:llä ja tunnin kuluttua reaktioseos konsentroititiin varovasti, ettei reaktioliuos pääsisi happamoitumaan. Keltainen öljymäinen haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina metanolin, trietyyliamiinin ja dikloorimetaanin seosta (4:1:95, v/v). Tuotetta **7** saatiin 78 mg (55%). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskooppisesti (**Liite 5** ja **Liite 6**) ja massaspektrometrisesti. HRMS (ESI): massassa näkyi vain hydrolyysituote, m/z 683,2072 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (laskettu); m/z 683,1989 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (havaittu) (12 ppm).

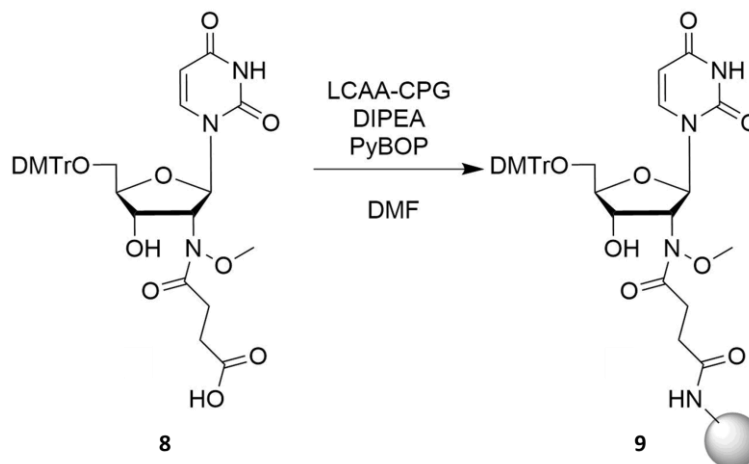
^1H -NMR δ_{H} (500 MHz, ACN- d_3): 7,50 (1H, m, U H6), 7,28 (1H, s, T H6), 6,19 (2H, t, $J = 6,8$ Hz, H1'), 5,72 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, U H5), 4,71 (1H, s, C2'-N-CH), 4,63 (2H, q, $J =$, H4') 4,36 - 4,23 (2H, m, H5'), 4,14 (2H, m, H3') 3,50 (H3, s, NOME), 2,31 (2H, m, P-N-CH), 2,05 (H3, s, Ac-Me), 1,87 (3H, s, T C5-Me), 1,20 (6H, d, $J = 6,4$ Hz, P-N-C-Me).

^{13}C -NMR δ_{C} (125 MHz, ACN- d_3): 170,4 (Ac-C), 162,9 (C4), 150,4 (C2), 141,0 (U C6), 135,8 (T C6), 118,6 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 110,5 (T C5), 102,5 (U C5), 101,4 (C2'-N-C), 84,2 (C1'),

78,8 (C4'), 75,9 (C3'), 63,8 (C5'), 60,8 (NO-Me), 58,2 (P-O-C), 43,1 (P-N-C), 38,0 (C2'), 23,8 (P-N-C-Me), 20,0 (C-C≡N), 19,9 (AcO-Me), 11,5 (T C5-Me).

3.7 Oligonukleotidien synteesi

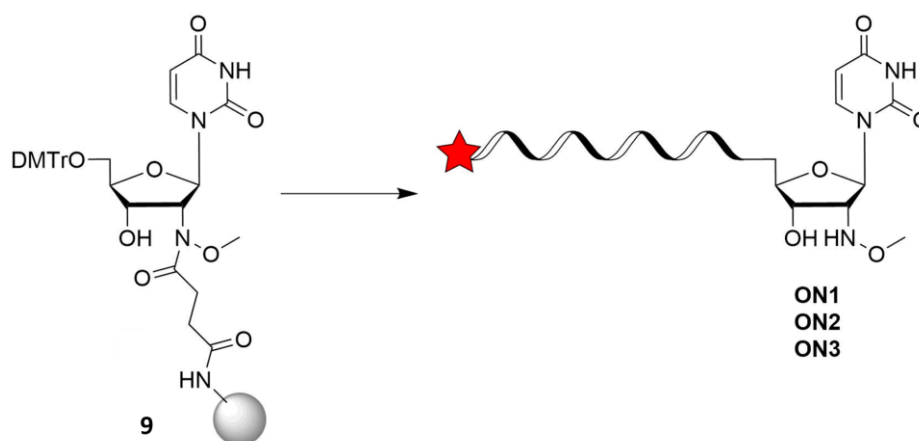
3.7.1 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin immobilisointi kiinteään kantajaan



Kaavio 9. Reaktiokaavio 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin immobilisointi kiinteään kantajaan.

Kiinteä kantaja **9** valmistettiin käyttäen aikaisemmin julkaistua menetelmää¹¹⁵. LCAA-CPG-kantaja (2 g) joukkoon lisättiin DMF:ään (2,6 ml) liuotettu 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiininsukkinaatti (0,31 g). Joukkoon lisättiin DMF:ää kunnes kantaja oli suspensiossa. Seokseen lisättiin PyBOP:ia (0,24 g) ja DIPEA:a (140 µl). Reaktiota ravistettiin 24 h. Tämän jälkeen kantaja suodatettiin ja pestiin DMF:llä sekä dikloorimetaanilla. Kantajan reagoimattomat amino- ja hydroksyyli-ryhmät asetyloitiin käyttäen Cap A ja Cap B sekoitusta 1:1 (etikkahappoanhydridi/lutidine/1-metyyliimidatsoli/THF, 5:5:8:82, v/v/v/v) kymmenen minuutin ajan. Asetylointikäsitteily toistettiin vielä toisen kerran. Kantaja pestiin uudestaan DMF:llä ja DCM:llä sekä kuivattiin vakuumeiksiattorissa. Näyte kantajasta (10 mg) liuotettiin 3% dikloorietikka-

happo/dikloorimetaaniliuokseen. Kantajaan sitoutuneen nukleosidin määrä määritettiin irronneen DMTr-kationin absorbanssista spektrofotometrisesti (Loading = 16 µmol/g).

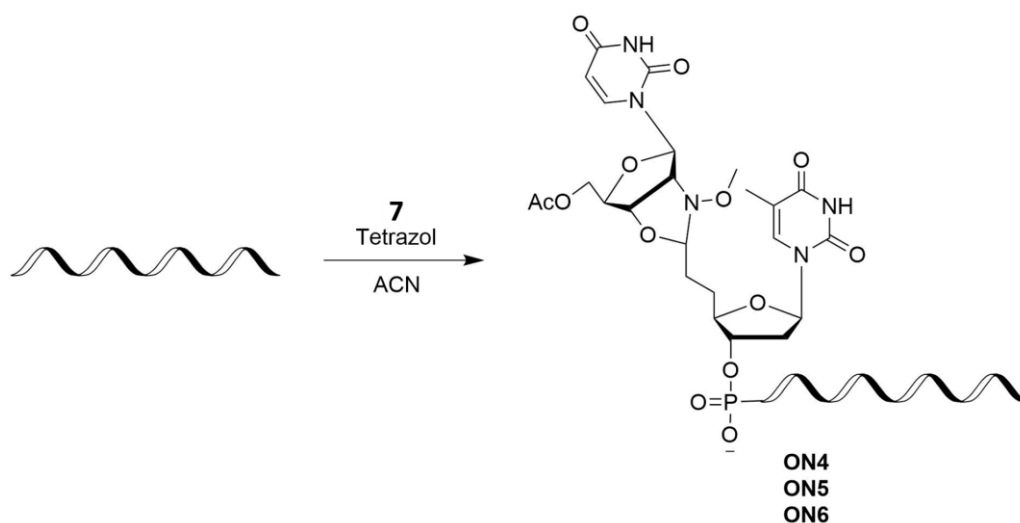
3.7.2 Oligonukleotidien wtTel26-U_{NOMe} synteesit

Kaavio 10. Reaktiokaavio oligonukleotidien **ON1**, **ON2** ja **ON3** synteesistä automaattisella oligonukleotidisyntetisaattorilla. Punainen tähti on 6-FAM fluoreseenileimaa.

Kaikki oligonukleotidit valmistettiin käyttämällä Äkta oligopilot plus automaattista DNA/RNA-syntetisaattoria 1 μmol skaalassa ja käyttäen kaupallisia fosforamidiittirakenneyksiköitä. Oligonukleotideissa **ON1**, **ON2** ja **ON3** käytettiin aikaisemmin valmistettua kiinteää kantajaa **9**. Oligonukleotideissa **ON4**, **ON5** ja **ON6** käytettiin kaupallista dT-CPG 1000 (*loading* = 36 $\mu\text{mol/g}$) kantajaa. Synteesissä kytentäaikana fosforamidiittiyksiköillä oli 2 minuuttia ja 6-FAM leimalla 12 minuuttia. Oligonukleotidit irrotettiin kiinteästä kantaajasta ammoniakkin väkevällä vesiliuoksella inkuboiden 55 °C:n lämpötilassa 18 tuntia. Ammoniakin väkevä vesiliuos haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen. Oligonukleotidit puhdistettiin RP-HPLC:llä (5 – 25% ACN, 25 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH 7,0) (**Liite 16**). Puhdistetuista oligonukleotideista mitattiin massaspektrit (**Liite 10**, **Liite 11** ja **Liite 12**).

Oligonukleotidi	Havaittu	Laskettu	Saanto [%]
ON1	2719,47	2719,93	10
ON2	4628,82	4629,16	16
ON3	6537,06	6538,38	10

Taulukko 1. Itse valmistettua kiinteää kantajaa **9** käyttäen syntetisoitujen oligonukleotidien havaittu ja laskennallinen molekyyli massa sekä synteesien saannot.

3.7.3 Oligonukleotidien T_{ald.}-wtTel26 synteesit

Kaavio 11. Reaktiokaavio oligonukleotidien **ON4**, **ON5** ja **ON6** automaattisen oligonukleotidisynteesin jälkeisestä yhdisteen 6 manuaalisesta liitännästä.

Oligonukleotideissa **ON4**, **ON5** ja **ON6** käytettiin kaupallista kantajaa dT-CPG 1000 (*loading* = 36 $\mu\text{mol/g}$). Kytentäaika oli 2 minuuttia. Synteesiohjelma päätettiin detritylaatioon. Synteesin jälkeen oligonukleotideihin liitettiin fosforamidiitti **7** manuaalisesti. Kiinteää kantajaa punnittiin (**ON4** 11,4 mg; 0,41 μmol) (**ON5** 7,3 mg 0,25; μmol) (**ON6** 12,0 mg; 0,43 μmol) mikrosentrifuugiputkeen. Tuote **7** liuotettiin kuivaan asetonitriiliin siten, että siitä muodostui 0,4 M liuos. Tätä liuosta lisättiin kiinteän kantajan päälle (**ON4** 16 ekv; 6,4 μmol) (**ON5** 16 ekv; 4,2 μmol) (**ON6** 16 ekv; 5,8 μmol). Reaktioluokseen lisättiin typpikaapissa 1H-tetrazolia (0,45 M; asetonitriilissä) (**ON4** 16 ekv; 6,4 μmol) (**ON5** 16 ekv; 4,2 μmol) (**ON6** 16 ekv; 5,8 μmol) jonka jälkeen reaktioon lisättiin asetonitriiliä, kunnes kiinteä kantaja oli täysin peittynyt liuottimella. Kytentöjen annettiin edetä kaksi tuntia huoneenlämmössä. Kiinteä kantaja huuhdeltiin imussa asetonitriilillä, jonka jälkeen fosfiittiesterit hapetettiin käsittelemällä kantajia jodi-hapettimella (0,1 M THF/Pyridiini/H₂O 78:20:2). Hapetusaikana oli 5 minuuttia. Tämän jälkeen kiinteä kantaja huuhdeltiin imussa asetonitriilillä ja dikloorimetaanilla ja se kuivattiin paineilmalla. Oligonukleotidit irrotettiin kiinteästä kantajasta ammoniakkin väkevällä vesiliuoksella inkuboiden kantajia 55 °C:n lämpötilassa 18 tuntia. Ammoniakin väkevä vesiliuos suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen. Oligonukleotidit puhdistettiin RP-HPLC:llä (5 – 25% ACN, 25 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7,0))(Liite 17). Puhdistetuista oligonukleotideista mitattiin massaspektrit (Liite 13, Liite 14 ja Liite 15).

Oligonukleotidi	Havaittu (<i>m/z</i>)	Laskettu (<i>m/z</i>)	Saanto [%]
ON4	2432,49	2434,72	2,6
ON5	4341,79	4341,95	2,7
ON6	6250,10	6251,18	5,7

Taulukko 2. Kaupallista dT-CPG 1000 kiinteää kantajaa käyttäen syntetisoitujen oligonukleotidien havaittu ja laskennallinen molekyyli­massa sekä synte­esien saannot.

3.8 G-kvadrupleksien reaktiot

3.8.1 Kvalitatiiviset reaktiot

Ensimmäisissä kokeissa oli tarkoitus osoittaa reaktion toimivuus ja tutkia vaikuttavatko olosuhteet (pH ja lämpötila) reaktion etenemiseen. Alustavia kokeita varten valittiin neljä eri reaktio-olosuhdetta (pH = 5,0; 20 °C; pH = 5,0; 4 °C; pH = 6,0; 20 °C ja pH = 6,0; 4°C). Näistä olosuhteista ja kolmesta eri mallista saatiin 12 näytettä. Lisäksi valmistettiin kolme kontrollinäytettä. Yksi näyte sisälsi 1 µM kumpaakin oligonukleotidiä, 100 mM KCl, 50 mM puskuria (pH = 5,0; tai 6,0) sekä vettä niin, että reaktion tilavuus oli 250 µl. Reaktioihin lisättiin oligonukleotidit, KCl, vesi ja AcOH, pH 5. Reaktioita inkuboitiin 55 °C uunissa yön yli aldehydin suojan irrottamiseksi. Seuraavana päivänä reaktioihin lisättiin puskurit oikean pH:n saavuttamiseksi ja mitattiin 0h näyte, jolla varmistettiin ettei ligaatioreaktioita ollut havaittavissa inkuboinnin jälkeen. Reaktioliuoksesta otettiin 5 µl näyte ja reaktio pysäytettiin lisäämällä Novex TBE Urea 2x puskuria 7,5 µl elektroforeesia varten. Reaktio pysähtyy kun se puskuroidaan selkeästi suuremmalla konsentraatiolla emäksistä puskuria. Reaktiota seurattiin denaturoivalla geelielektroforeesilla (15% TBE urea gel, 200 V, 45 mA, 50 min). Seuraava näyte mitattiin kahden viikon kuluttua reaktion aloittamisesta. Malleissa **L2** ja **L3** havaittiin ligaatiotuotetta. Mallissa **L1** ei havaittu reaktiota. Tämä johtui todennäköisesti **ON1** tai **ON4** lähtöaineiden laadusta.

3.8.2 K⁺-ionin konsentraatiosta riippuvat kinetiikkamittaukset

Kalium-ionista riippuvan reaktiokinetiikan mittaamiseksi reaktiot oligonukleotidimalleille (**L1**, **L2** ja **L3**) tehtiin viidessä eri K⁺-konsentraatiossa (0 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM ja 100 mM). Reaktioita varten valmistettiin uusi puskuri 1M AcOH / AcOLi, pH 5. Ionivahvuus säädettiin litiumkloridilla (LiCl) I = 1 M. Kalium-ionille valmistettiin laimennossarja, jotta tilavuudet säilyivät samana kaikissa reaktioissa. Reaktioiden tilavuus oli 250 µl ja ne sisälsivät 1 µM kahta oligonukleotidiä, 0 - 100 mM

KCl, sekä 50 mM valmistettua AcOH / AcOLi, pH 5 puskuria. Reaktioihin lisättiin oligonukleotidit, KCl ja puskuri, jonka jälkeen reaktioita inkuboitiin 55 °C uunissa yön yli. Seuraavana päivänä mitattiin reaktioista 0h näyge. Reaktion etenemistä seurattiin denaturoivalla geeli elektroforeesilla (15% TBE urea gel, 200 V, 45 mA, 50 min). Reaktio seurannan aikapisteet olivat 0 h, 1 h, 6 h, 24 h, 96 h, 264 h ja 720 h.

3.9 G-kvadrupleksin tuottaminen puhdistusta ja CD-mittauksia varten

CD-mittauksia varten valmistettiin uusi erä ligatoituja G-kvadruplekseja. Reaktioiden tilavuus oli 100 µl, oligonukleotidien konsentraatio oli 40 µM, KCl:n 1 M ja puskuria 50 mM. Reaktiotuotteet puhdistettiin RP-HPLC:n avulla. Tuotteiden puhdistuksessa jouduttiin käyttämään oligonukleotideille tarkoitettua Phenomenex bioZen -kolonnia, koska normaalilla C18-kolonnilla lähtöaineet ja tuote olivat päällekkäin (5 – 90%, 50 mM TEAA in MeOH / 50 mM TEAA in H₂O, 20 min, Phenomenex 150 × 4,6 mm bioZen Oligo 2,6 µm, 60 °C). Reaktio pysäytettiin ennen seurantaa ja puhdistusta pH 8 puskurilla. Reaktiot puhdistettiin RP-HPLC:n avulla käyttäen yllä mainittua menetelmää. Puhdistettujen mallien saannot määritettiin spektrofotometrisesti. Saannot olivat **L1** = 23%, **L2** = 15% ja **L3** = 23%.

3.10 CD-mittaukset

Referenssiksi CD-mittauksia varten valmistettiin muokkaamaton wtTel26 sekvenssi. Referenssi sekä mallit **L1** (1,2 µM), **L2** (0,9 µM) ja **L3** (1,35 µM) mitattiin 10 mM natriumkodylaattipuskurissa (pH 7,4; I = 0,1 M) jossa oli 100 mM KCl. Mittaukset tehtiin 10 °C välein alueella 10-90 °C. Jokainen lämpötila mitattiin kolme kertaa ja saaduista absorbanssiarvoista otettiin keskiarvo. Tausta mitattiin myös kolme kertaa ja tämän keskiarvo vähennettiin mittauksista.

4 Johtopäätökset ja yhteenveto

Tutkimuksessa haluttiin valmistaa G4-rakenne kahdesta erillisestä oligonukleotidistä happolabiililla ligaatiolla. Tässä onnistuttiin. Mittaamalla reaktiokinetiikkaa vaihtelevissa kalium-konsentraatioissa todistettiin ligaation olevan riippuvainen saatavilla olevan kationin konsentraatiosta. Reaktiona G4-rakenteen muodostuminen on K^+ -konsentraatiosta riippuvainen, joten tämä tukee alkuperäistä hypoteesiä, että tapahtuakseen ligaatio tarvitsee ensin G4-rakenteen muodostumisen. Ilman kaliumionin läsnäoloa ligaatiota ei havaittu ollenkaan ja kaliumionin konsentraation kasvaessa ligaatiotuotteen määrä kasvoi. Tämä johtuu joko siitä, että G4-rakenteen muodostuminen mahdollistaa *N*-metoksioksatsolidiiniligaation, tai G4-rakenteen muodostaminen vangitsee ligaatiotuotteet pysyvästi yhteen. Tästä datasta ei voi sanoa kumpi pitää paikkansa.

Reaktion K^+ -riippuvuuden lisäksi, vertailemalla samassa konsentraatioissa tehtyjä reaktioita saimme tietoa myös ligaatiokohdan sijainnin merkityksestä reaktion tasapainoon. Käytetystä kolmesta mallista **L1** muodostumisen tasapaino oli paljon enemmän tuotteiden puolella kuin malleilla **L2** tai **L3**. G4-rakenteiden muodostuminen on nopea reaktio, mutta niiden kvartetit eivät muodostu yhdessä, vaan hybridisoituvat yksi ”kulma” kerrallaan. Tämä sopisi siihen, että G4-rakenne pääsee hybridisoitumaan pidemmälle malleissa **L1** ja **L3** kuin **L2**. Tällöin viimeinen pala voi liittyä rakenteeseen ilman, että sen tarvitsee taipua, tehostaen ligaatiota. Malli **L3** on kuitenkin mallin **L1** peilikuva, jolloin sen pitäisi olla lähes yhtä tehokas, mitä se ei ollut ja jopa **L2** oli huomattavasti tehokkaampi. Tämä ero tarkoittaisi, että ligaation kohta G4-rakenteen muodostumisessa vaikuttaisi reaktioon enemmän kuin rakenteen hybridisoitumisen aste.

Erona mallien **L1** ja **L2**, sekä **L3** välillä oli ligaation kohtaa ympäröivät rakenteet, lopullisessa kolmiuloitteisessa muodossa. Käytetty sekvenssin wtTel26 muodostaa pääsääntöisesti hybridi-2-muodon G-kvadruplekseja.⁴⁸ Hybridi-2 muodon G4 sisältää kvartetien väleissä kaksi normaalia silmukkaa, joissa sekvenssi kiertää kvartetien ulkopuolelta, seuraavaan guaniinitriplettiin, sekä yhden kvartetien vierestä menevän silmukan, joka kääntyy miltei 180° taakse päin päästäkseen seuraavaan triplettiin. Malleissa **L1** ja **L2** ligaatiokohta on juuri näissä kvartetien ulkopuolisissa silmukoissa, välttämällä kvartetien aiheuttaman ahtauden. Mallissa **L3** ligaation kohta on kvartetin vieressä. Steerisen ahtauden takia ligaation tasapaino on selkeästi vähemmän tuotteiden puolella verrattaessa kahteen muuhun malliin.

Tutkimuksen lopuksi ligaatiotuotteet karakterisoitiin CD-lämpötilamittauksilla. Mallien **L1**, **L2** ja **L3** CD-spektrejä verrattiin referenssiksi valmistetun muokkaamattoman wtTel26 CD-spektriin. Vaikka sekvenssissä oli keskellä *N*-metoksioksatsolidiinilinkkeri fosfodiesterisidoksen tilalla, muodostivat kaikki kolme mallia G-kvadrupleksisen rakenteen. Muodostuneiden sekundaarirakenteiden välillä oli kuitenkin eroja. Malli **L1** muodosti puhtaasti wtTel26 mallisen hybridi-2-mallisen G4-rakenteen, kun taas **L3** muistutti eniten paralleelia G4-rakennetta. Malli **L2** oli paralleelin ja hybridi G4-rakenteen tasapaino. Tämä tasapaino muuttui paralleelin suuntaan korkeammassa lämpötilassa. Sama tasapaino oli havaittavissa myös mallilla **L3**, vaikkakin heikompana. Tämä viittaisi siihen, että ligaatiokohta vaikuttaa rakenteen sekundaarirakenteeseen.

Reaktion tutkiminen vain yhteen suuntaan jättää mahdolliselle jatkotutkimukselle selkeän suunnan rakenteen hajoamisen ja stabilisuuden tutkimisen osalta. Lisäksi erilaisten G4-ligandien vaikutus *N*-metoksioksatsolidiiniligatoituun G4-rakenteeseen on vielä täysin tutkimatta. Mikäli rakennetta haluttaisiin käyttää mahdollisena kuljettimena terapeuttisille G4-ligandeille, kuten porfyriiniselle TMPyP4:lle tai telomeraasi nihibiittori RHSP4:lle, tulisi löytää sopiva rakenne, joka olisi riittävän stabiili neutraaleissa olosuhteissa, mutta hajoaisi nopeasti happamassa pH:ssa. Tämä voi vaatia täysin erilaisen G4-rakenteen tässä työssä käytettyyn hybridi-2-muodon verrattuna. Toinen mahdollinen tutkimuksen suunta voisi olla ligatoidun G4-rakenteen käyttö pH-herkkänä biosensorina kuvantamisessa tai nanoteknologiassa eräänlaisena pH:n ohjaamana ”moottorina”.

5 Viitteet

- (1) Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R. Helix Formation by Guanylic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1962**, *48* (12), 2013–2018.
<https://doi.org/10.1073/pnas.48.12.2013>.
- (2) Gehring, K.; Leroy, J.-L.; Guéron, M. A Tetrameric DNA Structure with Protonated Cytosine-Cytosine Base Pairs. *Nature* **1993**, *363* (6429), 561–565.
<https://doi.org/10.1038/363561a0>.
- (3) Felsenfield, G.; Rich, A. Studies on the Formation of Two- and Three-Stranded Polyribonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *26* (3), 457–468.
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90091-4).
- (4) Hoogsteen, K. The Crystal and Molecular Structure of a Hydrogen-Bonded Complex between 1-Methylthymine and 9-Methyladenine. *Acta Crystallogr.* **1963**, *16* (9), 907–916. <https://doi.org/10.1107/S0365110X63002437>.
- (5) Aishima, J.; Gitti, R. K.; Noah, J. E.; Gan, H. H.; Schlick, T.; Wolberger, C. A Hoogsteen Base Pair Embedded in Undistorted B-DNA. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (23), 5244–5252. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf661>.
- (6) Christensen, J. J.; Rytting, J. H.; Izatt, R. M. Thermodynamics of Proton Dissociation in Dilute Aqueous Solution. VII. PK , ΔH° , and ΔS° . Values for Proton Ionization from Several Pyrimidines and Their Nucleosides at 25.Degree. *J. Phys. Chem.* **1967**, *71* (8), 2700–2705. <https://doi.org/10.1021/j100867a047>.
- (7) Yang, B.; Rodgers, M. T. Base-Pairing Energies of Proton-Bound Heterodimers of Cytosine and Modified Cytosines: Implications for the Stability of DNA i-Motif Conformations. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (1), 282–290.
<https://doi.org/10.1021/ja409515v>.
- (8) Kang, C. H.; Berger, I.; Lockshin, C.; Ratliff, R.; Moyzis, R.; Rich, A. Crystal Structure of Intercalated Four-Stranded d(C3T) at 1.4 Å Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (24), 11636–11640.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11636>.
- (9) Lieblein, A. L.; Krämer, M.; Dreuw, A.; Fürtig, B.; Schwalbe, H. The Nature of Hydrogen Bonds in Cytidine \cdots H $^+$ \cdots Cytidine DNA Base Pairs. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51* (17), 4067–4070.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201200549>.

-
- (10) Zeraati, M.; Langley, D. B.; Schofield, P.; Moye, A. L.; Rouet, R.; Hughes, W. E.; Bryan, T. M.; Dinger, M. E.; Christ, D. I-Motif DNA Structures Are Formed in the Nuclei of Human Cells. *Nat. Chem.* **2018**, *10* (6), 631–637. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0046-3>.
- (11) Mir, B.; Serrano, I.; Buitrago, D.; Orozco, M.; Escaja, N.; González, C. Prevalent Sequences in the Human Genome Can Form Mini I-Motif Structures at Physiological PH. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (40), 13985–13988. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07383>.
- (12) Shi, S.; Geng, X.; Zhao, J.; Yao, T.; Wang, C.; Yang, D.; Zheng, L.; Ji, L. Interaction of [Ru(Bpy)₂(Dppz)]²⁺ with Human Telomeric DNA: Preferential Binding to G-Quadruplexes over i-Motif. *Biochimie* **2010**, *92* (4), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.003>.
- (13) Yoga, Y. M. K.; Traore, D. A. K.; Sidiqi, M.; Szeto, C.; Pardini, N. R.; Barker, A.; Leedman, P. J.; Wilce, J. A.; Wilce, M. C. J. Contribution of the First K-Homology Domain of Poly(C)-Binding Protein 1 to Its Affinity and Specificity for C-Rich Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (11), 5101–5114. <https://doi.org/10.1093/nar/gks058>.
- (14) Wright, E. P.; Huppert, J. L.; Waller, Z. A. E. Identification of Multiple Genomic DNA Sequences Which Form I-Motif Structures at Neutral PH. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (6), 2951–2959. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx090>.
- (15) Sun, D.; Hurley, L. H. The Importance of Negative Superhelicity in Inducing the Formation of G-Quadruplex and i-Motif Structures in the c-Myc Promoter: Implications for Drug Targeting and Control of Gene Expression. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (9), 2863–2874. <https://doi.org/10.1021/jm900055s>.
- (16) Sharma, J.; Chhabra, R.; Yan, H.; Liu, Y. PH-Driven Conformational Switch of “i-Motif” DNA for the Reversible Assembly of Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2007**, No. 5, 477–479. <https://doi.org/10.1039/B612707J>.
- (17) Xu, X.; Li, B.; Xie, X.; Li, X.; Shen, L.; Shao, Y. An I-DNA Based Electrochemical Sensor for Proton Detection. *Talanta* **2010**, *82* (4), 1122–1125. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.06.019>.
- (18) Liu, D.; Balasubramanian, S. A Proton-Fuelled DNA Nanomachine. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42* (46), 5734–5736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200352402>.

-
- (19) Dervan, P. B. Design of Sequence-Specific DNA-Binding Molecules. *Science* **1986**, 232 (4749), 464–471. <https://doi.org/10.1126/science.2421408>.
- (20) Lyamichev, V. I.; Mirkin, S. M.; Frank-Kamenetskii, M. D. Structures of Homopurine-Homopyrimidine Tract in Superhelical DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1986**, 3 (4), 667–669. <https://doi.org/10.1080/07391102.1986.10508454>.
- (21) Htun, H.; Dahlberg, J. E. Topology and Formation of Triple-Stranded H-DNA. *Science (80-.)*. **1989**, 243 (4898), 1571–1576. <https://doi.org/10.1126/science.2648571>.
- (22) Dayn, A.; Samadashwily, G. M.; Mirkin, S. M. Intramolecular DNA Triplexes: Unusual Sequence Requirements and Influence on DNA Polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89 (23), 11406–11410. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.23.11406>.
- (23) Letai, A. G.; Palladino, M. A.; Fromm, E.; Rizzo, V.; Fresco, J. R. Specificity in Formation of Triple-Stranded Nucleic Acid Helical Complexes: Studies with Agarose-Linked Polyribonucleotide Affinity Columns. *Biochemistry* **1988**, 27 (26), 9108–9112. <https://doi.org/10.1021/bi00426a007>.
- (24) Durland, R. H.; Kessler, D. J.; Gunnell, S.; Duvic, M.; Pettitt, B. M.; Hogan, M. E. Binding of Triple Helix Forming Oligonucleotides to Sites in Gene Promoters. *Biochemistry* **1991**, 30 (38), 9246–9255. <https://doi.org/10.1021/bi00102a017>.
- (25) Christensen, L. A.; Finch, R. A.; Booker, A. J.; Vasquez, K. M. Targeting Oncogenes to Improve Breast Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* **2006**, 66 (8), 4089–4094. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4288>.
- (26) Reza, F.; Glazer, P. M. Triplex-Mediated Genome Targeting and Editing. *Methods Mol. Biol.* **2014**, 1114, 115–142. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-761-7_8.
- (27) James, P. L.; Brown, T.; Fox, K. R. Thermodynamic and Kinetic Stability of Intermolecular Triple Helices Containing Different Proportions of C+*GC and T*AT Triplets. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31 (19), 5598–5606. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg782>.
- (28) Steudel, H.; Brigl, P. Über Die Guanylsäure Aus Der Pankreasdrüse: II. Mitteilung. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **1910**, 68 (1), 40–51. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1910.68.1.40>.

-
- (29) Zimmerman, S. B.; Cohen, G. H.; Davies, D. R. X-Ray Fiber Diffraction and Model-Building Study of Polyguanylic Acid and Polyinosinic Acid. *J. Mol. Biol.* **1975**, *92* (2), 181–192. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90222-3).
- (30) Haider, S.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. Molecular Dynamics and Principal Components Analysis of Human Telomeric Quadruplex Multimers. *Biophys. J.* **2008**, *95* (1), 296–311. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120501>.
- (31) Chaires, J. B.; Trent, J. O.; Gray, R. D.; Dean, W. L.; Buscaglia, R.; Thomas, S. D.; Miller, D. M. An Improved Model for the HTERT Promoter Quadruplex. *PLoS One* **2014**, *9* (12), e115580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115580>.
- (32) Zacchia, M.; Abategiovanni, M. L.; Stratigis, S.; Capasso, G. Potassium: From Physiology to Clinical Implications. *Kidney Dis. (Basel, Switzerland)* **2016**, *2* (2), 72–79. <https://doi.org/10.1159/000446268>.
- (33) You, J.; Li, H.; Lu, X.-M.; Li, W.; Wang, P.-Y.; Dou, S.-X.; Xi, X. Effects of Monovalent Cations on Folding Kinetics of G-Quadruplexes. *Biosci. Rep.* **2017**, *37*, BSR20170771. <https://doi.org/10.1042/BSR20170771>.
- (34) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. Prevalence of Quadruplexes in the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2908–2916. <https://doi.org/10.1093/nar/gki609>.
- (35) Todd, A. K.; Johnston, M.; Neidle, S. Highly Prevalent Putative Quadruplex Sequence Motifs in Human DNA. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2901–2907. <https://doi.org/10.1093/nar/gki553>.
- (36) Chambers, V. S.; Marsico, G.; Boutell, J. M.; Di Antonio, M.; Smith, G. P.; Balasubramanian, S. High-Throughput Sequencing of DNA G-Quadruplex Structures in the Human Genome. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (8), 877–881. <https://doi.org/10.1038/nbt.3295>.
- (37) Mukundan, V. T.; Phan, A. T. Bulges in G-Quadruplexes: Broadening the Definition of G-Quadruplex-Forming Sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (13), 5017–5028. <https://doi.org/10.1021/ja310251r>.
- (38) Lee, W. T. C.; Yin, Y.; Morten, M. J.; Tonzi, P.; Gwo, P. P.; Odermatt, D. C.; Modesti, M.; Cantor, S. B.; Gari, K.; Huang, T. T.; Rothenberg, E. Single-Molecule Imaging Reveals Replication Fork Coupled Formation of G-

- Quadruplex Structures Hinders Local Replication Stress Signaling. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 2525. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22830-9>.
- (39) Lago, S.; Nadai, M.; Cernilogar, F. M.; Kazerani, M.; Domínguez Moreno, H.; Schotta, G.; Richter, S. N. Promoter G-Quadruplexes and Transcription Factors Cooperate to Shape the Cell Type-Specific Transcriptome. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 3885. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24198-2>.
- (40) Yuan, W.-F.; Wan, L.-Y.; Peng, H.; Zhong, Y.-M.; Cai, W.-L.; Zhang, Y.-Q.; Ai, W.-B.; Wu, J.-F. The Influencing Factors and Functions of DNA G-Quadruplexes. *Cell Biochem. Funct.* **2020**, *38* (5), 524–532. <https://doi.org/10.1002/cbf.3505>.
- (41) Burge, S.; Parkinson, G. N.; Hazel, P.; Todd, A. K.; Neidle, S. Quadruplex DNA: Sequence, Topology and Structure. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (19), 5402–5415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>.
- (42) Jana, J.; Weisz, K. A Thermodynamic Perspective on Potential G-Quadruplex Structures as Silencer Elements in the MYC Promoter. *Chemistry* **2020**, *26* (71), 17242–17251. <https://doi.org/10.1002/chem.202002985>.
- (43) Guédin, A.; Gros, J.; Alberti, P.; Mergny, J.-L. How Long Is Too Long? Effects of Loop Size on G-Quadruplex Stability. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (21), 7858–7868. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq639>.
- (44) Víglaský, V.; Bauer, L.; Tlučková, K. Structural Features of Intra- and Intermolecular G-Quadruplexes Derived from Telomeric Repeats. *Biochemistry* **2010**, *49* (10), 2110–2120. <https://doi.org/10.1021/bi902099u>.
- (45) Hardin, C. C.; Watson, T.; Corregan, M.; Bailey, C. Cation-Dependent Transition between the Quadruplex and Watson-Crick Hairpin Forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* **1992**, *31* (3), 833–841. <https://doi.org/10.1021/bi00118a028>.
- (46) Venczel, E. A.; Sen, D. Parallel and Antiparallel G-DNA Structures from a Complex Telomeric Sequence. *Biochemistry* **1993**, *32* (24), 6220–6228. <https://doi.org/10.1021/bi00075a015>.
- (47) Hardin, C. C.; Perry, A. G.; White, K. Thermodynamic and Kinetic Characterization of the Dissociation and Assembly of Quadruplex Nucleic Acids. *Biopolymers* **2000**, *56* (3), 147–194. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000/2001\)56:3<147::AID-BIP10011>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000/2001)56:3<147::AID-BIP10011>3.0.CO;2-N).

-
- (48) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Bialis, T.; Jones, R. A.; Yang, D. Human Telomeric Sequence Forms a Hybrid-Type Intramolecular G-Quadruplex Structure with Mixed Parallel/Antiparallel Strands in Potassium Solution. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (9), 2723–2735. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl348>.
- (49) Wang, Y.; Patel, D. J. Solution Structure of the Human Telomeric Repeat d[AG3(T2AG3)3] G-Tetraplex. *Structure* **1993**, *1* (4), 263–282. [https://doi.org/10.1016/0969-2126\(93\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0969-2126(93)90015-9).
- (50) Luu, K. N.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Lacroix, L.; Patel, D. J. Structure of the Human Telomere in K⁺ Solution: An Intramolecular (3 + 1) G-Quadruplex Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (30), 9963–9970. <https://doi.org/10.1021/ja062791w>.
- (51) Qi, T.; Xu, Y.; Zhou, T.; Gu, W. The Evolution of G-Quadruplex Structure in mRNA Untranslated Region. *Evol. Bioinform. Online* **2021**, *17*, 11769343211035140. <https://doi.org/10.1177/11769343211035140>.
- (52) Valton, A.-L.; Hassan-Zadeh, V.; Lema, I.; Boggetto, N.; Alberti, P.; Saintomé, C.; Riou, J.-F.; Prioleau, M.-N. G4 Motifs Affect Origin Positioning and Efficiency in Two Vertebrate Replicators. *EMBO J.* **2014**, *33* (7), 732–746. <https://doi.org/10.1002/embj.201387506>.
- (53) Paeschke, K.; Juranek, S.; Simonsson, T.; Hempel, A.; Rhodes, D.; Lipps, H. J. Telomerase Recruitment by the Telomere End Binding Protein-Beta Facilitates G-Quadruplex DNA Unfolding in Ciliates. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (6), 598–604. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1422>.
- (54) Cahoon, L. A.; Seifert, H. S. An Alternative DNA Structure Is Necessary for Pilin Antigenic Variation in *Neisseria Gonorrhoeae*. *Science* **2009**, *325* (5941), 764–767. <https://doi.org/10.1126/science.1175653>.
- (55) Kruisselbrink, E.; Guryev, V.; Brouwer, K.; Pontier, D. B.; Cuppen, E.; Tijsterman, M. Mutagenic Capacity of Endogenous G4 DNA Underlies Genome Instability in FANCD1-Defective *C. Elegans*. *Curr. Biol.* **2008**, *18* (12), 900–905. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.013>.
- (56) Beaume, N.; Pathak, R.; Yadav, V. K.; Kota, S.; Misra, H. S.; Gautam, H. K.; Chowdhury, S. Genome-Wide Study Predicts Promoter-G4 DNA Motifs Regulate Selective Functions in Bacteria: Radioresistance of *D. Radiodurans* Involves G4 DNA-Mediated Regulation. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (1), 76–89.

<https://doi.org/10.1093/nar/gks1071>.

- (57) Jayaraj, G. G.; Pandey, S.; Scaria, V.; Maiti, S. Potential G-Quadruplexes in the Human Long Non-Coding Transcriptome. *RNA Biol.* **2012**, *9* (1), 81–86. <https://doi.org/10.4161/rna.9.1.18047>.
- (58) Kumari, S.; Bugaut, A.; Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. An RNA G-Quadruplex in the 5' UTR of the NRAS Proto-Oncogene Modulates Translation. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (4), 218–221. <https://doi.org/10.1038/nchembio864>.
- (59) Weldon, C.; Eperon, I. C.; Dominguez, C. Do We Know Whether Potential G-Quadruplexes Actually Form in Long Functional RNA Molecules? *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44* (6), 1761–1768. <https://doi.org/10.1042/BST20160109>.
- (60) Kwok, C. K.; Marsico, G.; Sahakyan, A. B.; Chambers, V. S.; Balasubramanian, S. RG4-Seq Reveals Widespread Formation of G-Quadruplex Structures in the Human Transcriptome. *Nat. Methods* **2016**, *13* (10), 841–844. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3965>.
- (61) Kuo, M. H.-J.; Wang, Z.-F.; Tseng, T.-Y.; Li, M.-H.; Hsu, S.-T. D.; Lin, J.-J.; Chang, T.-C. Conformational Transition of a Hairpin Structure to G-Quadruplex within the WNT1 Gene Promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (1), 210–218. <https://doi.org/10.1021/ja5089327>.
- (62) Ishiguro, A.; Lu, J.; Ozawa, D.; Nagai, Y.; Ishihama, A. ALS-Linked FUS Mutations Dysregulate G-Quadruplex-Dependent Liquid-Liquid Phase Separation and Liquid-to-Solid Transition. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297* (5), 101284. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101284>.
- (63) DeJesus-Hernandez, M.; Mackenzie, I. R.; Boeve, B. F.; Boxer, A. L.; Baker, M.; Rutherford, N. J.; Nicholson, A. M.; Finch, N. A.; Flynn, H.; Adamson, J.; Kouri, N.; Wojtas, A.; Sengdy, P.; Hsiung, G.-Y. R.; Karydas, A.; Seeley, W. W.; Josephs, K. A.; Coppola, G.; Geschwind, D. H.; Wszolek, Z. K.; Feldman, H.; Knopman, D. S.; Petersen, R. C.; Miller, B. L.; Dickson, D. W.; Boylan, K. B.; Graff-Radford, N. R.; Rademakers, R. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* **2011**, *72* (2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>.
- (64) Cheng, A.; Liu, C.; Ye, W.; Huang, D.; She, W.; Liu, X.; Fung, C. P.; Xu, N.; Suen, M. C.; Ye, W.; Sung, H. H. Y.; Williams, I. D.; Zhu, G.; Qian, P.-Y.

- Selective C9orf72 G-Quadruplex-Binding Small Molecules Ameliorate Pathological Signatures of ALS/FTD Models. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (19), 12825–12837. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00654>.
- (65) Wang, X.; Chen, S.; Zhao, Z.; Chen, F.; Huang, Y.; Guo, X.; Lei, L.; Wang, W.; Luo, Y.; Yu, H.; Wang, J. Genomic G-Quadruplex Folding Triggers a Cytokine-Mediated Inflammatory Feedback Loop to Aggravate Inflammatory Diseases. *iScience* **2022**, *25* (11), 105312. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105312>.
- (66) Blice-Baum, A. C.; Mihailescu, M.-R. Biophysical Characterization of G-Quadruplex Forming FMR1 mRNA and of Its Interactions with Different Fragile X Mental Retardation Protein Isoforms. *RNA* **2014**, *20* (1), 103–114. <https://doi.org/10.1261/rna.041442.113>.
- (67) Zhang, Y.; Gaetano, C. M.; Williams, K. R.; Bassell, G. J.; Mihailescu, M. R. FMRP Interacts with G-Quadruplex Structures in the 3'-UTR of Its Dendritic Target Shank1 mRNA. *RNA Biol.* **2014**, *11* (11), 1364–1374. <https://doi.org/10.1080/15476286.2014.996464>.
- (68) Sun, H.; Karow, J. K.; Hickson, I. D.; Maizels, N. The Bloom's Syndrome Helicase Unwinds G4 DNA. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (42), 27587–27592. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27587>.
- (69) Baran, N.; Pucshansky, L.; Marco, Y.; Benjamin, S.; Manor, H. The SV40 Large T-Antigen Helicase Can Unwind Four Stranded DNA Structures Linked by G-Quartets. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (2), 297–303. <https://doi.org/10.1093/nar/25.2.297>.
- (70) Sarkies, P.; Murat, P.; Phillips, L. G.; Patel, K. J.; Balasubramanian, S.; Sale, J. E. FANCD1 Coordinates Two Pathways That Maintain Epigenetic Stability at G-Quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (4), 1485–1498. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr868>.
- (71) Lopes, J.; Piazza, A.; Bermejo, R.; Kriegsman, B.; Colosio, A.; Teulade-Fichou, M.-P.; Foiani, M.; Nicolas, A. G-Quadruplex-Induced Instability during Leading-Strand Replication. *EMBO J.* **2011**, *30* (19), 4033–4046. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.316>.
- (72) Masuda-Sasa, T.; Polaczek, P.; Peng, X. P.; Chen, L.; Campbell, J. L. Processing of G4 DNA by Dna2 Helicase/Nuclease and Replication Protein A (RPA) Provides Insights into the Mechanism of Dna2/RPA Substrate Recognition. *J.*

-
- Biol. Chem.* **2008**, 283 (36), 24359–24373.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M802244200>.
- (73) Begeman, A.; Son, A.; Litberg, T. J.; Wroblewski, T. H.; Gehring, T.; Huizar Cabral, V.; Bourne, J.; Xuan, Z.; Horowitz, S. G-Quadruplexes Act as Sequence-Dependent Protein Chaperones. *EMBO Rep.* **2020**, 21 (10), e49735.
<https://doi.org/10.15252/embr.201949735>.
- (74) Xu, M.; Axhemi, A.; Malgowska, M.; Chen, Y.; Leonard, D.; Srinivasan, S.; Jankowsky, E.; Taylor, D. J. Active and Passive Destabilization of G-Quadruplex DNA by the Telomere POT1-TPP1 Complex. *J. Mol. Biol.* **2021**, 433 (7), 166846. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166846>.
- (75) Krüger, A. C.; Raarup, M. K.; Nielsen, M. M.; Kristensen, M.; Besenbacher, F.; Kjems, J.; Birkedal, V. Interaction of HnRNP A1 with Telomere DNA G-Quadruplex Structures Studied at the Single Molecule Level. *Eur. Biophys. J.* **2010**, 39 (9), 1343–1350. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0587-x>.
- (76) Zimmer, J.; Tacconi, E. M. C.; Folio, C.; Badie, S.; Porru, M.; Klare, K.; Tumiat, M.; Markkanen, E.; Halder, S.; Ryan, A.; Jackson, S. P.; Ramadan, K.; Kuznetsov, S. G.; Biroccio, A.; Sale, J. E.; Tarsounas, M. Targeting BRCA1 and BRCA2 Deficiencies with G-Quadruplex-Interacting Compounds. *Mol. Cell* **2016**, 61 (3), 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.004>.
- (77) Brázda, V.; Červeň, J.; Bartas, M.; Mikysková, N.; Coufal, J.; Pečinka, P. The Amino Acid Composition of Quadruplex Binding Proteins Reveals a Shared Motif and Predicts New Potential Quadruplex Interactors. *Molecules* **2018**, 23 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092341>.
- (78) Lin, C.; Dickerhoff, J.; Yang, D. NMR Studies of G-Quadruplex Structures and G-Quadruplex-Interactive Compounds. *Methods Mol. Biol.* **2019**, 2035, 157–176. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9666-7_9.
- (79) Fang, S.; Liu, S.; Yang, D.; Yang, L.; Hu, C.-D.; Wan, J. Decoding Regulatory Associations of G-Quadruplex with Epigenetic and Transcriptomic Functional Components. *Front. Genet.* **2022**, 13, 957023. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.957023>.
- (80) Dai, Y.; Teng, X.; Zhang, Q.; Hou, H.; Li, J. Advances and Challenges in Identifying and Characterizing G-Quadruplex–Protein Interactions. *Trends Biochem. Sci.* **2023**, 48 (10), 894–909.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.06.007>.

- (81) Santos, T.; Salgado, G. F.; Cabrita, E. J.; Cruz, C. G-Quadruplexes and Their Ligands: Biophysical Methods to Unravel G-Quadruplex/Ligand Interactions. *Pharmaceuticals (Basel)*. **2021**, *14* (8). <https://doi.org/10.3390/ph14080769>.
- (82) Marchetti, C.; Zyner, K. G.; Ohnmacht, S. A.; Robson, M.; Haider, S. M.; Morton, J. P.; Marsico, G.; Vo, T.; Laughlin-Toth, S.; Ahmed, A. A.; Di Vita, G.; Pazitna, I.; Gunaratnam, M.; Besser, R. J.; Andrade, A. C. G.; Diocou, S.; Pike, J. A.; Tannahill, D.; Pedley, R. B.; Evans, T. R. J.; Wilson, W. D.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. Targeting Multiple Effector Pathways in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with a G-Quadruplex-Binding Small Molecule. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (6), 2500–2517. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01781>.
- (83) Read, M. A.; Wood, A. A.; Harrison, J. R.; Gowan, S. M.; Kelland, L. R.; Dosanjh, H. S.; Neidle, S. Molecular Modeling Studies on G-Quadruplex Complexes of Telomerase Inhibitors: Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (22), 4538–4546. <https://doi.org/10.1021/jm990287e>.
- (84) Cherstvy, A. G. Positively Charged Residues in DNA-Binding Domains of Structural Proteins Follow Sequence-Specific Positions of DNA Phosphate Groups. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (13), 4242–4247. <https://doi.org/10.1021/jp810009s>.
- (85) Sun, Z.-Y.; Wang, X.-N.; Cheng, S.-Q.; Su, X.-X.; Ou, T.-M. Developing Novel G-Quadruplex Ligands: From Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid-Protein Interaction. *Molecules* **2019**, *24* (3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030396>.
- (86) Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H. Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (14), 2113–2116. <https://doi.org/10.1021/jm970199z>.
- (87) Le, D. D.; Di Antonio, M.; Chan, L. K. M.; Balasubramanian, S. G-Quadruplex Ligands Exhibit Differential G-Tetrad Selectivity. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (38), 8048–8050. <https://doi.org/10.1039/C5CC02252E>.
- (88) Duarte, A. R.; Cadoni, E.; Ressurreição, A. S.; Moreira, R.; Paulo, A. Design of Modular G-Quadruplex Ligands. *ChemMedChem* **2018**, *13* (9), 869–893.

<https://doi.org/10.1002/cmdc.201700747>.

- (89) Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P. G4-FID: A Fluorescent DNA Probe Displacement Assay for Rapid Evaluation of Quadruplex Ligands. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *608*, 257–271. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-363-9_15.
- (90) Balasubramanian, S.; Hurley, L. H.; Neidle, S. Targeting G-Quadruplexes in Gene Promoters: A Novel Anticancer Strategy? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (4), 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrd3428>.
- (91) Kristi Rosa. *FDA Grants Fast Track Status to CX-5461 for Breast and Ovarian Cancers With BRCA1/2, PALB2, or Other HRD Mutations*. <https://www.onclive.com/view/fda-grants-fast-track-status-to-cx-5461-for-breast-and-ovarian-cancers-with-brca1-2-palb2-or-other-hrd-mutations> (accessed 2023-09-24).
- (92) Hilton, J.; Gelmon, K.; Bedard, P. L.; Tu, D.; Xu, H.; Tinker, A. V.; Goodwin, R.; Laurie, S. A.; Jonker, D.; Hansen, A. R.; Veitch, Z. W.; Renouf, D. J.; Hagerman, L.; Lui, H.; Chen, B.; Kellar, D.; Li, I.; Lee, S.-E.; Kono, T.; Cheng, B. Y. C.; Yap, D.; Lai, D.; Beatty, S.; Soong, J.; Pritchard, K. I.; Soria-Bretones, I.; Chen, E.; Feilotter, H.; Rushton, M.; Seymour, L.; Aparicio, S.; Cescon, D. W. Results of the Phase I CCTG IND.231 Trial of CX-5461 in Patients with Advanced Solid Tumors Enriched for DNA-Repair Deficiencies. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 3607. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31199-2>.
- (93) Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Giljohann, D. A.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Polyvalent DNA Nanoparticle Conjugates Stabilize Nucleic Acids. *Nano Lett.* **2009**, *9* (1), 308–311. <https://doi.org/10.1021/nl802958f>.
- (94) Harris, J.; Sengar, D.; Stewart, T.; Hyslop, D. The Effect of Immunosuppressive Chemotherapy on Immune Function in Patients with Malignant Disease. *Cancer* **1976**, *37* (2 Suppl), 1058–1069. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197602\)37:2+<1058::aid-cnrcr2820370813>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197602)37:2+<1058::aid-cnrcr2820370813>3.0.co;2-o).
- (95) Schimmel, K. J. M.; Richel, D. J.; van den Brink, R. B. A.; Guchelaar, H.-J. Cardiotoxicity of Cytotoxic Drugs. *Cancer Treat. Rev.* **2004**, *30* (2), 181–191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.003>.
- (96) Smita, P.; Narayan, P. A.; J, K.; Gaurav, P. Therapeutic Drug Monitoring for Cytotoxic Anticancer Drugs: Principles and Evidence-Based Practices. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 1015200. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1015200>.

-
- (97) Syed, Y. Y. Sacituzumab Govitecan: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (10), 1019–1025. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01337-5>.
- (98) Gbadamosi, M.; Meshinchi, S.; Lamba, J. K. Gemtuzumab Ozogamicin for Treatment of Newly Diagnosed CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Future Oncol.* **2018**, *14* (30), 3199–3213. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0325>.
- (99) Lu, J.; Jiang, F.; Lu, A.; Zhang, G. Linkers Having a Crucial Role in Antibody-Drug Conjugates. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (4), 561. <https://doi.org/10.3390/ijms17040561>.
- (100) Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. Strategies and Challenges for the next Generation of Antibody–Drug Conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (5), 315–337. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>.
- (101) Tsuchikama, K.; An, Z. Antibody-Drug Conjugates: Recent Advances in Conjugation and Linker Chemistries. *Protein Cell* **2018**, *9* (1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0323-0>.
- (102) Constable, P. CHAPTER 111 - Clinical Acid-Base Chemistry; Ronco, C., Bellomo, R., Kellum, J. A. B. T.-C. C. N. (Second E., Eds.; W.B. Saunders: Philadelphia, 2009; pp 581–586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4252-5.50116-7>.
- (103) Huotari, J.; Helenius, A. Endosome Maturation. *EMBO J.* **2011**, *30* (17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.
- (104) Casey, J. R.; Grinstein, S.; Orlowski, J. Sensors and Regulators of Intracellular PH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (1), 50–61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>.
- (105) Walles, M.; Connor, A.; Hainzl, D. ADME and Safety Aspects of Non-Cleavable Linkers in Drug Discovery and Development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (32), 3463–3475. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180118153502>.
- (106) Anami, Y.; Xiong, W.; Gui, X.; Deng, M.; Zhang, C. C.; Zhang, N.; An, Z.; Tsuchikama, K. Enzymatic Conjugation Using Branched Linkers for Constructing Homogeneous Antibody-Drug Conjugates with High Potency. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (26), 5635–5642. <https://doi.org/10.1039/c7ob01027c>.
- (107) Ducry, L.; Stump, B. Antibody–Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to Monoclonal Antibodies. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (1), 5–13.

<https://doi.org/10.1021/bc9002019>.

- (108) Dovgan, I.; Koniev, O.; Kolodych, S.; Wagner, A. Antibody-Oligonucleotide Conjugates as Therapeutic, Imaging, and Detection Agents. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (10), 2483–2501. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00306>.
- (109) Meschaninova, M. I.; Entelis, N. S.; Chernolovskaya, E. L.; Venyaminova, A. G. A Versatile Solid-Phase Approach to the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates with Biodegradable Hydrazone Linker. *Molecules*. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26082119>.
- (110) Carmona, S.; Jorgensen, M. R.; Kolli, S.; Crowther, C.; Salazar, F. H.; Marion, P. L.; Fujino, M.; Natori, Y.; Thanou, M.; Arbuthnot, P.; Miller, A. D. Controlling HBV Replication in Vivo by Intravenous Administration of Triggered PEGylated SiRNA-Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (3), 706–717. <https://doi.org/10.1021/mp800157x>.
- (111) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>.
- (112) Chen, H.; Zhang, H.; Thor, D.; Rahimian, R.; Guo, X. Novel PH-Sensitive Cationic Lipids with Linear Ortho Ester Linkers for Gene Delivery. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 159–172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.013>.
- (113) Masson, C.; Garinot, M.; Mignet, N.; Wetzler, B.; Mailhe, P.; Scherman, D.; Bessodes, M. PH-Sensitive PEG Lipids Containing Orthoester Linkers: New Potential Tools for Nonviral Gene Delivery. *J. Control. Release* **2004**, *99* (3), 423–434. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.016>.
- (114) Rady, T.; Turelli, L.; Nothisen, M.; Tobaldi, E.; Erb, S.; Thoreau, F.; Hernandez-Alba, O.; Cianferani, S.; Daubeuf, F.; Wagner, A.; Chaubet, G. A Novel Family of Acid-Cleavable Linker Based on Cyclic Acetal Motifs for the Production of Antibody-Drug Conjugates with High Potency and Selectivity. *Bioconjug. Chem.* **2022**, *33* (10), 1860–1866. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00314>.
- (115) Aho, A.; Sulkanen, M.; Korhonen, H.; Virta, P. Conjugation of Oligonucleotides to Peptide Aldehydes via a PH-Responsive N-Methoxyoxazolidine Linker. *Org. Lett.* **2020**, *22* (17), 6714–6718. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01815>.

- (116) Aho, A.; Äärelä, A.; Korhonen, H.; Virta, P. Expanding the Scope of the Cleavable N-(Methoxy)Oxazolidine Linker for the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates. *Molecules*. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26020490>.
- (117) Aho, A.; Virta, P. Assembly of Split Aptamers by Dynamic PH-Responsive Covalent Ligation. *Chem. Commun.* **2023**, 59 (38), 5689–5692. <https://doi.org/10.1039/d3cc01158e>.
- (118) Aho, A.; Sulkanen, M.; Korhonen, H.; Virta, P. Conjugation of Oligonucleotides to Peptide Aldehydes via a PH-Responsive N-Methoxyoxazolidine Linker. *Org. Lett.* **2020**, 22 (17), 6714–6718. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01815>.
- (119) Aho, A.; Österlund, T.; Rahkila, J.; Virta, P. DNA-Templated Formation and N,O-Transacetalization of N-Methoxyoxazolidines. *European J. Org. Chem.* **2022**, 2022 (31), e202200583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejoc.202200583>.
- (120) Shay, J. W.; Bacchetti, S. A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer. *Eur. J. Cancer* **1997**, 33 (5), 787–791. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00062-2).
- (121) Pfeiffer, V.; Lingner, J. Replication of Telomeres and the Regulation of Telomerase. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, 5 (5), a010405. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010405>.
- (122) Le, H. T.; Miller, M. C.; Buscaglia, R.; Dean, W. L.; Holt, P. A.; Chaires, J. B.; Trent, J. O. Not All G-Quadruplexes Are Created Equally: An Investigation of the Structural Polymorphism of the c-Myc G-Quadruplex-Forming Sequence and Its Interaction with the Porphyrin TMPyP4. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10 (47), 9393–9404. <https://doi.org/10.1039/C2OB26504D>.
- (123) Berardinelli, F.; Sgura, A.; Facoetti, A.; Leone, S.; Vischioni, B.; Ciocca, M.; Antoccia, A. The G-Quadruplex-Stabilizing Ligand RHPS4 Enhances Sensitivity of U251MG Glioblastoma Cells to Clinical Carbon Ion Beams. *FEBS J.* **2018**, 285 (7), 1226–1236. <https://doi.org/10.1111/febs.14415>.
- (124) Zheng, X.-H.; Nie, X.; Liu, H.-Y.; Fang, Y.-M.; Zhao, Y.; Xia, L.-X. TMPyP4 Promotes Cancer Cell Migration at Low Doses, but Induces Cell Death at High Doses. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 26592. <https://doi.org/10.1038/srep26592>.
- (125) Dong, Y.; Yang, Z.; Liu, D. DNA Nanotechnology Based on I-Motif Structures.

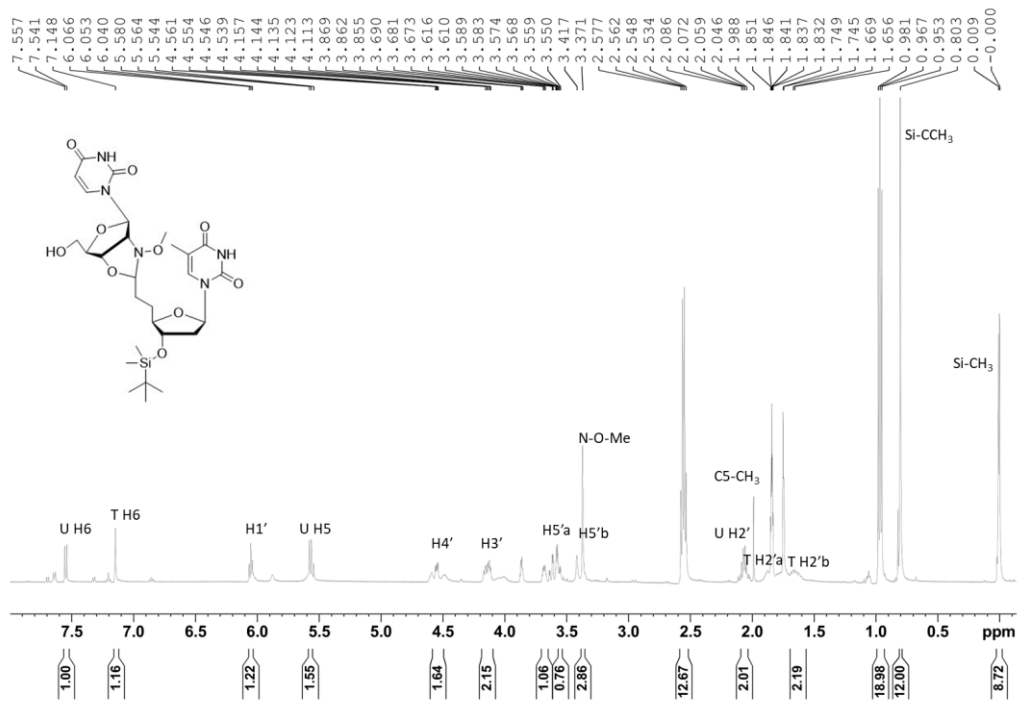
- Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (6), 1853–1860. <https://doi.org/10.1021/ar500073a>.
- (126) Caulfield, T. J.; Prasad, C. V. C.; Prouty, C. P.; Saha, A. K.; Sardaro, M. P.; Schairer, W. C.; Yawman, A.; Upson, D. A.; Kruse, L. I. Achiral Internucleoside Linkages: CH₂-CH₂-NH and NH-CH₂-CH₂ Linkages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3* (12), 2771–2776. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80761-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80761-7).
- (127) Ogawa, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. Nucleosides and Nucleotides. 180. Synthesis and Antitumor Activity of Nucleosides That Have a Hydroxylamino Group Instead of a Hydroxyl Group at the 2'- or 3'-Position of the Sugar Moiety. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (25), 5094–5107. <https://doi.org/10.1021/jm980466g>.
- (128) Dai, J.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. A.; Yang, D. Structure of the Hybrid-2 Type Intramolecular Human Telomeric G-Quadruplex in K⁺ Solution: Insights into Structure Polymorphism of the Human Telomeric Sequence. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (15), 4927–4940. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm522>.
- (129) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Jones, R. A.; Yang, D. Solution Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex Element in the Human c-MYC Promoter. Implications for G-Quadruplex Stabilization. *Biochemistry* **2005**, *44* (6), 2048–2058. <https://doi.org/10.1021/bi048242p>.

Haluaisin kiittää avovaimoani Mimosaa hienojen kuvaajien piirtämisestä ja henkisestä tukemisesta. Ilman sitä ei tästäkään graduista olisi tullut yhtikäs mitään. Kiitos ja anteeksi!

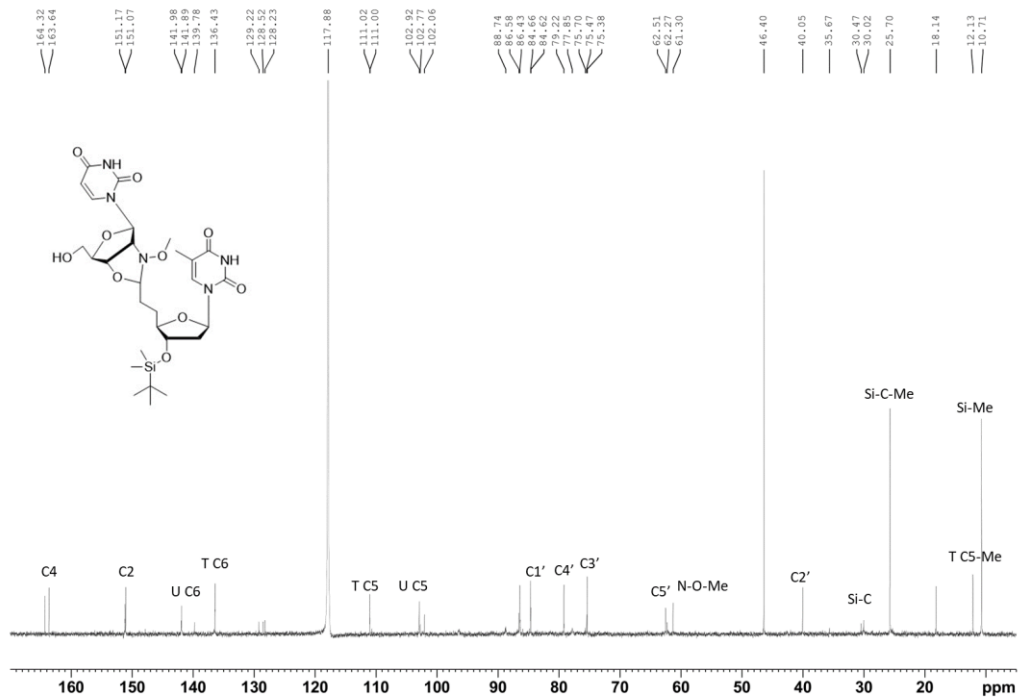
Ystävällisin terveisin

Tuomas

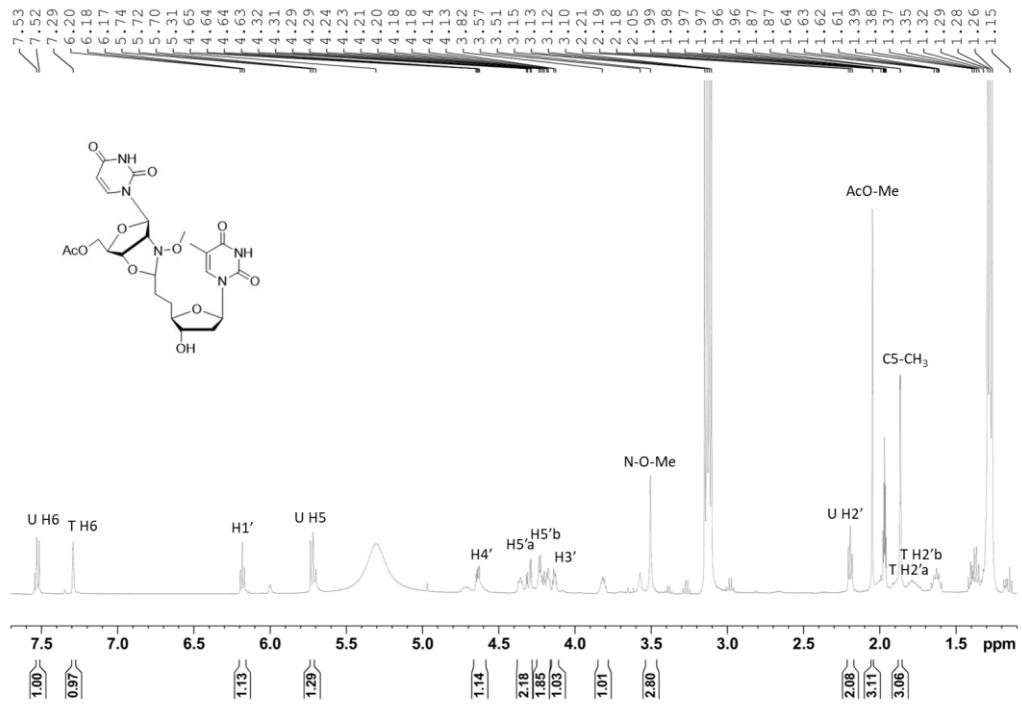
6 Liitteet



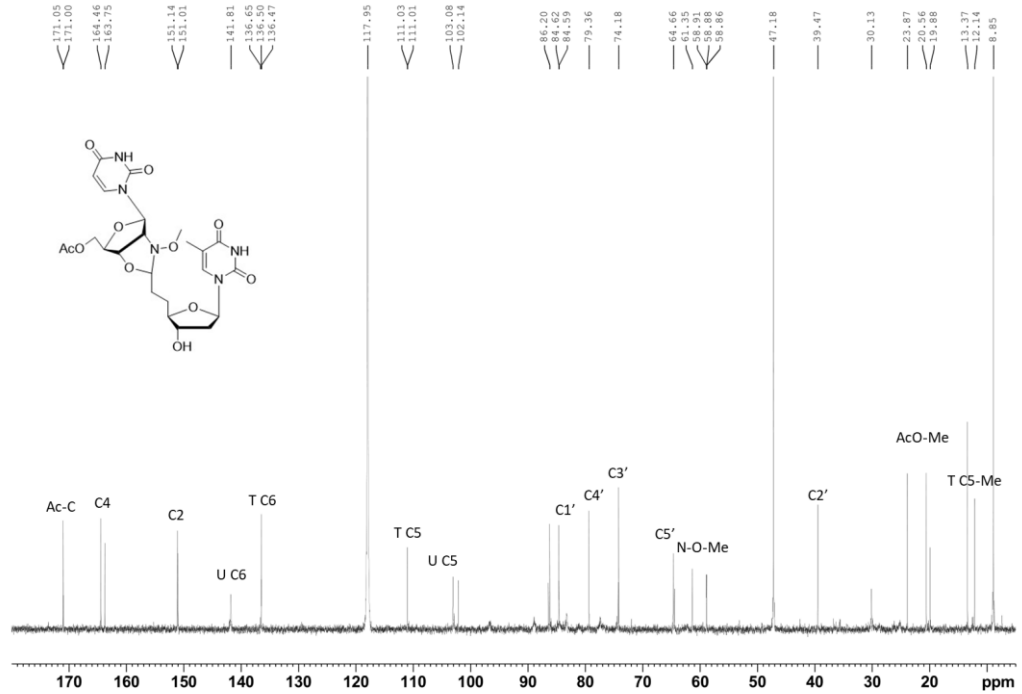
Liite 1. Tuotteen 4 H-NMR-spektri.



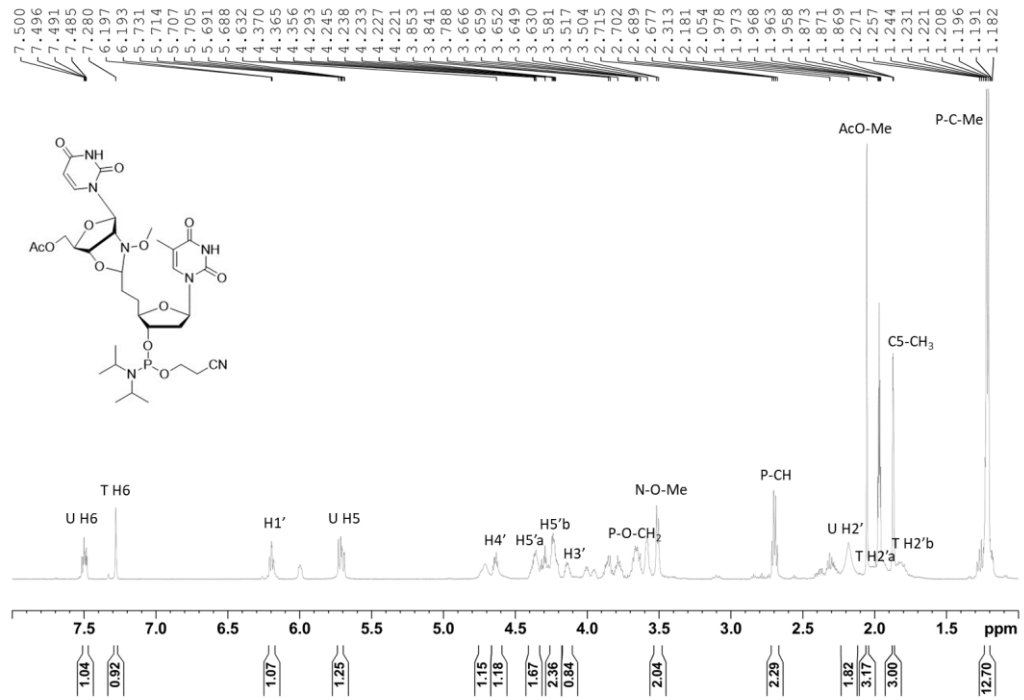
Liite 2. Tuotteen 4 C-NMR-spektri.



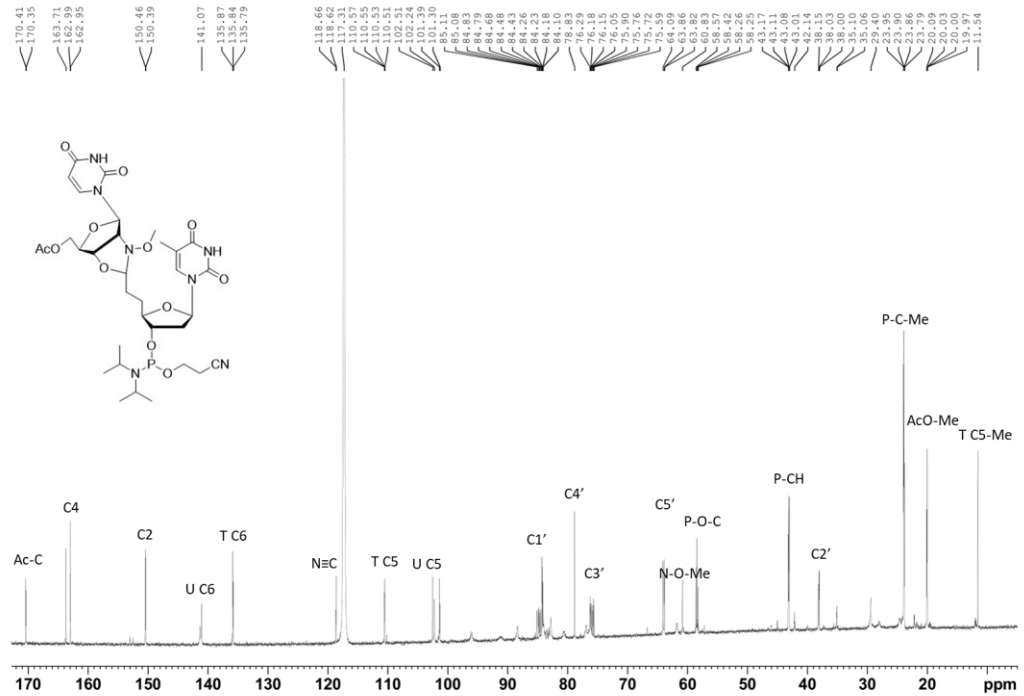
Liite 3. Tuotteen 6 H-NMR-spektri.



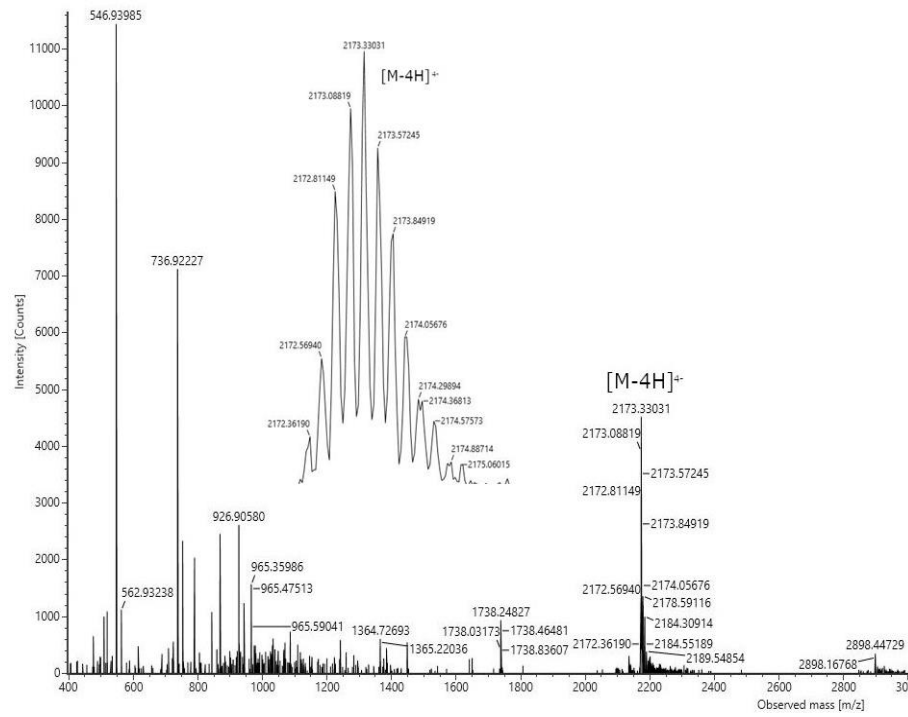
Liite 4. Tuotteen 6 C-NMR-spektri.



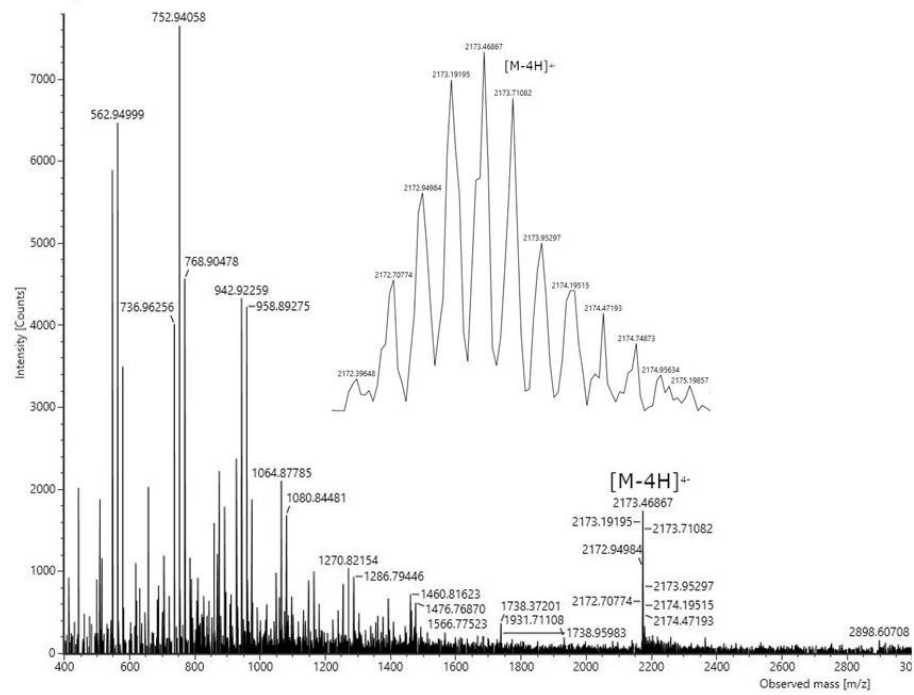
Liite 5. Tuotteen 7 H-NMR-spektri.



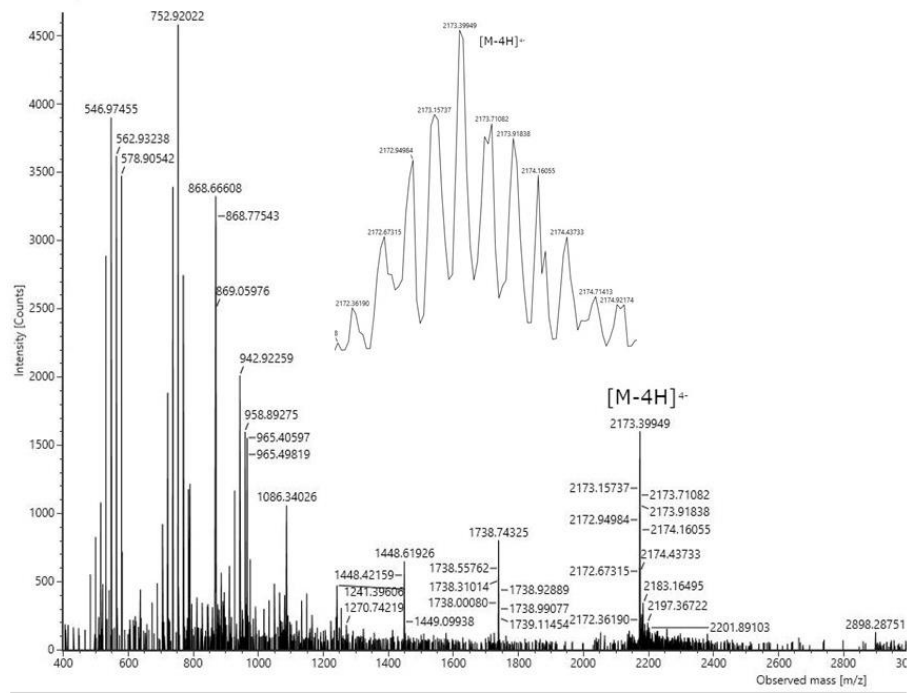
Liite 6. Tuotteen 7 C-NMR-spektri.



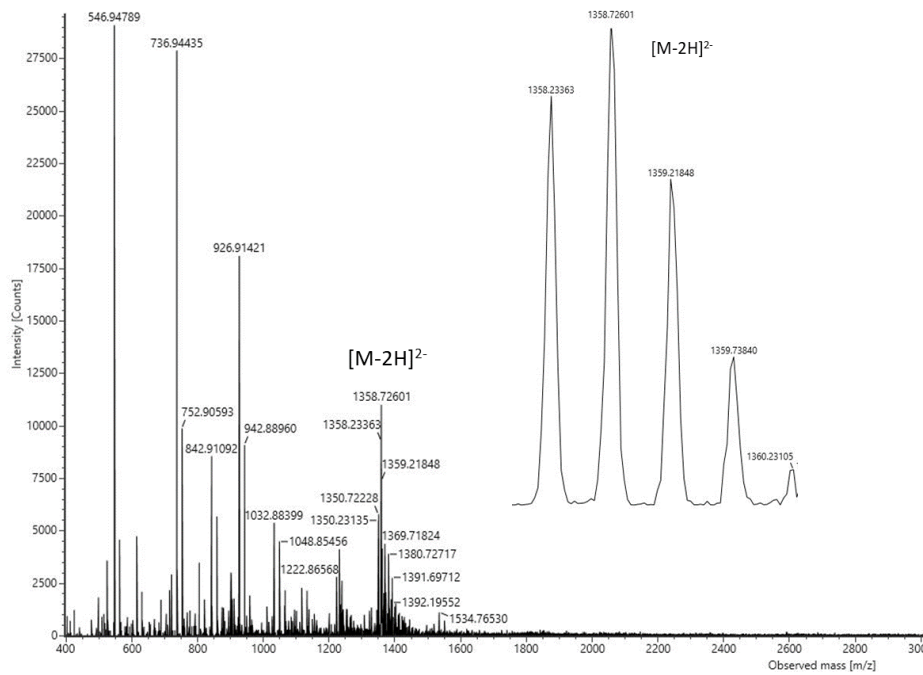
Liite 7. Oligonukleotidimallin L1 massaspekttri ja isotooppijakauma.



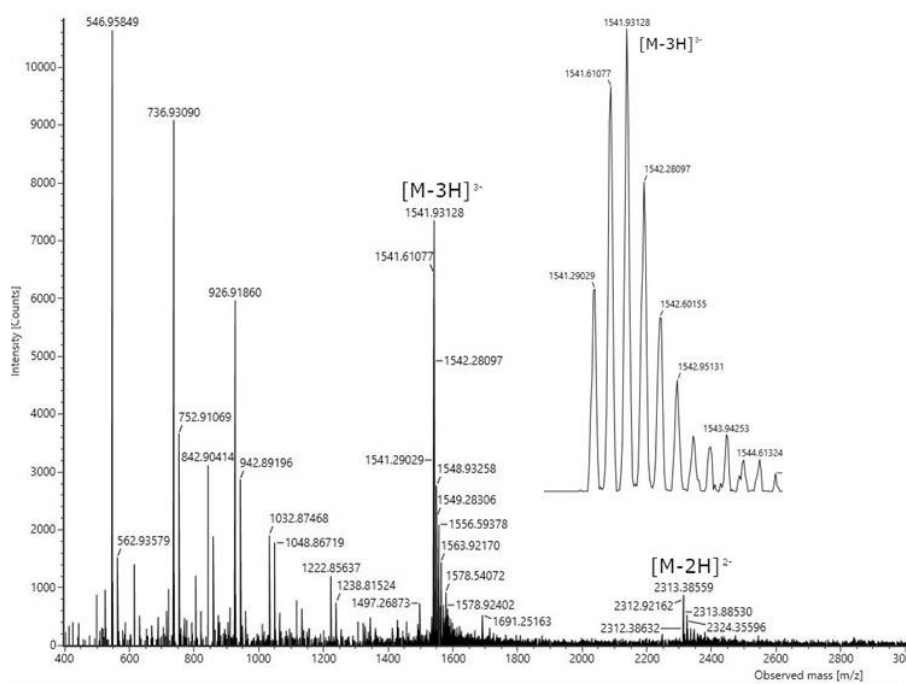
Liite 8. Oligonukleotidimallin L2 massaspekttri ja isotooppijakauma.



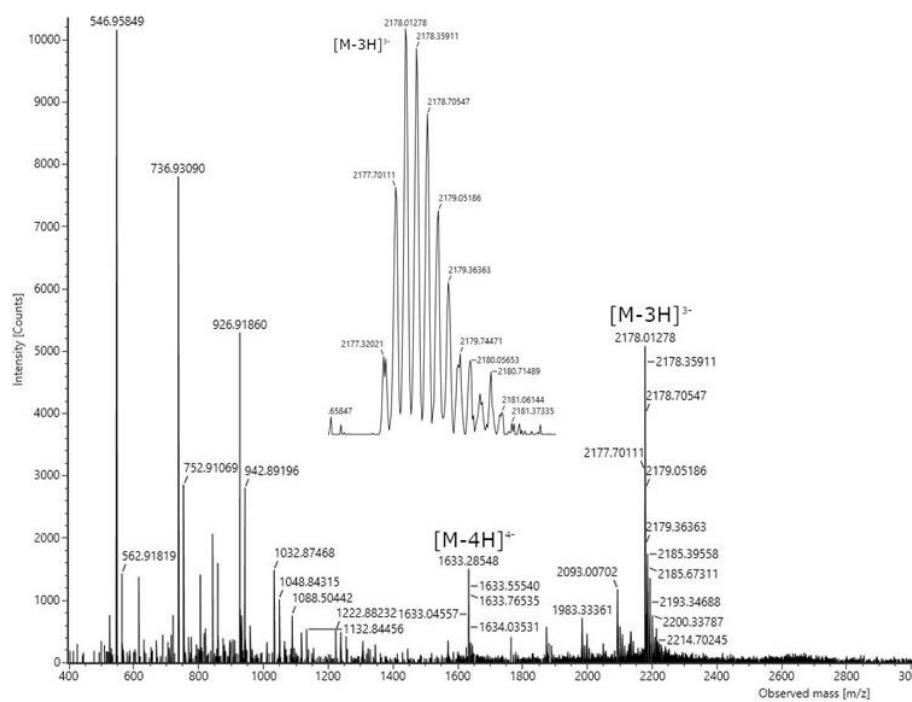
Liite 9. Oligonukleotidimallin L3 massaspektri ja isotooppijakauma.



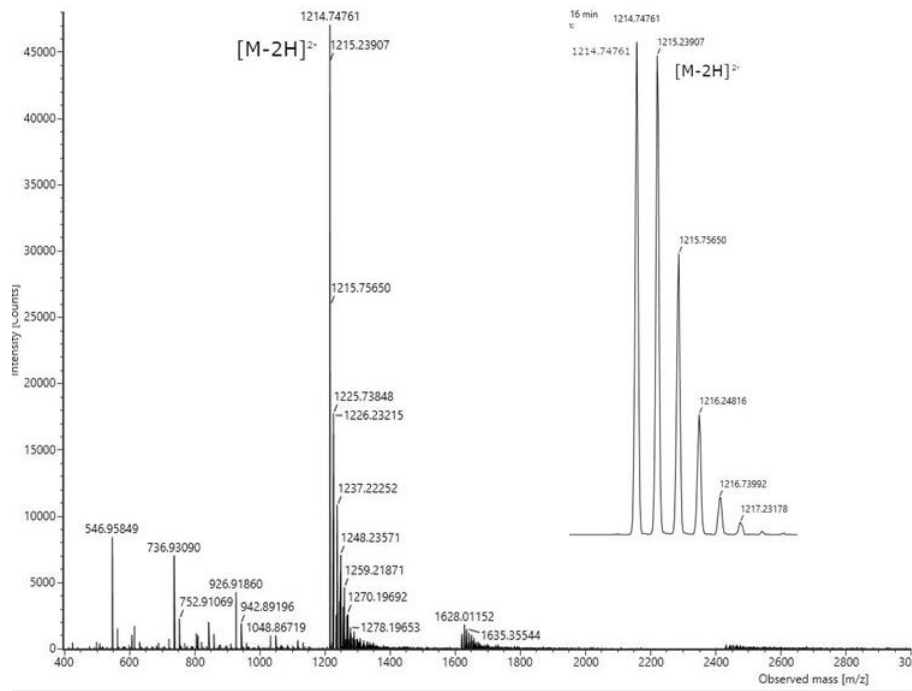
Liite 10. Oligonukleotidin ON1 massaspektri ja isotooppijakauma.



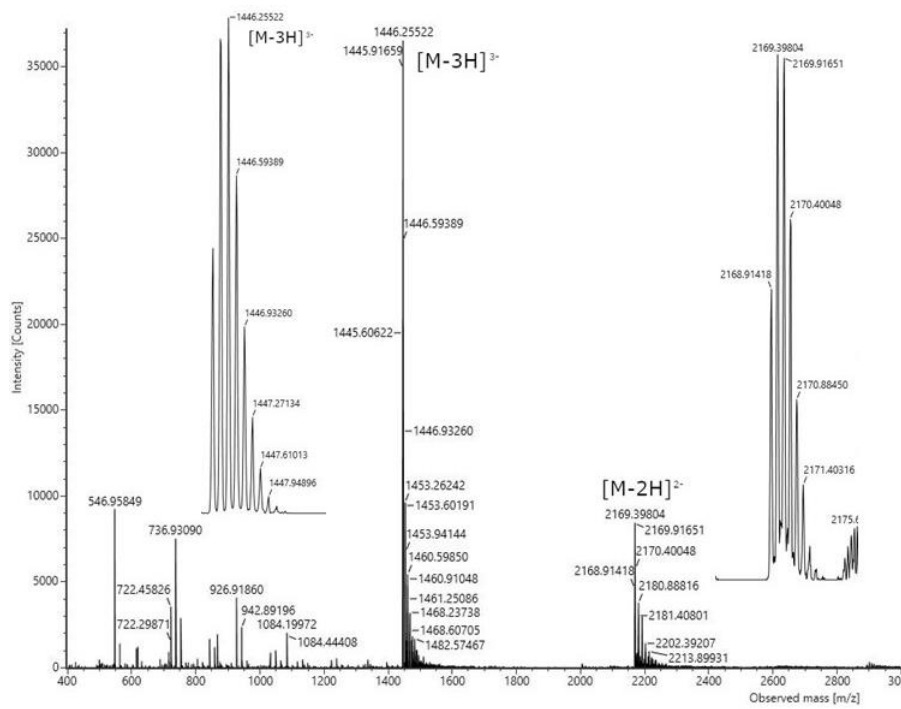
Liite 11. Oligonukleotidin ON2 massaspektri ja isotooppijakauma.



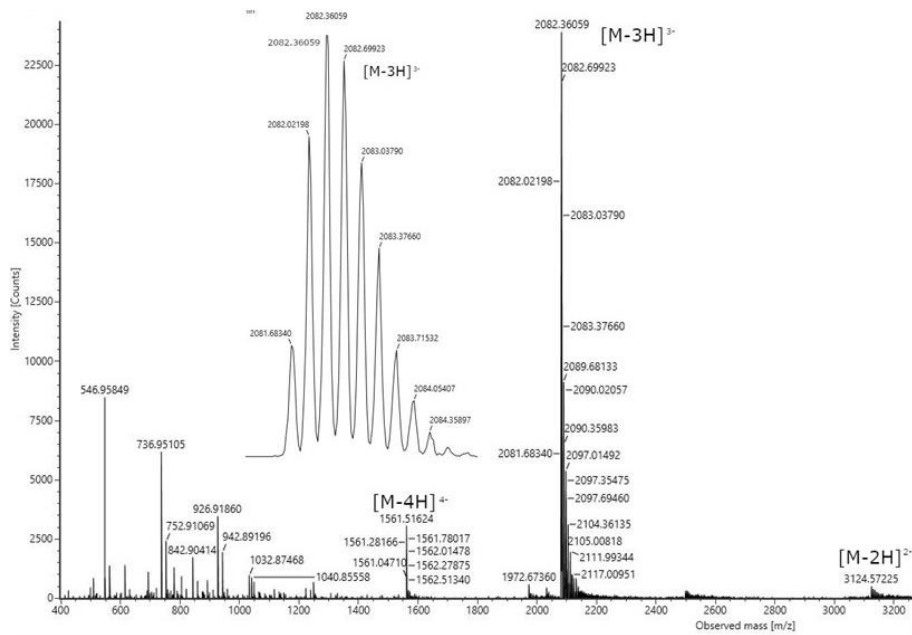
Liite 12. Oligonukleotidin ON3 massaspektri ja isotooppijakauma.



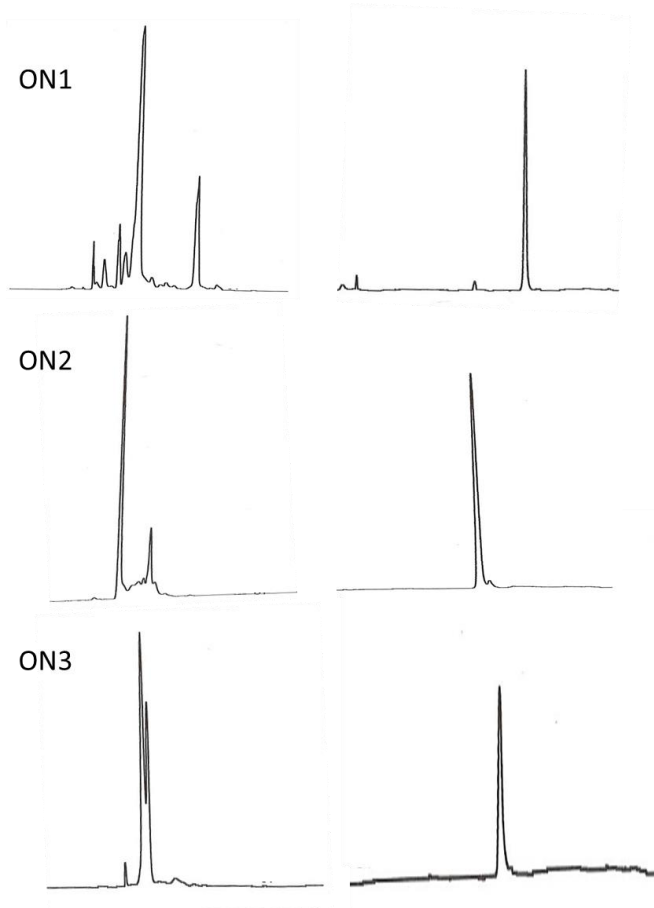
Liite 13. Oligonukleotidin ON4 massaspektri ja isotooppijakauma.



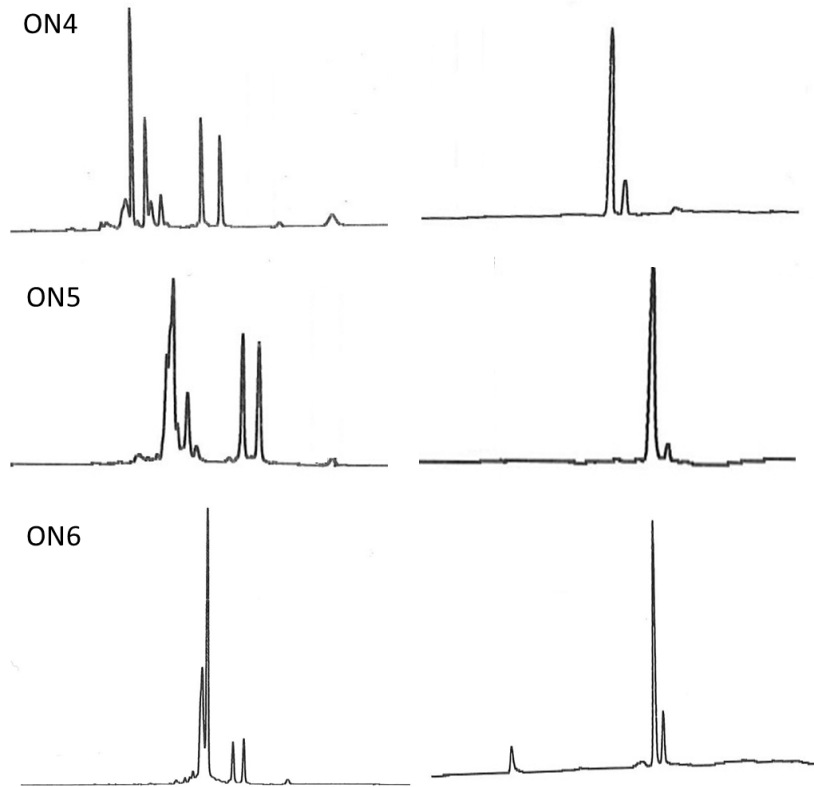
Liite 14. Oligonukleotidin ON5 massaspektri ja isotooppijakauma.



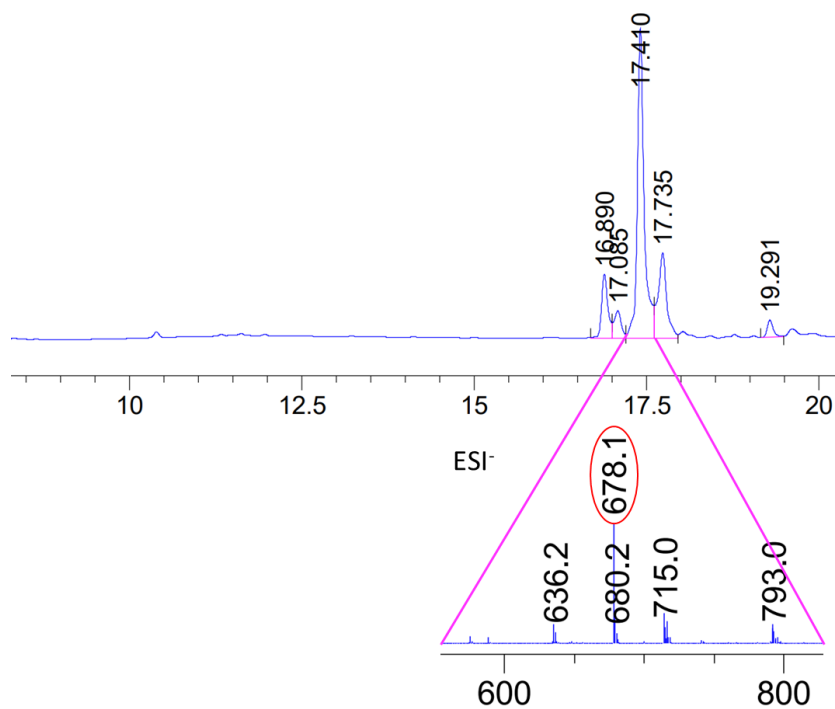
Liite 15. Oligonukleotidin ON6 massaspektri ja isotooppijakauma.



Liite 16. Oligonukleotidien ON1, ON2 ja ON3 nestekromatogrammit ennen puhdistusta ja puhdistuksen jälkeen.



Liite 17. Oligonukleotidien ON4, ON5 ja ON6 nestekromatogrammit ennen puhdistusta ja puhdistuksen jälkeen.



Liite 18. HPLC-MS laitteistolla analysoitu välituote 5. Kuvassa on HPLC-kromatogrammi selä negatiivisen ionisaation massaspektri.