

Organoelohopea-aptameerit LA-ICP-MS-merkkiaineina

Ida Sarin

Pro gradu -tutkielma

Bio-orgaaninen kemia

Kemian laitos

Turun yliopisto

Heinäkuu 2024

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

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Bio-orgaaninen kemia

Tekijä: Ida Sarin

Otsikko: Organoelohopea-aptameerit LA-ICP-MS-merkkiaineina

Ohjaaja: Tuomas Lönnberg

Sivumäärä: 28 s. 10 liites.

Päiväys: Heinäkuu 2024

Aptameerit ovat yksijuosteisia DNA- ja RNA-molekyylejä, joilla on kyky sitoutua lujasti kohteeseensa. Sitoutumisominaisuuksiensa vuoksi aptameerit ovat kiinnostava kohde erilaisiin lääkekehityksen sovelluksiin. Aptameerit valmistetaan SELEX-menetelmällä ja niiden ominaisuuksia voidaan muokata monin eri tavoin.

LA-ICP-MS-kuvantaminen (eng. *Laser inductively coupled plasma mass spectrometry*) on menetelmä, jolla voidaan kuvantaa alkuaineiden jakautumista kiinteissä näytteissä. Menetelmässä näytettä käsitellään korkeaenergisellä lasersäteellä. Laser irrottaa näytteestä hiukkasia, jotka kuljetetaan eteenpäin ionisoitavaksi ICP:lle ja siitä eteenpäin analysoitavaksi MS-laitteistolle. Analyysin pohjalta voidaan muodostaa korkearesoluutioisia karttoja näytteen alkuainekoostumuksista.

Tämän työn tarkoituksena oli valmistaa organoelohopealeimattu aptameeri ja soveltaa sitä LA-ICP-MS-kuvantamisessa. Aptameeriksi valikoitui tunnettu aptameeri, jonka kohteena on syöpäsolun pintaproteiinit. Organoelohopealeima olisi mahdollista havaita LA-ICP-MS-menetelmällä. Jos tällainen leima olisi kiinnitettynä aptameeriin olisi mahdollista paikantaa aptameeri ja näin ollen myös aptameerin kohde.

Aptameerit valmistettiin kiinteän kantajan menetelmällä automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla. Syntetisoituun aptameeriin konjugoitiin linkkerin välityksellä organoelohopea-aldehydi. Organoelohopea-aldehydin liittämässä hyödynnettiin vakiintunutta oksimaatioreaktiota. Aptameerien HPLC-puhdistuksessa oli haasteita mutta oikeanlaisen kolonnin avulla puhdistus onnistuttiin suorittamaan. Aptameerit karakterisoitiin massaspektrometrisesti. Valmistetun organoelohopea-aptameerin detektoraja määritettiin LA-ICP-MS menetelmällä käyttäen matriisina hiiren aivokudosta. Mittausten perusteella todettiin, että jo 5 nM laimennoksella saadaan selkeästi taustasta erottuva signaali elohopeasta.

Avainsanat: Oligonukleotidi, Aptameeri, Organoelohopea, LA-ICP-MS

Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	1
1.1. Aptameerit.....	1
1.1.1. Määritelmä.....	1
1.1.2. SELEX.....	2
1.1.3. Edut ja rajoitteet.....	4
1.1.4. Modifiointi.....	5
1.1.5. Aptameerit vs. vasta-aineet.....	7
1.1.6. Sovellukset.....	8
1.2. LA-ICP-MS.....	8
1.2.1. Määritelmä.....	8
1.2.2. Laitteisto	9
1.2.3. Hyödyt ja rajoitteet	10
1.2.4. Sovellukset.....	11
1.2.5. Organoelohopea alkuaineleimana.....	12
1.3. Työn tarkoitus.....	13
2. Tulokset ja niiden tarkastelu	15
2.1. 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydin (2) synteesi.....	15
2.2. 2-syanoetyyli (2-((1,3-dioksoisindolin-2-yyli)oksi)etyyli) diisopropyylifosforamidiitin synteesi (5) 16	
2.3. Oligonukleotidisynteesit	16
2.4. LA-ICP-MS-detektorajan määrittäminen.....	23
3. Materiaalit ja menetelmät	23
3.1. Yleiset menetelmät.....	23
3.2. 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydi (2)	24
3.3. 2-(2-hydroksietoksi)isindoline-1,3-dioni (4).....	25
3.4. 2-syanoetyyli(2-((1,3-dioksoisindolin-2-yyli)oksi)etyyli)diisopropyylifosforamidiitti (5)	25
3.5. Oligonukleotidisynteesit	25
3.6. LA-ICP-MS-detektorajan määrittäminen.....	26
4. Johtopäätökset ja yhteenveto	27
5. Viitteet	29
6. Liitteet.....	31

Lyhenneluettelo

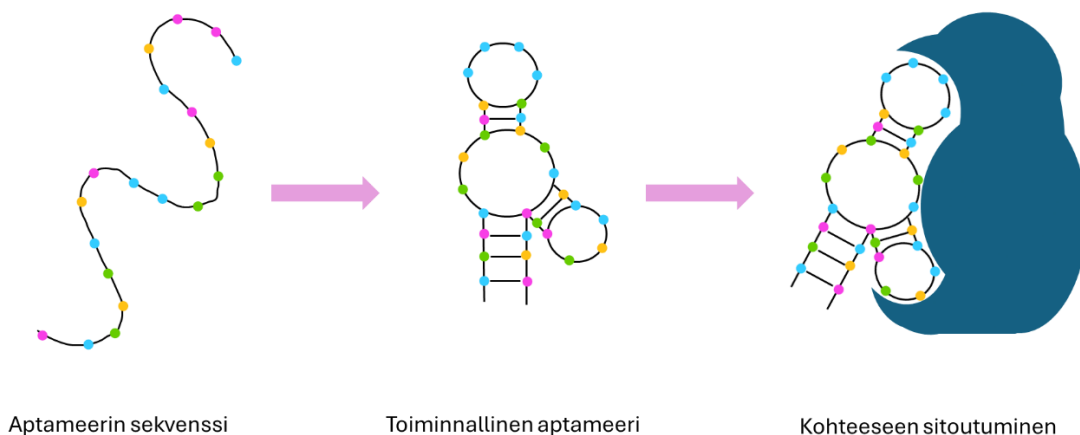
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
RNA	Ribonukleiinihappo
SELEX	Engl. Selective expansion of ligands by exponential enrichment
PCR	Polymeraasiketjureaktio
RT-PCR	Käänteinen polymeraasiketjureaktio
dNTP	Deoksinukleosiditriposfaatti
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (Engl. Food and Drug Administration)
LNA	Lukittu nukleiinihappo (Engl. Locked nucleic acid)
UNA	Lukitsematon nukleiinihappo (Engl. Unlocked nucleic acid)
IMC	Engl. Imaging mass cytometry
LA	Laserablaatio
ICP-MS	Induktiivisesti kytketty plasma-massaspektrometria (Engl. Inductively coupled plasma mass spectrometry)
TOF	Lentoaika-analysaattori (Eng. time-of-flight)
MRI	Magneettikuvaus (engl. Magnetic resonance imaging)
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi (Engl. Nuclear magnetic resonance)
DCM	Dikloorimetaani
DMSO	Dimetyylisulfoksidi

1. Johdanto

1.1. Aptameerit

1.1.1. Määritelmä

Aptameerit ovat oligonukleotideja, kuten yksijuosteisia DNA ja RNA- molekyyliä. Aptameereilla on kyky sitoutua tiettyyn kohteeseen korkealla affiniteetilla. Sitoutuminen perustuu aptameerin rakenteeseen. Oligonukleotidi laskostuu nukleiinihapposekvenssin määräämään tiettyyn kolmiulotteiseen muotoon, joka on komplementaarinen kohteen kanssa. Muodostunut toiminnallinen aptameeri kiinnittyy kohteeseensa vetysidosten, sähköstaattisten vuorovaikutusten ja Van der Waalsin voimien avulla.¹ Sitoutumistapa riippuu siitä mikälainen ja mikä kokoinen kohdemolekyyli on. Aptameerin ollessa kohdettaan suurempi, se sitoutuu yleensä integroimalla kohteen rakenteeseensa. Kohdemolekyylin ollessa aptameeria suurempi aptameeri puolestaan integroituu kohteen rakenteeseen tai kiinnittyy sen pinnalle.² Aptameerien sitoutumiskohteita ovat esimerkiksi erilaiset proteiinit³, peptidit⁴, nukleotidit⁵, toksiinit⁶ ja pienmolekyylit⁷. Monipuolisten sitoutumisominaisuuksiensa ja spesifisyytensä vuoksi aptameerit ovat kiinnostava kohde esimerkiksi lääkekehityksessä.¹

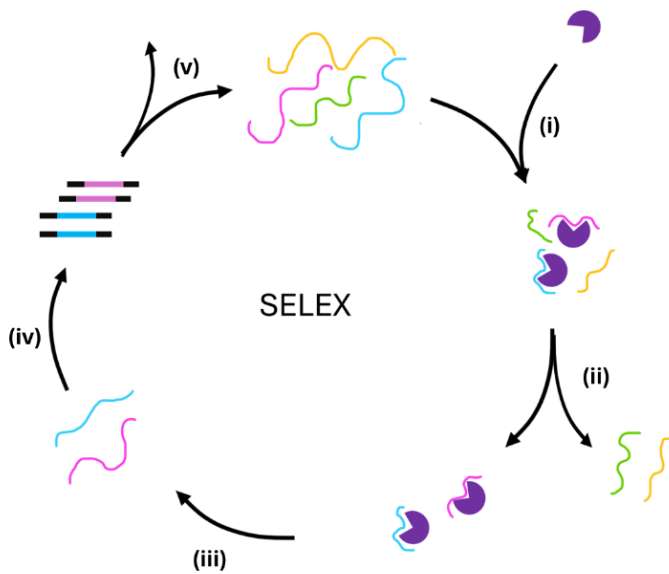


Kuva 1. Nukleiinihapposekvenssi laskostuu toiminnalliseksi aptameeriksi, joka sitoutuu kohteeseen rakenteensa avulla.

1.1.2. SELEX

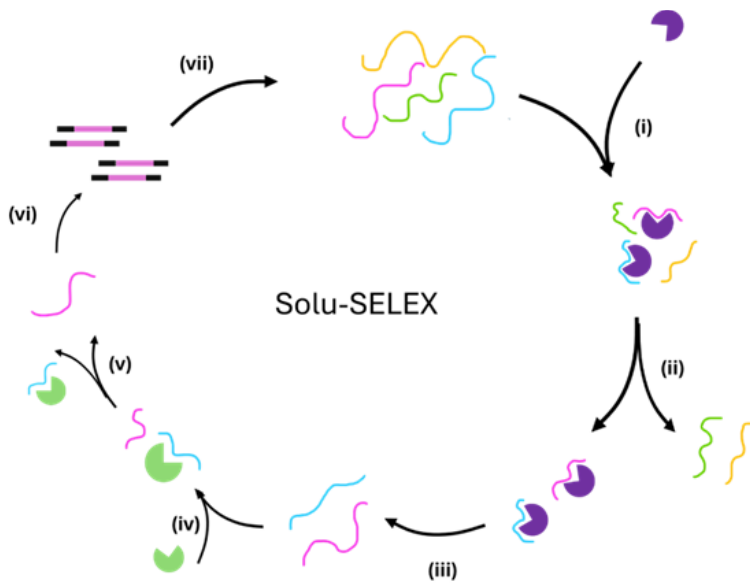
Aptameerit luodaan SELEX (*eng. selective expansion of ligands by exponential enrichment*) -menetelmällä in vitro. SELEX on Ellingtonin ja Szostakin⁸ ja Tuerkin ja Goldin⁹ 1990-luvulla kehittämä menetelmä.¹⁰ SELEX luotiin iteratiiviseksi menetelmäksi, jonka avulla aptameereja voitaisiin tunnistaa ja eristää laajasta nukleinihappojen joukosta. Aptameerit erotellaan niiden kyvyn sitoutua haluttuun kohteeseen ja haluttujen biokemiallisten aktiivisuuksien perusteella. Perinteinen SELEX koostuu sykleistä, joissa toistuu inkubaatio, sitoutuminen, erottelu ja monistus (Kuva 2). Tässä luvussa esitellään perinteinen SELEX sekä siitä sovellettu solu-SELEX.

SELEX-menetelmä alkaa kombinatorisesta oligonukleotidisekvenssien kirjastosta, joka on luotu tavanomaisella automaattisella oligonukleotidien synteesillä. Tyypillinen sekvenssi on pituudeltaan 20-40 nukleotidin mittainen ja eri oligonukleotideja kuuluu kirjastoon noin 10^{12} - 10^{15} . Oligonukleotidisekvenssit inkuboidaan kohdemolekyylien kanssa. Osa sekvensseistä sitoutuu kohteeseensa lujasti, osa heikommin ja osa jää vapaiksi. Seuraavaksi sekvenssit, jotka sitoutuivat heikosti tai ei ollenkaan, erotellaan kohteeseen sitoutuneista sekvensseistä. Kohteeseen sitoutuneet sekvenssit eluoidaan ja monistetaan. Sekvenssien eluointi sisältää yleensä vaiheen, jossa kohteeseen sitoutuneet sekvenssit kuumennetaan noin 95-100°C:seen. Tämä heikentää vetysidoksien voimakkuutta ja irrottaa sekvenssit kohteistaan.¹¹ DNA-sekvenssit monistetaan PCR-tekniikalla (polymeraasiketjureaktio) ja RNA-sekvenssit RT-PCR-tekniikalla (käänteinen polymeraasiketjureaktio). Monistetuista sekvensseistä voidaan muodostaa uusi sekvenssikirjasto ja uusi SELEX-sykli voidaan aloittaa. Syklejä toistetaan yleensä noin 5-15 kertaa, jonka jälkeen koossa on useita oligonukleotideja, jotka kykenevät sitoutumaan lujasti kohteeseensa. Tässä vaiheessa kirjaston nukleotidisekvenssit voidaan määrittää ja sekvenssien sitoutumisaffiniteettia ja spesifisyyttä voidaan vertailla ja mitata tarkasti. SELEX:llä pystytään usein löytämään aptameereja, joilla on korkea affiniteetti kohteeseensa. Tällaisten aptameerien dissosiaatiovakio (K_D) sijoittuu mikro- ja nanomolaariselle alueelle.¹²



Kuva 2. Perinteinen SELEX sykli. i) Kohdemolekyylit inkuboidaan oligonukleotidisekvenssien kanssa, ii) Sitoutumattomat oligonukleotidit erotetaan, iii) Sitoutuneet oligonukleotidit eluoidaan ja iv) monistetaan ja v) sekvenssit määritetään ja sykli voidaan toistaa. (Kuva piirretty mukailien artikkelista ¹³)

Aptameereja voidaan luoda myös solu-SELEX -menetelmällä. Solu-SELEX on periaatteeltaan samanlainen kuin perinteinen SELEX mutta tässä tapauksessa aptameerin kohteena on kokonainen solu. Solu-SELEX:ssä on kolme päävaihetta, jotka ovat esiteltynä kuvassa 3. Kohdesolut inkuboidaan oligonukleotidikirjaston kanssa tietyn ajan ja tietyssä lämpötilassa. Tämän jälkeen aptameerit, jotka eivät ole sitoutuneet kohteeseensa, poistetaan ja sitoutuneet aptameerit eluoidaan. Eluoidut aptameerit monistetaan PCR-menetelmällä ja niitä käytetään seuraavalla kierroksella. Aptameerien spesifisyyden lisäämiseksi menetelmässä käytetään myös kohdetta sisältämättömiä eli ns. negatiivisia soluja. Negatiiviset solut inkuboidaan eluoitujen aptameerien kanssa ja sitoutumattomat sekvenssit eristetään ja monistetaan PCR-menetelmällä. Tällä tavalla saadaan eroteltua aptameerien joukosta pois sekvenssit, joilla on affiniteetti myös negatiivisiin soluihin. Tämän vuoksi solu SELEX sisältää usein positiivisen valikoiman kohdesolua vastaan ja negatiivisen valikoiman kohdesolun kaltaisia soluja vastaan. ¹²



Kuva 3. Solu-SELEX sykli. i) Kohdesolut inkuboidaan oligonukleotidisekvenssien kanssa, ii) sitoutumattomat oligonukleotidit erotetaan, iii) sitoutuneet oligonukleotidit eluoidaan, iv) negatiiviset solut inkuboidaan oligonukleotidien kanssa, v) sitoutumattomat sekvenssit eristetään, vi) sitoutumattomat sekvenssit monistetaan, vii) Sykli toistetaan. (Kuva piirretty mukaillen artikkelista¹⁴)

Solun pinta on monimutkainen ja sisältää paljon erilaisia molekyyliä. Näin ollen solu-SELEX:llä kyetään eristämään aptameereja monia erilaisia solussa sijaitsevia kohteita vastaan. Solun pinnalla olevat molekyylit ovat ns. natiivitulassa ja omaavat luonnollisen konformaation. Solu-SELEX:issä kohdemolekyyliä ei tarvitse puhdistaa, joka on menetelmän etu. Solu-SELEX:n etuna on myös, että aiempaa tietoa kohteen rakenteesta ei tarvita. Tämän ominaisuuden vuoksi solu-SELEX on kiinnostava menetelmä aptameerien tuottamiseen. Tällä tavoin olisi mahdollista löytää aptameereja, jotka voisivat tunnistaa ja sitoutua erilaisiin solupopulaatioihin. Tällaisia tutkittuja kohteita ovat esimerkiksi lymfaattinen leukemia¹⁵, maksasyöpäsolut¹⁶, pienisoluinen keuhkosityöpä¹⁷, mahasyöpäsolut¹⁸ ja dendriittisolut^{19, 12}.

1.1.3. Edut ja rajoitteet

Aptameereilla on useita erilaisia etuja, jotka mahdollistavat niiden käytön laajasti erilaisissa sovelluksissa. Aptameereja vertaillaan usein vasta-aineisiin ja kyseistä aihetta käsitellään myöhemmin luvussa 1.1.5. Aptameerien etuja on esimerkiksi niiden pieni 6-30 kDa:n koko, mikä

mahdollistaa helpon pääsyn esimerkiksi sisälle kudokseen. Aptameereja voidaan käyttää uudestaan ja ne ovat kestäviä erilaisissa olosuhteissa. Aptameerien valmistus on myös edullista esimerkiksi luvussa 1.1.5 esiteltäviin vasta-aineisiin verrattuna ja niitä voidaan muokata kemiallisesti monin eri tavoin.²⁰

Aptameerit ovat kuitenkin alttiita nopealle nukleasivälitteiselle hajoamiselle. Modifioimattomat aptameerit eivät selviä sellaisenaan pitkiä aikoja vaan endo- ja eksonukleasit hydrolysoivat ne nopeasti.¹ Esimerkiksi erään tunnetun DNA-aptameerin, jonka kohteen on trombiini-entsyymi, puoliintumisajan on todettu olevan vain noin 108 sekuntia *in vivo*.²¹ Keratinosyyttien kasvua tunnistava RNA-aptameeri hajoaa puolestaan muutamassa sekunnissa ihmisen seerumissa.²² Myös lämpötilalla on todettu olevan merkittävä vaikutus aptameerien sitoutumistehokkuudelle ja niiden hajoamiselle.^{22,1} Aptameerit ovat myös alttiita poistumaan verenkierrosta munuaissuodatuksen seurauksena. Pienen kokonsa vuoksi aptameerit erittyvät munuaisten kautta nopeasti.¹

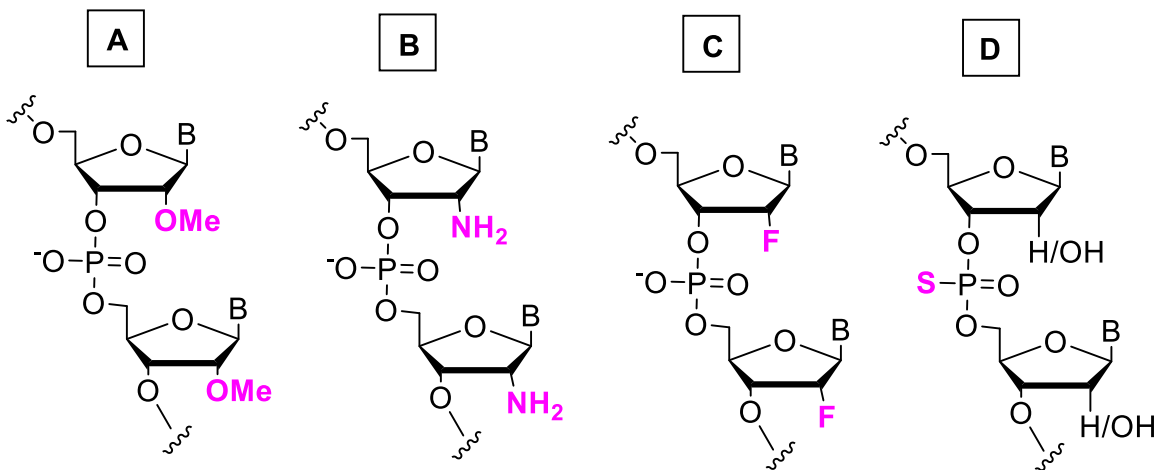
1.1.4. Modifiointi

Aptameerien diagnostista ja terapeutista tehokkuutta voidaan parantaa erilaisilla strategioilla. Yksi tällainen strategia on aptameerin nukleotidirakenteen modifioiminen. Modifioinnilla voidaan vaikuttaa esimerkiksi aptameerien lämpöstabiiliuteen, kohteen ulkopuoliseen sitoutumiseen ja nukleasivälitteiseen hajoamiseen. Modifioinnilla voidaan myös parantaa vaativampiin kohteisiin sitoutumista.¹

Aptameereja voidaan muokata SELEX:n aikana lisäämällä muokattuja deoksinukleosiditriposfaatteja (dNTP) syklin aikana tai vaihtoehtoisesti SELEX:n jälkeen. SELEX:n jälkeen aptameeriin voidaan tehdä muokkauksia käyttämällä kiinteän faasin oligonukleotidisynteesiä. Muokkauksia voidaan tehdä kasvavaan oligonukleotidiketjuun lisäämällä modifioituja fosforamidiittirakennuspalikoita ketjun sisäisiin kohtiin ja/tai 3'- ja 5'-päihin.¹

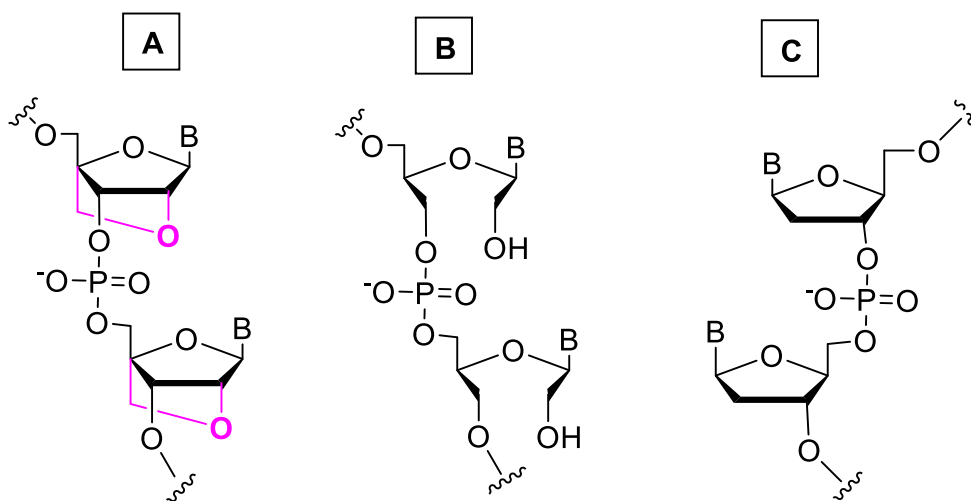
Muokkaamalla (deoksi-)riboosin sokeryyksikön 2'-asemaa tai fosfaattiryhmiä, aptameerin resistenssiä nukleasivälitteistä hajoamista vastaan voidaan parantaa. RNA:n 2'-hydroksiryhmän korvaaminen fluoriatomilla (2'-F) tai metoksi- (2'-OMe) tai aminoryhmällä (2'-NH₂) parantaa huomattavasti aptameerin kestävyyttä (Kuva 4.). Tunnettu aptameeri, jonka sokeriesä on muokattu, on Pegaptanib, joka on FDA:n hyväksymä oligonukleotidipohjainen lääke neovaskulaarisen ikään liittyvän silmänpohjan rappeuman hoitoon.²³

Fosfaattiryhmä voidaan modifioida fosforotioaatiksi korvaamalla happiatomi rikkiatomilla (Kuva 4.). Tämä modifikaatio suojaa nukleaasien katalysoimalta hajoamiselta ja parantaa huomattavasti aptameerin puoliintumisaikaa seerumissa ja soluissa²⁴. Fosforotioaatin tiedetään myös pidentävän antisense-oligonukleotidipohjaisten lääkkeiden viipymistä verenkierrossa, sillä se sitoutuu epäspesifisesti plasman proteiineihin. Tämä estää niiden nopeaa erittymistä munuaisten kautta. Käytetyin menetelmä hidastaa oligonukleotidien erittymistä pois verenkierrosta, ja samalla parantaa niiden puoliintumisaikaa, on konjugoita oligonukleotidiin suuria molekyyliä. Kun molekyyylimassa ylittää 30-50 kDa:n rajan, munuaiset eivät kykene poistamaan niitä enää yhtä helposti.¹



Kuva 4. Modifioituja rakenteita nukleasiresistenssin parantamiseksi. A = 2'-metoksi-RNA, B = 2'-amino-RNA, C = 2'-fluori-RNA ja D = fosforotioaatti-DNA/RNA.

Edellä mainittujen modifiointien pohjalta nukleotidirunkoon on sovellettu monimutkaisempia niin kutsuttuja ”toisen sukupolven” muutoksia. Tällaisia on esimerkiksi RNA:ta imitoiva lukittu nukleiinihappo LNA (*eng. locked nucleic acid*, kuva 5.). LNA:n rakenteessa sokerin O2'-atomi on liitetty sokerin C4'-hiileen metyleenilinkkerillä. Kyseisten rakenneyksiköiden sisällyttämisen oligonukleotidiin on todettu parantavan oligonukleotidin lämpöstabiiliutta ja spesifisyyttä komplementaarille sekvensseille.²⁵ UNA (*eng. unlocked nucleic acid*) on yksi vaihtoehtoinen kandidaatti aptameerien muokkaamiseen (kuva 5.). UNA on asyklinen RNA-analogi, josta puuttuu C2'- ja C3'-hiilten välinen sidos. Yksi kiinnostava aptameerin modifikaatio on Spiegelmer-aptameerit (kuva 5).²⁶ Ne koostuvat L-nukleotideista, jotka ovat luonnollisten D-nukleotidien peilikuvia.



Kuva 5. Modifioituja rakenteita nukleaasiresistenssin parantamiseksi. A = LNA, B = UNA ja C = Spiegelmer.

1.1.5. Aptameerit vs. vasta-aineet

Aptameereja kuvataan monesti synteettisiksi vastineiksi vasta-aineille. Vasta-aineet ovat osa elimistön puolustusjärjestelmää. Ne ovat immuunijärjestelmän tuottamia proteiineja, jotka sitoutuvat elimistössä tuntemattomiin haittatekijöihin kuten erilaisiin bakteereihin ja viruksiin, haitaten niiden toimintaa tai merkaten ne tuhottavaksi. Erilaisia vasta-aineita voidaan myös tuoda elimistöön esimerkiksi rokotteiden avulla. Tyypillinen vasta-aineen rakenne on Y-kirjaimen muotoinen, jonka kärkiosissa on kaksi identtistä antigeeniä sitovaa kohtaa. Häntäosassa puolestaan on sitoutumiskohtia komplementaarille proteiineille sekä solun pintareseptoreille. Antigeeniä sitovalla kohdalla on uniikki rakenne, jonka vuoksi se kykenee sitoutumaan tiettyyn antigeeniin spesifisesti. Aptameerien ja vasta-aineiden sitoutuminen ja sovelluskohteet muistuttavat toisiaan. Aptameereillä on kuitenkin tiettyjä etuja minkä vuoksi ne kykenevät kilpailemaan vasta-aineiden käytön kanssa.²⁷

Aptameerit ovat yleisesti ottaen stabiilimpia kuin vasta-aineet ja niiden elinaika on myös pidempi. Aptameerien valmistusprosessi on yksinkertainen ja edullinen verrattuna vasta-aineisiin.²⁸ Aptameerit ovat kooltaan noin kymmenesosan vasta-aineiden koosta. Tämä edesauttaa niiden pääsyä solujen sisään vasta-aineita paremmin.²⁸ Aptameerien koko mahdollistaa myös niiden kiinnittymisen kohteisiin, jotka ovat vasta-aineille liian pieniä. Myös steeristen esteiden riski on näin ollen aptameereilla pienempi.¹¹

Aptameerit syntetisoidaan kemiallisesti, joten niiden muokkaaminen on helpompaa kuin vasta-aineiden. Esimerkiksi aptameerien sitoutumisominaisuuksia ja niiden stabiiliutta voidaan parannella. Muutoksia voidaan tehdä aptameerein nukleotidiketjuun melkein mihin tahansa haluttuun kohtaan niin kuin luvussa 1.1.4. käsiteltiin.²³ Vasta-aineita voidaan myös muokata kemiallisesti, mutta se on kuitenkin selkeästi hankalampaa. Myös esimerkiksi leimoja ja linkkereitä voidaan kiinnittää aptameerien nukleinihappoketjuun niin, että ne eivät häiritse kohteeseen sitoutumista.²⁸

Aptameerien toksisuus on matala ja ne eivät ole immunogeenisiä vasta-aineiden tapaan. Aptameerejä voidaan myös valmistaa *in vitro* -prosessilla kohteille, jotka ovat myrkyllisiä. Aptameerien käyttö on myös monipuolisempaa, sillä niiden kohdevalikoima on laajempi verrattuna vasta-aineisiin.²⁸

1.1.6. Sovellukset

Aptameereilla on paljon sekä diagnostisia että terapeuttisia sovelluskohteita. Aptameerien korkean affiniteetin ja spesifisyyden vuoksi ne ovat ihanteellisia diagnostisiin sovelluksiin. Niillä on potentiaalia korvaamaan vasta-aineita kliinisessä käytössä. Vasta-aineiden tapaan aptameereja voidaan hyödyntää niitä vastaavien kohteiden molekyyli-tunnistukseen. Niitä on onnistuttu käyttämään patogeenien sekä eri syöpien tunnistukseen, ympäristön saastumisen seurantaan ja kantasolumarkkereina.²⁹ Esimerkiksi metallileimattujen syöpäsoluihin kohdennettujen aptameerien soveltuvuutta ja sen mahdollisuuksia histologisen rakenteen karakterisointiin, kvantitointiin ja kohteen paikantamiseen on tutkittu IMC-menetelmin (engl. *Imaging mass cytometry*).³⁰

Aptameereja voidaan käyttää myös lääkeaineiden kuljetuksessa. Esimerkiksi kemoterapeuttisia aineita voidaan kuljettaa aptameerien välityksellä syöpäsoluihin.²⁰ Terapeuttisia aptameereja eri sairauksien hoitoon on paljon kliinisissä tutkimuksissa. Luvussa 1.1.4. mainittu Pegaptanib on FDA:n hyväksymä oligonukleotidipohjainen lääke neovaskulaarisen ikään liittyvän silmänpohjan rappeuman hoitoon²³. Muita terapeuttisia aptameereja ovat esimerkiksi AS1411, joka toimii aptameerina nukleoliini proteiinille, jota esiintyy syöpäsolujen pinnalla³¹ ja esimerkiksi NU172, joka inhiboi trombiinia.

1.2. LA-ICP-MS

1.2.1. Määritelmä

LA-ICP-MS (*engl. Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry*) on analyytinen menetelmä, jolla voidaan kuvantaa alkuaineiden jakautumista kiinteissä näytteissä. Menetelmässä näytettä käsitellään korkeaenergisellä lasersäteellä. Laser irrottaa näytteestä hiukkasia, jotka kuljetetaan eteenpäin ionisoitavaksi ICP:lle ja siitä eteenpäin analysoitavaksi MS-laitteistolle. Analyysin pohjalta voidaan muodostaa korkearesoluutioisia kartoja näytteen alkuainekoostumuksista. Menetelmä mahdollistaa suoran monialkuaineanalyysin ja isotooppisuhteen määrittämisen suoraan kiinteästä näytteestä. Se on eniten käytetty menetelmä metallien, puolimetallien ja epämetallien massaspektrometrisessä kuvantamisessa biologisista näytteistä. Tällaisia näytteitä ovat esimerkiksi kudokset ja elimet, joiden avaruudellinen resoluutio on yleensä mikrometrin kokoluokkaa.³²

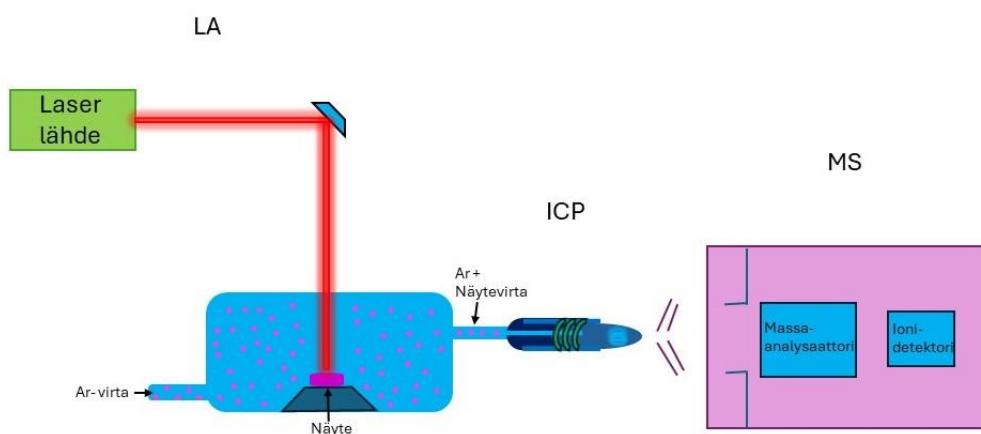
1.2.2. Laitteisto

Ensimmäinen osa LA-ICP-MS -laitteistoa on ilmatiivis laserablaatiokammio, jossa näyte käsitellään laserilla. Menetelmä käyttää fokuoitetua lasersädettä poistamaan materiaalia kiinteän näytteen pinnalta. Lasersäde pidetään paikoillaan ja näytetasoa siirrellään x-, y- ja z-suunnissa tarkoilla liikkeillä. Laser on yleensä syvä UV-laser, esimerkiksi aallonpituudella 193 nm. Laserpisteen kokoa voidaan säätää halutun paikkaresoluution mukaan. Laserpisteen koko voi nykyaikaisilla laitteilla olla jopa 1 µm. Mitattavan näytteen paksuus on yleensä 5-30 µm. Laser skannaa näytettä kohta kohdalta ja irtoava materiaali kuljetetaan jatkuvalla argonvirralla ICP-laitteistoon. Argon-kaasun tilalla voidaan hyödyntää myös jotakin muuta inerttiä kaasua, kuten esimerkiksi heliumia.³²

Muodostuneita ioneja eristetään jatkuvasti ionilähteeltä ja ne kuljetetaan massaspektrometrille, jossa ne erotellaan niiden massa-varaussuhteen (m/z) mukaan. Massaspektrometrissä on yleensä joko kvadrupoli-, kaksoisfokusoiva sektorikenttä- tai TOF-analysaattori. Kunkin ionin signaalin intensiteetti korreloidaan vastaamaan niiden pitoisuutta.³³ LA-ICP-MS laitteiston kaaviokuva on esitetty kuvassa 6.

Tärkeät parametrit, jotka LA-ICP-MS -menetelmää käytettäessä tulee optimoida, ovat laserpisteen koko, skannauksen nopeus ja toistotaajuus. Kyseiset parametrit vaikuttavat laserablaatioon ja näin ollen koko mittauksen tehokkuuteen ja herkkyyteen.³³ Mittausten tarkkuus riippuu suoraan kalibroinnista, standardisoinnista ja normalisoinnista. Biologisille näytteille ei yleensä ole kaupallisesti saatavilla sertifioituja vertailustandardeja. Tämän vuoksi pitää hyödyntää laboratoriossa valmistettuja matriisisovitettuja standardeja kalibrointia ja standardointia varten. LA-ICP-MS:n

käyttökohteet voidaan jakaa kolmeen eri kategoriaan. Sillä voidaan kuvantaa, tehdä viivaskannausta ja tehdä valittujen pisteiden mikropaikallista analyysiä. Kun LA-ICP-MS:ää käytetään kuvantamiseen, kuvien rekonstruointi analysoidun näytteen alkuainejakauman visualisoimiseksi on tärkeä vaihe. Tähän tarkoitukseen on olemassa erilaisia ohjelmistotyökaluja.³²



Kuva 6. LA-ICP-Laitteiston kaaviokuva (kuva mukailtu lähteestä³³).

1.2.3. Hyödyt ja rajoitteet

LA-ICP-MS -kuvantamisessa on useita ominaisuuksia, jotka ovat menetelmän eduksi. Analyysi tehdään suoraan kiinteästä näytteestä, joka tuo LA-ICP-MS -kuvantamiseen useita hyötyjä. Tällaisia hyötyjä on esimerkiksi vähäinen näytteen kulutus, minimaalinen näytteen käsittely, matala kontaminaatoriski sekä polyatomisen interferenssin väheneminen kuivien plasmaolosuhteiden vuoksi. Menetelmällä saadaan tarkkaa paikallista tietoa korkealla alkuaineherkkyydellä.³⁴

Menetelmällä pystytään havaitsemaan myös kemiallisesti inertejä aineita, kuten esimerkiksi zirkoniumia, titaania ja uraania. Kiinteää näytettä tarvitaan pieni määrä verrattuna esimerkiksi nestemäisen näytteen analysointiin. Laserablaatio kuluttaa näytettä myös vähän. Sekä spatiaalinen analyysi ja laajempi joukkonäytteenotto ovat mahdollisia. Menetelmä on myös monipuolinen, sillä näytteessä hallitsevat alkuaineet sekä myös hivenalkuaineet voidaan analysoida. Eri isotooppien suhdeanalyysi on myös mahdollinen.³⁵

LA-ICP-MS -kuvantamiseen liittyy myös rajoitteita, jotka vaikuttavat menetelmän hyödyntämiseen. Laserparametrit pitää aina optimoida matriisityypin mukaan. Ongelmia aiheuttaa puute erilaisista matriiseihin sopivista vertailumateriaaleista ja vakiintuneista ulkoisista kalibrointistandardeista. Sopivan standardin löytäminen voi olla haastavaa ja aikaa vievää ja lisäksi se voi lisätä näytteen esikäsittelyä. Analysoitavaa näytettä on myös mahdoton laimentaa analysoitavien alkuaineiden määrän optimoimiseksi. Yksinkertaisten kalibrointimenetelmien hyödyntäminen ei ole käytännöllistä toisin kuin nestemäisten näytteiden analysoinnissa. Pitkällä aikavälillä analyysiin saattaa tulla herkkyyspoikkeamia johtuen ICP-MS -laitteisosta. Näytteen asettelu ja laserin fokusointi voi myös olla hankalaa.³²

Figg et al.³⁶ osoittivat jo 1998, että epäedustava näytteenotto saa alkunsa alkuainepartikkelien kuljetuksesta ablaatiokammioista ICP:lle ja niiden myöhemmästä ionisoinnista plasmassa. Tämän pohjalta voidaan todeta, että laitteiston aerosolin kuljetusputkistot ja kuljetuksessa käytettävä kaasu vaikuttavat näin ollen kuljetuksen tehokkuuteen ja saatavan signaalin profiiliin. ICP ei kykene käsittelemään isoja partikkeleita riittävästi. Isot partikkelit plasmassa voivat vaikuttaa eri alkuaineiden vapautumisen tehokkuuteen ja näin ollen johtaa ei-stoikiometriisiin tuloksiin.³²

1.2.4. Sovellukset

LA-ICP-MS -kuvantamisella on paljon erilaisia sovelluskohteita esimerkiksi neurotieteissä, ympäristöä saastuttavien kemikaalien tutkimuksessa, biologiassa ja metallomiikassa. Sillä voidaan tutkia myös esimerkiksi biomolekyylejä käyttämällä metallileimattuja vasta-aineita.³²

Syövän tutkimuksessa LA-ICP-MS -kuvantamista voidaan hyödyntää neljällä osa-alueella. Nämä osa-alueet ovat metallit ja niiden suhde taustalla oleviin patogeneihin, biomarkkereiden löytäminen, metallipitoisten kemoterapeuttisten aineiden tutkiminen ja kasvainten rajaaminen ja kerrostumisen tutkiminen^{33,32} Sitä on sovellettu myös kvantitatiivisten kuvien saamiseksi alueellisesti spesifisistä alkuainejakaumista erilaisissa biologisten kudosten osissa, esimerkiksi hiirien aivoissa ja munuaisissa.³³ LA-ICP-MS:lla voidaan myös tutkia molekyyliominaisuuksia immunohistokemian avulla, hyödyntäen sopivaa alkuaineleimaa, jota voidaan käyttää kohdemolekyylin epäsuoraan mittaamiseen.³²

LA-ICP-MS tarjoaa myös uusia näkökulmia nanomateriaalien karakterisointiin ja toksikologiaan. Kvantitatiivista korkean resoluution dataa on saatu monista eri nanomateriaaleista kuten esimerkiksi

kulta-³⁷ ja hopeananopartikkeleista³⁸. LA-ICP-MS -kuvantamisella on myös mahdollista paljastaa aikaisempia altistumistapahtumia, jonka perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä esimerkiksi ruokavaliosta ja lääkehoidosta. Akuutti ja krooninen altistuminen erilaisille aineille aiheuttaa yleensä aineiden integroitumista kudoksiin. LA-ICP-MS -kuvantamisella aineiden kerääntyminen olisi mahdollista havaita. Esimerkiksi gadoliniumin kerääntymistä elimistöön useiden MRI-tutkimusten jälkeen, joissa hyödynnettiin gadoliniumia sisältävää varjoainetta, on voitu kuvantaa LA-ICP-MS:lla^{39,32}.

1.2.5. Organoelohopea alkuaineleimana

Erilaisilla leimoilla on keskeinen osa esimerkiksi kuvantamisessa, isotooppianalyseissa ja erilaisten biomolekyylien kvantitoinnissa. Leimalla on tärkeä rooli tehtävässä mittauksessa, joten oikeanlaisen leiman valitseminen on mittauksen kannalta olennaista. Käytetyn leiman tulee olla kemiallisesti stabiili, jottei se hajoa tai reagoi näytteen muiden komponenttien kanssa. Leiman tulee myös säilyttää ominaisuutensa kohteessa, jotta mittaus voidaan suorittaa luotettavin tuloksin. Leiman olisi hyvä olla myös sellainen, jota tutkittavassa näytteessä on luontaisesti vähän. Tällöin sen havaitseminen on helppoa ja välttyään ylimääräiseltä taustahäiriöltä. Leiman tulisi olla myös käytettyyn menetelmään sopiva. Esimerkiksi LA-ICP-MS -menetelmää hyödyntäessä leiman tulee olla sellainen, joka on helposti ionisoitavissa kyseisellä menetelmällä. Hyvän leiman etu on myös helppo kiinnittäminen. Jos leimaa hyödynnetään biologisten näytteiden kanssa, on tärkeää ottaa huomioon alkuaineen yhteensopivuus näytteen kanssa. Alkuaineen massan tulisi myös olla sellainen, ettei se aiheuta interferenssiä näytteen muiden alkuaineiden kanssa häiriten mittausta ja vääristäen sen tuloksia.^{40,41}

Erilaisia metalleja on hyödynnetty leimoina. Koordinatiiviset metallikompleksit dissosioituvat laimeissa olosuhteissa, joten niiden hyödyntäminen biologisissa sovelluksissa on hankalaa. Metallikompleksien stabiiliutta voidaan kuitenkin parantaa muodostamalla niistä kelaatti. Metallileimat, kuten lantanidihdisteet, aiheuttavat monesti steerisiä esteitä.⁴⁰ Organometallisten yhdisteiden ominaisuudet puolestaan voisivat tehdä niistä hyviä kandidaatteja metallileimaksi. Oligonukleotidejä, joihin on sisällytetty organometallisia katalyyttisiä osia, on tutkittu.⁴² Saman kaltaista kemiaa voitaisiin hyödyntää myös leimana. Organometallisten kompleksien ominaisuudet mahdollistavat niiden käytön leimoina joiden avulla oligonukleotideja voidaan kuvantaa tai niiden sekundäärirakenteita voidaan selvittää.⁴³

1.3. Työn tarkoitus

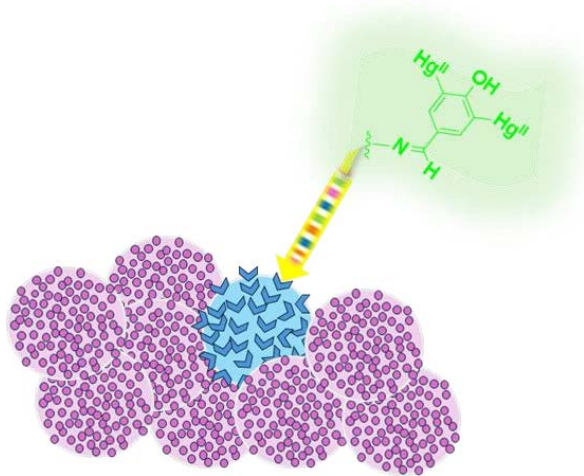
Tämän työn tarkoituksena oli syntetisoida organoelohopealeimattu aptameeri ja kokeilla, onnistuuko sen kuvantaminen LA-ICP-MS -menetelmällä. Jos aptameeriin liitetty leima onnistuttaisiin havaitsemaan, olisi mahdollista paikantaa sen sijoittuminen kudoksessa. Näin ollen olisi siis mahdollista tietää, missä aptameerin kohde sijaitsee. Tällä tavoin olisi mahdollista paikantaa esimerkiksi syöpäsoluja kudoksesta.

Tässä työssä aptameeriksi valikoitiin tunnettu oligonukleotidisekvenssi, jonka kohteena ovat tietyt syöpäsolun pintaproteiinit. Aptameeri leimattiin organoelohopeayhdisteellä. Kyseisen yhdisteen havaitseminen kudoksesta LA-ICP-MS -menetelmällä pitäisi teoriassa onnistua selkeästi, sillä normaaliolosuhteissa kudosten ei kuuluisi sisältää elohopean yhdisteitä. Kun sitoutunut ja leimattu organoelohopea-aptameeri onnistuttaisiin paikantamaan, olisi mahdollista tietää missä kohdeproteiinit sijaitsevat.

Leimaksi valikoitiin organoelohopeayhdiste, joka on valmistettu aikaisemmin tutkimusprojekti 1:n aikana. Leima liitettiin aptameeriin linkkerin välityksellä, oksimaatioreaktiota hyödyntäen. Oksimaatio on vakiintunut reaktio ja sen avulla on aiemmin onnistuttu kiinnittämään metalloituja aldehydejä oligonukleotidiin.⁴² Linkkerinä hyödynnettiin tutkimusprojekti 1:ssä valmistettua amino-oksilinkkeriä.

Työssä oli tarkoitus valmistaa kolme nukleiinihapposekvenssiä, joista kaksi vastaisi haluttua aptameeria ja yksi olisi sekvenssiltään satunnainen. Satunnaiseen sekvenssiin ja toiseen aptameerisekvenssiin liitettäisiin organoelohopealeima ja toinen aptameeri jätettäisiin ilman leimaa. Näin pystyttäisiin esimerkiksi vertailemaan, ovatko LA-ICP-MS menetelmällä mahdollisesti havaitut signaalit niitä, mitä olisi tarkoituskin.

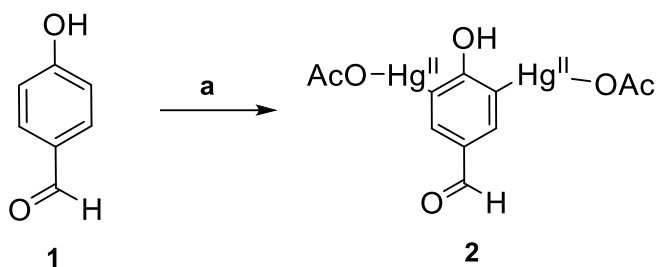
Työn tarkoituksena oli selvittää, onnistuuko tällä tavoin funktionalisoitujen aptameerien valmistaminen ja voisiko niitä kuvantaa LA-ICP-MS – menetelmällä.



Kuva 7. Työn tarkoituksena oli valmistaa organelohopealla leimattu aptameeri, jonka kohteena on syöpäsolun pinnalla olevat proteiinit. Leiman avulla aptameeri ja näin ollen myös aptameerin kohde voitaisiin paikantaa.

2. Tulokset ja niiden tarkastelu

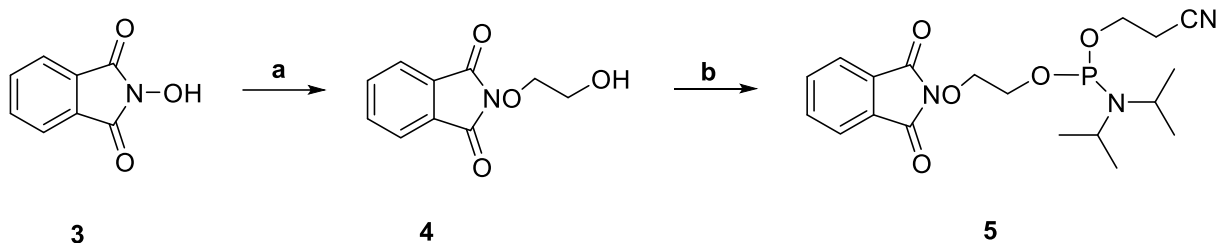
2.1. 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydin (**2**) synteesi



Kaavio 1. 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydin (**2**) synteesi. a) HgOAc_2 , EtOH, H_2O , AcOH, refluksointi.

Projektissa aptameerin leimana hyödynnettiin organoelohopeayhdistettä. Käyttynä yhdisteenä toimi 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydi (**2**), joka valmistettiin kaavion 1 mukaan. Saanto 2,61 g (47,8 %). Reaktio oli käynnissä vain noin kuuden minuutin ajan, jonka jälkeen kirkas liuos muuttui nopeasti sakeaksi ja keittopulloon alkoi saostua valkeaa sakkaa niin paljon, että magneettisekoittaja ei enää jaksanut sekoittaa liuosta. Tämän seurauksena keitos kuohui keittopullostani yli ja osa tuotteesta levisi vetokaappiin ja meni hukkaan. Tuotteesta yritettiin tehdä NMR-näyte kloroformiin mutta tuote ei liennut siihen. Näyte tehtiin DMSO:in, johon tuote liukeni osittain. ^1H NMR:n perusteella (Liite 1.) tuotteessa on havaittavissa liikaa vetyä ja näin ollen tuote on mahdollisesti epäpuhdasta. Huonon liukenemisensa vuoksi eri liuottimiin tuotteen puhdistus olisi todennäköisesti hyvin hankalaa. Kokeiltuja liuottimia olivat pyridiini, MeOH, MeCN, DCM ja tolueni. Tuote ei suuremmalla määrällä (NMR-näytteeseen vaadittuun määrään verrattuna) liennut enää DMSO:in ollenkaan. Liukoisuutta testattiin liuottamalla 6,4 mg tuotetta **2** noin 100 μl liuotinta. Puhdistusyrityksen aikana tuotetta menisi todennäköisesti paljon hukkaan, joten valmistettua 2,6-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydiä (**2**) ei yritetty puhdistaa.

2.2. 2-syanoetyyli (2-((1,3-diooksoisindolin-2-yyli)oksi)etyyli) diisopropyylifosforamidiitin synteesi (5)



Kaavio 2. Amino-oksilinkkerin synteesi. a) 2-bromietanoli, MeCN ja Et₃N, 24 h, 20 °C; b) 2-syanoetyyli-N,N-diisopropyylidikloorifosforamidiittiä, DCM ja Et₃N 1 h, 20 °C.

Projektissa käytettiin amino-oksilinkkeriä, jonka avulla organelohopeayhdiste voitaisiin konjugoida kiinni oligonukleotidiin. Fosforamidiitti (5) valmistettiin kaavion 2 mukaan. Saanto 0,3598 g (46,7 %). N-hydroksiftaali-imidiä (3) liuotettiin asetonitriiliin, jonka jälkeen seokseen lisättiin trietyyliamiinia ja 2-bromietanolia. Seosta sekoitettiin huoneenlämmössä. Reaktio etenemistä seurattiin ohutkerroskromatografialla. Kaiken kaikkiaan reaktio oli käynnissä 24 h. Reaktioliuos haihdutettiin kuiviin, jonka jälkeen se liuotettiin dikloorimetaaniin ja uutettiin kylläisellä natriumvetykarbonaatin vesiliuoksella. Saatu orgaaninen faasi haihdutettiin kuiviin. Väliaine 4 puhdistettiin silikageelikromatografisesti ja karakterisoitiin NMR-spektrometrisesti. Tuotteen todettiin olevan haluttua ja riittävän puhdasta fosfitylointiin. Fosfitylointi suoritettiin mahdollisimman kuivissa olosuhteissa N₂-atmosfäärissä. Mahdollisimman kuivien olosuhteiden takaamiseksi tuote 4 haihdutettiin kolmesti tolueenista ennen reaktion suorittamista. Tolueenista haihduttamisen jälkeen tuote 4 liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin. Liuokseen lisättiin trietyyliamiinia ja 2-syanoetyyli-N,N-diisopropyylidikloorifosforamidiittiä. Reaktio suoritettiin huoneenlämmössä ja se oli käynnissä 1 h. ³¹P NMR spektristä (Liite 6) havaittiin siirtymä kohdassa 148.4 ppm, joten fosfitylointi todettiin onnistuneeksi. Tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti ja karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti.

2.3. Oligonukleotidisynteesit

Projektissa syntetisoidut oligonukleotidisekvenssit ovat esitettyinä taulukossa 1. ON1 oli alkuperäisen suunnitelman mukainen oligonukleotidi, joka vaihdettiin projektin edetessä oligonukleotidiin ON2.

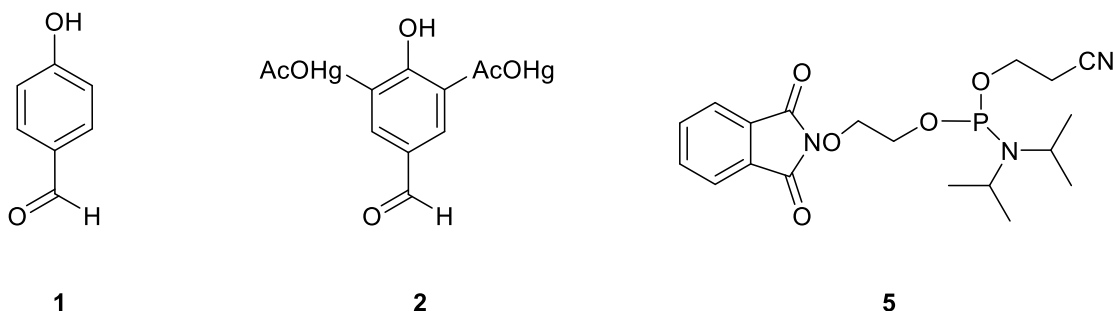
Myöhemmin esitellyissä konsentraatiomäärittelyissä (luku 2.4.) **ON2x** ja **ON2x-Hg₂** -aptameerien oligonukleotidisekvenssit ovat taulukossa 1 esitetyn **ON2:n** mukaiset ja **ON3x** -oligonukleotidisekvenssi on taulukossa 1 esitellyn sekvenssi **ON3:n** mukainen.

Kaikki oligonukleotidisynteesit suoritettiin kiinteän kantajan menetelmällä automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla käyttäen kaupallisesti saatavilla olevia DNA-fosforamidiittirakenneyksiköitä.

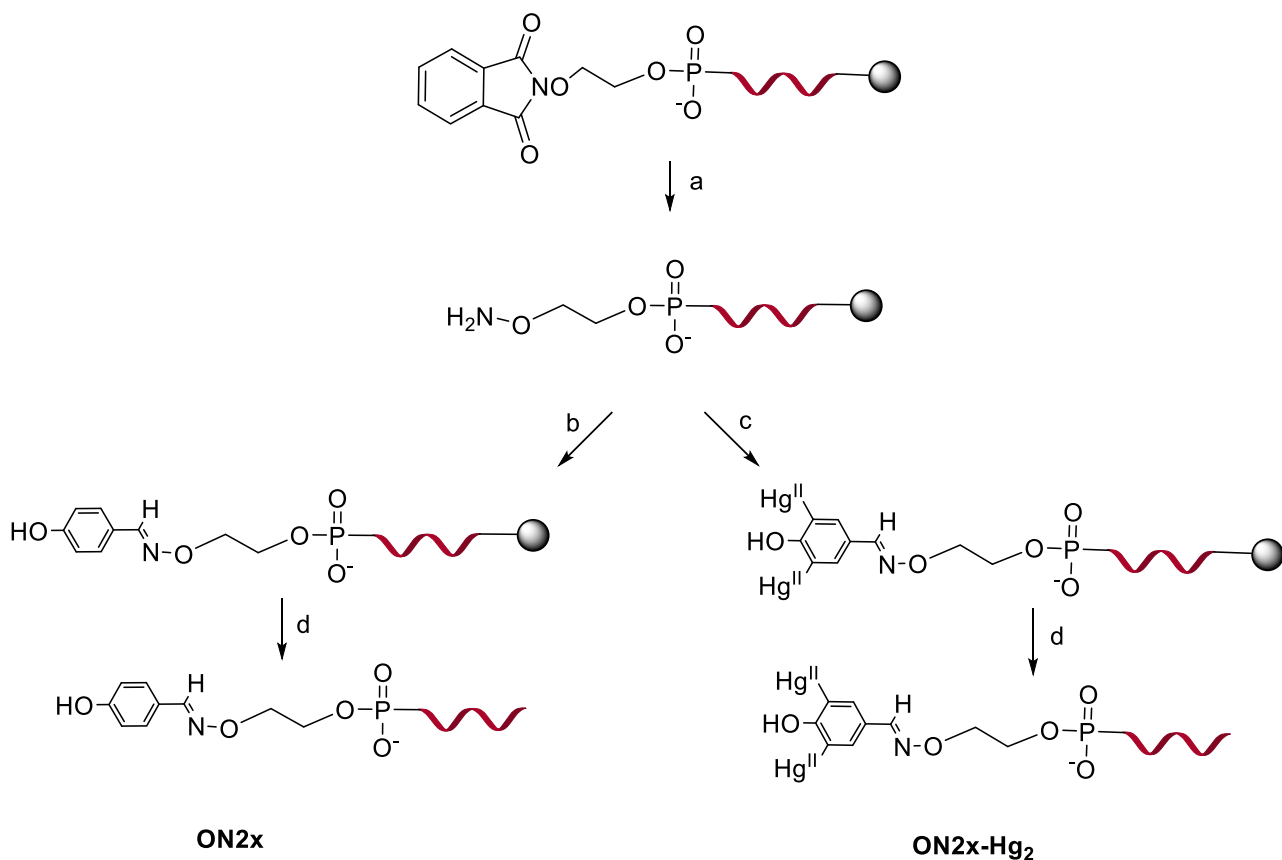
Taulukko 1. Projektissa syntetisoidut oligonukleotidisekvenssit

ON1	ATA CCA GCT TAT TCA ATT GGA CAC GGC AAA GGG GTA TAG CCT ACC GGA CCG TGA ACA TGG AAT GGT GTG CTG CGT GGA GAT AGT AAG TGC AAT CT
ON2	ATC CAC GAG TGA CGC AGC ACG AGC AAC ACA AAA GCT CCT TGG AAT AGT CTA ATA CCG GAG CGA GAA AGC TGG ACA CGG TGG CTT AGT
ON3	TCT ATG GCG GAC ACT CTA GGC GAC AGT TCG CGA GTC CGC GTG AAT CAG AAT CAT CCT CTT CTT GTC AGG CCC GTA AAT AGT ATC ACC

Kaikkien oligonukleotidien 5'-päähen kytkettiin ftaloyylisuojuattu amino-oksirakenneyksikkö **5**. Myös kyseinen kytkentä suoritettiin automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla. Kytkennän jälkeen ftaloyylisuoja poistettiin hydratsiinikäsittelyllä. Tämän jälkeen joko 4-hydroksibentsaldehydi (**1**) tai 3,5-bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydi (**2**) liitettiin viipymättä oksimaatioreaktiolla oligonukleotidiin. Edellä kuvattu reaktio on esitetty kaaviossa 2 ja liitetyt yhdisteet kuvassa 7. Tämä jälkeen oligonukleotidit irrotettiin kiinteältä kantajalta ammoniakikäsittelyllä. Oligonukleotidit puhdistettiin RP-HPLC:lla, kvantitoitiin UV-spektrofotometrisesti ja karakterisoitiin massaspektrometrisesti.



Kuva 7. Yhdisteiden **1**, **2** ja **5** rakenteet.



Kaavio 3. Oligonukleotidien **ON2x** ja **ON2x-Hg₂** synteesi. a) H₂NNH₂ · H₂O, pyridiini ja AcOH, 45 min, 20 °C; b) yhdiste **1** ja pyridiini, 2 h, 20 °C; c) yhdiste **2**, pyridiini, 20 °C; d) NH₃, H₂O yön yli, 20 °C.

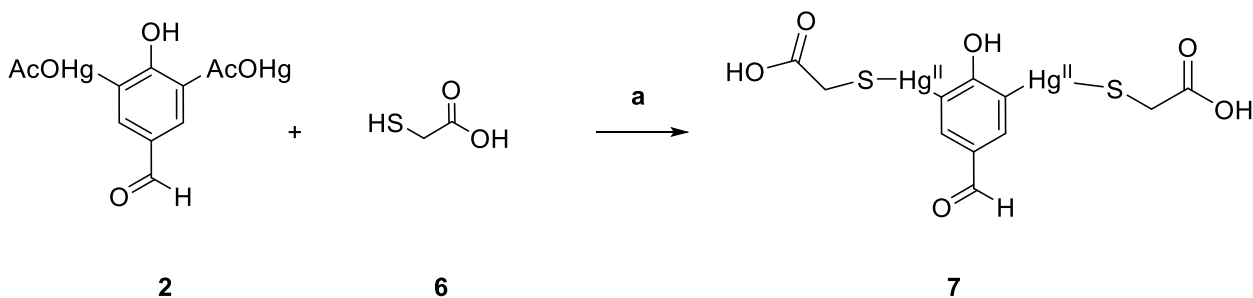
ON1 oli alkuperäisen suunnitelman mukainen sekvenssi, joka yritettiin syntetisoida. Oligonukleotidisekvenssi valmistettiin ja amino-oksilinkkeri (**5**) kytkettiin oligonukleotidiin. Valmistettu tuote jaettiin kahteen osaan joista toiseen liitettiin oksimaatioreaktiolla yhdiste **1** ja toiseen yhdiste **2**. Näin syntetisoitiin oligonukleotidit **ON1x** ja **ON1x-Hg₂**. Yhdisteen **2** liittäminen oli haastavaa, sillä se liukeni erittäin huonosti. Oligonukleotidi **ON1x** yritettiin puhdistaa ensin ja sen HPLC-puhdistuksessa havaittiin heti ongelmia. Kromatogrammin perusteella ei kyetty havaitsemaan, milloin oligonukleotidi oli kulkeutunut kolonnin läpi. Oligonukleotidi jäi mahdollisesti kiinni kolonniin tai vaihtoehtoisesti kulkeutui niin tasaisesti ulos, ettei sitä kyetty erottamaan.

Kirjallisuudesta ei löytynyt vastaavaa esimerkkiä, joka olisi tarjonnut apua ongelmaan. Oligonukleotidin sulamislämpö mitattiin. Mittauksen perusteella päädyttiin yrittämään HPLC-puhdistusta uudestaan niin, että kolonni lämmitettiin 60-asteiseksi. Tällä tavoin kromatogrammiin saatiin näkyviin selkeämmin erottuva tuotepiikki tai -fraktio ja oletettu oligonukleotidi kyettiin keräämään talteen. **ONx-Hg₂** yritettiin myös puhdistaa HPLC:lla lämmittäen kolonnia 60-asteiseksi. Waters RDA-massaspektrometrillä ei kuitenkaan onnistuttu havaitsemaan täysimittaista oligonukleotidiä kummassakaan tapauksessa. Oletettujen oligonukleotidien **ON1x** ja **ON1x-Hg₂** massaspektrit mitattiin Orbitrap Fusion Lumos -massaspektrometrillä. **ON1x**-näytteestä kyettiin havaitsemaan massa 29751, odotetun tarkan massan ollessa 29753 (**ON1x**:n massaspektri liitteessä 9). **ON1x-Hg₂** -näytteestä ei tälläkään menetelmällä kyetty havaitsemaan täysimittaista oligonukleotidiä. Vaikka massaspektrin perusteella **ON1x** oletettavasti onnistui, päädyttiin vaihtamaan oligonukleotidisekvenssiä hieman lyhyempään. Tavoitteena oli myös, että massaspektrit saataisiin mitattua Waters RDA -massaspektrometrillä.

ON1 korvattiin oligonukleotidisekvenssillä **ON2**. Se syntetisoitiin ja siihen liitettiin aminosilinkkeri (**5**) samalla tavalla kuin **ON1**:n tapauksessa. Valmistettu tuote jaettiin kahteen osaan joista toiseen liitettiin oksimaatioreaktiolla yhdiste **1** ja toiseen yhdiste **2**. Yhdisteen **2** liittäminen oli yhtä haastavaa kuin ensimmäisellä kerralla. HPLC-puhdistuksessa kolonni lämmitettiin 60 asteiseksi ja oletettu oligonukleotidi saatiin kerättyä talteen. Massaspektrometrillä ei kuitenkaan tälläkään kertaa onnistuttu havaitsemaan täysimittaista oligonukleotidiä **ON2x-Hg₂**. Spektrissä oli mahdollisesti havaittavissa lyhyitä oligonukleotideja. On todennäköistä, että oligonukleotidi hajosi jossain vaiheessa käsittelyä.

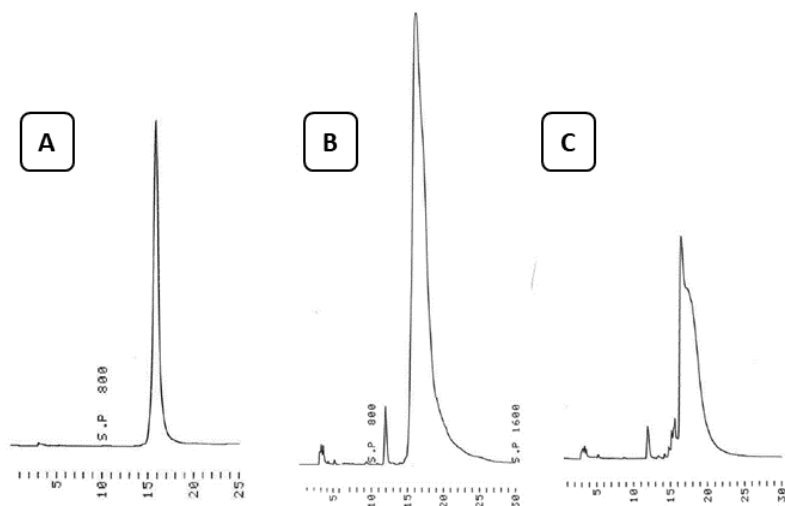
Yhdisteen **2** liittäminen oligonukleotidiin oli haasteellista suorittaa, joten on mahdollista, että oligonukleotidi on vaurioitunut tässä kohtaa prosessia. Reaktio suoritettiin kahden ruiskun avulla siten, että kantajaan sidottu oligonukleotidi pidettiin kolonnissa ja kolonnin läpi huuhdeltiin ruiskujen avulla yhdisteen **2** pyridiiniliuosta. Huonon liukoisuutensa vuoksi käsiteltävä liuos oli aika paksua, minkä vuoksi kolonni tukkiutui helposti ja toinen ruiskuista myös irtosi käsittelyn aikana. Reaktion jälkeen havaittiin myös, että kolonnin suodatinta oli hieman rikkoutunut. HPLC-puhdistuksessa käytössä oli myös aluksi vääränlainen injektioruisku, jonka vuoksi mahdollista tuotetta on mennyt todennäköisesti hukkaan. **ON2x** kyettiin kuitenkin havaitsemaan massaspektrometrillä. Yhdisteen **1** liittäminen oli helppoa, sillä se liukeni liuottimeen hyvin tehden sen käsittelystä helpompaa verrattuna yhdisteeseen **2**. On siis todennäköistä, että yhdisteen **2** elohopea-atomit aiheuttavat ongelmia oligonukleotidin synteesissä. On kuitenkin myös mahdollista, että elohopea vaikuttaa oligonukleotidiketjun pysyvyyteen. Yhdiste **2** saattaa esimerkiksi asettua oligonukleotidiin tavalla,

joka aiheuttaa jonkinlaista steeristä haittaa. Elohopeaioninen suuntautuminen oligonukleotidin donoriatomeihin saattaa häiritä oligonukleotidin rakennetta ja mahdollisesti rikkoa sen. Seuraavissa synteeseissä yhdiste **2** päätettiin suojata merkaptotikkahapolla (Kaavio 4). Suojaamisella pyrittiin siihen, että elohopeaionit eivät koordinoituisi suoraan oligonukleotidin donoriatomeihin.



Kaavio 4. Yhdisteen **3** suojaus merkaptotikkahapolla. a) pyridiini, 20 °C, 15 min.

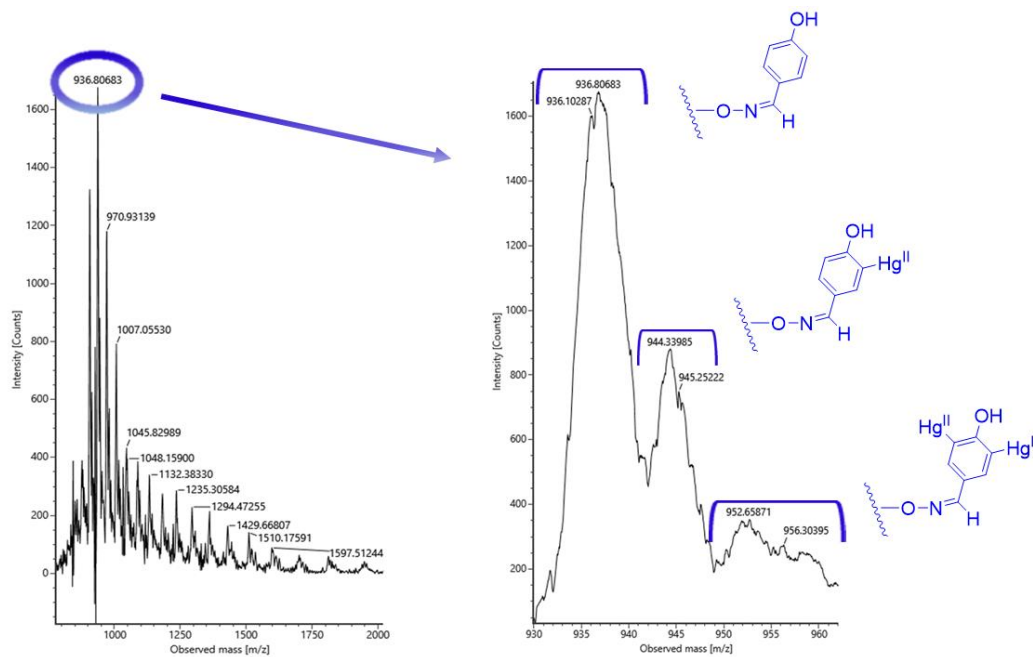
Uusi erä oligonukleotidia **ON2x-Hg₂** syntetisoitiin muuten samalla tavalla kuin edellä mutta nyt yhdisteen **2** tilalla käytettiin merkaptotikkahapolla käsiteltyä versiota eli yhdistettä **7**. Merkaptotikkahapon lisäyksen jälkeen oksimaatioreaktion suoritus oli helpompaa. Yhdiste **7** liukeni liuottimeen lähes kokonaan, joten sen käsittely oli nyt helpompaa aikaisempiin synteeseihin verrattuna. Yhdiste **7** kannatti kuitenkin liuottaa juuri ennen reaktion suoritusta, sillä pidemmällä ajalla liuokseen alkoi muodostua saostumaa, mikä teki siitä käyttökelvottoman. HPLC-puhdistuksessa käytettiin uutta bioinertiä BioZen™ oligo -kolonnia, joka osoittautui edeltäjäänsä Thermo ODS Hypersil-kolonnia paremmaksi. BioZen™ -kolonnin käyttö johti selkeämpiin ja siistimpiin RP-HPLC profiileihin verrattuna aiempaan. HPLC-ajo helpottui huomattavasti kolonninvaihdon myötä. HPLC-profiileissa havaittiin vahva signaali suunnilleen samalla retentioajalla jokaisen aptameerin tapauksessa (Kuva 8). **ON2x-Hg₂**:n ja **ON3x-Hg₂**:n profiileissa havaittiin myös heikompia signaaleja samoissa kohdissa.



Kuva 8. RP-HPLC profiilit A: **ON2x**, B: **ON2x-Hg₂** ja C: **ON3x-Hg₂**

Kolonnin vaihtamisen jälkeen massaspektrometrillä onnistuttiin havaitsemaan sekä **ON2x** että **ON2x-Hg₂** (Liitteet 10 ja 11). Projektin seuraavia vaiheita varten valmistettiin vielä vertailun vuoksi oligonukleotidi **ON3x-Hg₂**. **ON3xHg₂**:n sekvenssi oli saman pituinen kuin **ON2** mutta satunnainen. Muuten **ON3x-Hg₂** valmistettiin samalla tavalla kuin **ON2x-Hg₂**. Myös **ON3x-Hg₂** onnistuttiin havaitsemaan massaspektrometrillä (Liite 12).

ON2x-Hg₂:n massaspekttrin signaaleja tutkiessa voidaan havaita, että saatu tuote on ilmeisesti seos erilaisista versioista haluttua aptameeria. Kun spektrin intensiivisintä piikkiä tutkii tarkemmin, huomataan, että se jakautuu kolmeen osaan (kuva 9.). Näiden kolmen osan m/z -arvot selittyisivät sillä, että tuoteseos koostuu halutusta aptameerista, jossa on kiinnittyneenä kaksi elohopea-atomia, versiosta, jossa on vain yksi elohopea-atomi, ja versiosta, jossa molemmat elohopea-atomit ovat irronneet.



Kuva 9. ON2x-Hg₂ massaspektrissä havaitaan intensiivisimmän piikin jakautuminen kolmeen osaan. Tämä selittyisi sillä, että tuoteseos sisältäisi kolme eri versiota halutusta aptameerista.

ON3x-Hg₂:n massaspektrissä on havaittavissa sama edellä mainittu ilmiö (liite 12) kuin ON2x-Hg₂:n tapauksessa. On mahdollista, että esimerkiksi merkaptoetikkahapon lisäys aiheuttaa sen, että elohopea-atomit irtoavat halutuilta paikoiltaan. Seosten ei kuitenkaan pitäisi olla este sille, etteikö leimattuja aptameereja voitaisi hyödyntää projektin seuraavissa vaiheissa. Projektin tarkoitus on havaita LA-ICP-MS-menetelmällä organelohopealeimattu aptameeri, joten sillä ei pitäisi olla merkitystä, onko aptameerissa kiinni yksi vai kaksi elohopea-atomia. Aptameerit, jossa elohopea-atomit ovat irronneet kokonaan, todennäköisesti kuitenkin laimentavat elohopeasta saatavaa signaalia.

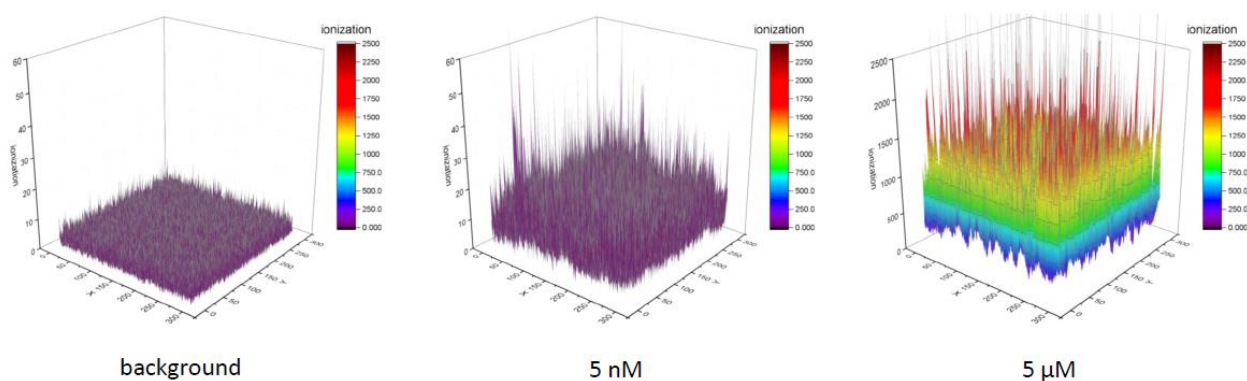
Taulukossa 2. on koottuna yhteen aptameerien, joiden kanssa projektissa edetään, konsentraatiot ja tilavuudet. Konsentraatiot laskettiin UV-absorbanssien avulla.

Taulukko 2. Aptameerikantaliuosten konsentraatiot ja tilavuudet.

Aptameeri	C (µM)	V (µl)
ON2x	13,7	500
ON2x-Hg ₂	38,8	500
ON3x-Hg ₂	259,2	500

2.4. LA-ICP-MS-detektorajan määrittäminen

Oligonukleotideilla **ON2x**, **ON2x-Hg₂** ja **ON3x-Hg₂** testattiin, kuinka suuri pitoisuus organelohopealeimattua aptameeria vaaditaan, jotta se voidaan detektoida LA-ICP-MS:llä. Jokaisesta oligonukleotidista tehtiin 10 µM liuos, josta tehtiin edelleen laimennokset 5 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,1 µM, 0,05 µM, 0,01 µM ja 0,005 µM. **ON2x** ei sisältänyt detektoitavaa elohopeaa mutta se pidettiin mukana mittauksissa vertailun vuoksi. Näytteenä käytettiin lasilevyjä, jotka sisälsivät hiiren aivokudosta. Jokaista laimennosta pipetoitiin näytteeseen. Kuvassa 10 on esitetty tulokset 5 ja 0,005 µM liuoksilla sekä vertailun vuoksi pelkkä tausta. Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että 5 µM laimennos antaa erittäin vahvan signaalin mutta jo 5 nM laimennoksella saadaan selkeästi taustasta erottuva signaali elohopeasta.



Kuva 10. Taustan, 0,005 µM laimennoksen ja 5 µM laimennoksen antamat signaalit. (Kuva: Tuomas Lönnberg.)

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. Yleiset menetelmät

Synteseissä käytettiin kaupallisia reagensseja ja liuottimia. Oligonukleotidisynteesit suoritettiin ÄKTA Oligopilot plus -automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla. Oligonukleotidit puhdistettiin HPLC:lla käyttäen menetelmiä A, B, C ja D (taulukko 3). UV-absorbanssit mitattiin Shimadzu UV-

1900 UV-Vis spektrofotometrillä. Massaspektrit mitattiin Waters Rda -massaspektrometrillä sekä ON1x:n tapauksessa myös Orbitrap fusion lumos -massaspektrometrillä.

Taulukko 3.

A	ACN 10 → 60 % 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH = 7,0), 260 nm detektioaallonpituus, Thermo ODS Hypersil-kolonne (250 x 10 mm, 5 µm), virtausnopeus 3 ml / min. Kolonna pidettiin 60 °C:ssa.
B	ACN 0 → 60 % 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH = 7,0), 260 nm detektioaallonpituus, Thermo ODS Hypersil-kolonne (250 x 10 mm, 5 µm), virtausnopeus 3 ml / min.
C	ACN 0 → 40 % 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH = 7,0), 260 nm detektioaallonpituus, Thermo ODS Hypersil-kolonne (250 x 10 mm, 5 µm), virtausnopeus 3 ml / min.
D	MeOH 20 → 80 % 25 min aikana, TEAA-puskuri (20 mM; pH = 7,0), 260 nm detektioaallonpituus, BioZen™ oligo 00F-4790-E0-kolonne (150 x 4,6 mm, 2,6 µm), virtausnopeus 0,5 ml /min.

3.2. 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydi (2)

4-hydroksibentsaldehydiä (1; 1,0 g; 8,18 mmol) liuotettiin H₂O:n (5 ml) ja EtOH:n (5 ml) seokseen. HgOAc₂ (5,24 g; 16,4 mmol) liuotettiin EtOH:n (40 ml), H₂O:n (19,6 ml) ja AcOH:n (0,4 ml) seokseen. Kun aldehydi ja HgOAc₂ olivat lienneet, seokset yhdistettiin ja saatua seosta refluksoitettiin noin 6 min, jolloin kirkas liuos muuttui sakeaksi ja pulloon alkoi muodostua paljon sakkaa. Refluksointi lopetettiin ja seoksen annettiin jäähtyä. Jäähtynyt seos imusuodatettiin ja jäännös pestiin H₂O:lla (20 ml), EtOH:lla (20 ml) ja Et₂O:lla (20 ml). Saanto 2,61 g (47,8 %). ¹H NMR-spektri liitteessä 1 ja COSY liitteessä 2. ¹H NMR δ_H(500 MHz; DMSO-*d*₆): 7,97 (H, d, J= 6,32), 7,78 (2H, s, H3 & H5), 1,94 (6H, s, CH₃).

3.3. 2-(2-hydroksietoksi)isoindoline-1,3-dioni (4)

N-Hydroksiftaali-imidiä (**3**; 2,02 g; 12,3 mmol) liuotettiin MeOH:iin (20 ml). Liuokseen lisättiin Et₃N:a (3,40 ml; 24,6 mmol) ja 2-bromietanolia (2,60 ml; 36,8 mmol). Liuoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 24 h. Reaktioita seurattiin TLC:llä eluenttina MeOH:n ja DCM:n seos (5:95, v/v). Reaktioliuos haihdutettiin kuiviin, jonka jälkeen jäännös liuotettiin DCM:iin (100 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃:n vesiliuoksella (2 x 100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina MeOH:n ja DCM:n seosta (4:96, v/v). Saanto 1,18 g (46,3%). ¹H NMR liitteessä 3. ¹H NMR δ_H (500 MHz; CDCl₃): 7,85 (4H, m, C₆H₄(CO)₂N), 4,33 (2H, t, J = 4,3 Hz, NOCH₂CH₂), 3,83 (2H, t, J = 4,5 Hz, NOCH₂CH₂).

3.4. 2-syanoetyyli(2-((1,3-diooksoisoindolin-2-yyli)oksi)etyyli)diisopropyylifosforamidiitti (5)

Yhdiste **4** (0,3931 g; 1,89 mmol) liuotettiin kuivaan tolueniin ja liuos haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttajalla (3 x 10 ml). Haihdutusjäännös liuotettiin kuivaan DCM:iin (10 ml). Liuokseen lisättiin Et₃N:a (1,3 ml; 9,45 mmol) ja 2-syanoetyyli-N,N-diisopropyylidikloorifosforamidiittia (0,5 ml; 2,27 mmol). Reaktio suoritettiin N₂-atmosfäärissä. Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 1 h, jonka jälkeen se laimennettiin DCM:lla (100 ml) ja pestiin kerran kylläisellä NaHCO₃:n vesiliuoksella (100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin. Saatu tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina heksaanin, EtOAc:n ja Et₃N:n seos (59:40:1, v/v). Saanto 0,3598 g (46,7 %). ¹H NMR-spektri liitteessä 4, COSY liitteessä 5, ³¹P NMR-spektri liitteessä 6, ¹³C NMR liitteessä 7 ja HSQC liitteessä 8. ¹H NMR δ_H (500 MHz; CD₃CN): 7,84 (4H, m, C₆H₄(CO)₂N), 4,36 (2H, m, NOCH₂CH₂OP), 3,97 (2H, m, NOCH₂CH₂OP), 3,79 (2H, m, POCH₂CH₂CN), 3,56 (2H, m, NCHCH₃), 2,65 (2H, m, POCH₂CH₂CN), 1,16 ja 1,13 (12H, d, J = 6,8, NCHCH₃). ¹³C NMR δ_c (126 MHz; CD₃CN): 134,6 (C₆H₄(CO)₂N), 129,1 (C₆H₄(CO)₂N), 123,1 (C₆H₄(CO)₂N), 117,3 (CN), 77,7 (NOCH₂CH₂OP), 61,8 (NOCH₂CH₂OP), 58,5 (POCH₂CH₂CN), 42,9 (NCHCH₃), 23,85 (NCHCH₃), 19,97 (POCH₂CH₂CN). ³¹P NMR δ_p (202 MHz; CD₃CN): 148,4.

3.5. Oligonukleotidisynteesit

Projektissa syntetisoitiin kolme erilaista oligonukleotidia **ON1**, **ON2** ja **ON3** (taulukko 1.). Oligonukleotidit syntetisoitiin automaattisella ÄKTA Oligopilot plus DNA/RNA-syntetisaattorilla.

ON1 ja **ON2** syntetisoitiin käyttämällä kiinteää kantajaa dT-CPG ($33 \mu\text{mol g}^{-1}$) ja **ON3** käyttämällä kiinteää kantajaa dC-CPG ($33 \mu\text{mol g}^{-1}$). Yhdiste **5** liitettiin oligonukleotidien 5'-päähän myös syntetisaattorilla. Tämän jälkeen kiinteät kantajat kuivattiin paineilmalla.

Oligonukleotidien **ON1**, **ON2** ja **ON3** ftaloyylisuojat poistettiin käsittelemällä kiinteitä kantajia $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$:n, pyridiinin ja AcOH:n seoksella (1:32:8, v/v) 45 min. Seos valmistettiin juuri ennen reaktion aloitusta ja pyridiini ja AcOH olivat tislattuja. Reaktio suoritettiin kahden muoviruiskun avulla siten, että kantaja oli kolonnissa ruiskujen välissä. Reaktion jälkeen kiinteitä kantajia huuhdeltiin pyridiinillä (3 ml). Seuraavaksi kantajaan sidottua oligonukleotidia **ON1** käsiteltiin 2 h seoksella, joka sisälsi joko 4-hydroksibentsaldehydiä (**1**, 100 mg, 0,81 mmol) tai 3,5-bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydiä (**2**, 64 mg, 0,10 mmol) liuotettuna pyridiiniin (1 ml). Kantajaan sidottua oligonukleotidia **ON2** käsiteltiin 2 h seoksella, joka sisälsi joko 4-hydroksibentsaldehydiä (**1**, 100 mg, 0,81 mmol) liuotettuna pyridiiniin (1 ml) tai 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydiä (**1,64** mg, 0,10 mmol) liuotettuna pyridiiniin (1,5 ml) ja merkaptotikkahapon (13,9 μl) seokseen (**7**). Kantajaan sidottua oligonukleotidia **ON3** käsiteltiin 2 h 3,5-bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydillä (64 mg, 0,10 mmol), liuotettuna pyridiiniin (1,5 ml) ja merkaptotikkahapon (13,9 μl) seokseen (**5**).

Reaktion jälkeen kaikki kiinteät kantajat huuhdeltiin ensin pyridiinillä (3 ml) ja sitten MeCN:llä (10 ml) ja lopuksi kuivattiin paineilmalla. Oligonukleotidit irroitettiin kiinteältä kantajalta jättämällä ne reagoimaan yön yli 25 % ammoniakkin vesiliuokseen 20 °C:een. Kantajalta irrotetut oligonukleotidit kylmäkuivattiin ja puhdistettiin RP-HPLC:lla. **ON1x** ja **ON1x-Hg₂** puhdistettiin menetelmällä A, **ON2x** ensin menetelmällä B ja sitten C ja **ON2x-Hg₂** ja **ON3x-Hg₂** menetelmällä D (taulukko 3).

3.6. LA-ICP-MS-detektorin määritys

Detektorin raja määritettiin oligonukleotideille **ON2x**, **ON2x-Hg₂** ja **ON3x-Hg₂**. Jokaisesta oligonukleotidista tehtiin 10 μM liuos. Jokaisesta 10 μM liuoksesta tehtiin laimennokset 5 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,1 μM , 0,05 μM , 0,01 μM ja 0,005 μM . Käytössä oli kolme lasilevyä, jotka sisälsivät matriisina hiiren aivokudosta. Näyteliuoksia pipetoitiin lasilevylle, aivokudoksen päälle. Ensimmäiselle levylle laitettiin kaikkia **ON2x-Hg₂**-laimennoksia, toiselle levylle **ON3x-Hg₂**:n 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 ja 0,005 μM laimennokset ja kolmannelle levylle **ON3x-Hg₂**:n 5 ja 10 μM laimennokset ja **ON2x**:n 10, 5, 1 ja 0,5 μM laimennokset.

4. Johtopäätökset ja yhteenveto

Työn tulosten perusteella voidaan todeta, että organoelohopea-aptameerien detektoiminen LA-ICP-MS -menetelmällä on mahdollista. Työssä todistettiin myös, että 80-90 nt mittaisen oligonukleotidisekvenssin syntetisoiminen onnistuu suhteellisen hyvin ja sitä pystytään myös jatkokäsittämään oikeanlaisissa olosuhteissa.

Yhdisteen **2** liittäminen on haastavaa menetelmällä, jota tässä työssä käytettiin. Menetelmä on siinä mielessä kätevä, että tuotteen huuhteleva ja kuivaaminen on helppoa tuotteen pysyessä kiinteällä kantajalla kolonnissa. Kolonni menee kuitenkin helposti tukkoon ja haluttua tuotetta saattaa tästä syystä syntyä paljon toivottua vähemmän, kun reaktioliuos ei pääse kulkemaan kolonnin läpi kunnolla. Kolonni tai ruiskut saattavat myös rikkoutua helposti työstettäessä organoelohopean liuosta, jolloin tuotetta menee myös helposti hukkaan. Tämä voisi olla helpompaa, jos löytyisi jokin liuotin, johon yhdiste **2** liukenisi paremmin kuin pyridiiniin.

Projektin suurin ongelma oli oikeanlaisten HPLC-olosuhteiden löytäminen. Kunnollista massaspektrometristä dataa saatiin vasta uuden kolonnin myötä. Todennäköisesti ensimmäisenä syntetisoidut oligonukleotidit **ON1x** ja **ON1x-Hg₂** pystyttäisiin nyt myös havaitsemaan paremmin massaspektrometrillä, jos HPLC-ajo suoritettaisiin BioZen™ oligo -kolonnilla. **ON2** ja **ON3** ovat hieman lyhyempiä sekvenssejä kuin **ON1** mutta todennäköisesti suurempi ongelma jälkimmäisen valmistuksessa oli nimenomaan oikeanlaisten HPLC-olosuhteiden puuttuminen eikä niinkään sekvenssin pituus. Näiden aptameerien tapauksessa voitaisiin myös kokeilla merkaptotikkahapolla suojaamista, sillä se auttoi **ON2x-Hg₂**:n ja **ON3x-Hg₂**:n tapauksessa.

Detektorajamäärityksen perusteella voidaan todeta, että jo 0,005 µM elohopea-aptameeri voidaan detektoida LA-ICP-MS-menetelmää hyödyntäen. Sen perusteella voidaan myös todeta, että mahdollinen seos, joka sisältää di- ja monomerkuroituja sekä kokonaan merkuroimattomia aptameereja, ei häiritse signaalin saantia ainakaan tässä tapauksessa. Voidaan myös todeta, että seoksen aptameerit, jotka eivät sisällä elohopeaa enää ollenkaan, eivät laimenna seosta merkittävästi ainakaan tässä tapauksessa. Näytteessä, joka sisältäisi oikeaa kohdeproteiinia voitaisiin havaita paremmin merkuroimattomien aptameerien vaikutus.

Tulevaisuudessa olisi mielenkiintoista kokeilla menetelmää kudoksenäytteellä, joka sisältäisi aptameerin kohdeproteiineja. Tällöin voitaisiin havaita löytääkö aptameeri kohteensa ja pystyttäisiinkö näkemään selkeästi, minne se sijoittuu. Olisi mielenkiintoista tutkia lisää, miten aptameerin rakenne kestäisi ja voisiko elohopea mahdollisesti jollain tavalla häiritä aptameerin

sitoutumista kohteeseensa. Kohdeproteiinin läsnä ollessa, merkuroidun ja merkuroimattoman aptameerin välille syntyisi todennäköisesti kilpailua. Jos merkuroitu aptameeri olisi edelleen seoksena, joka sisältäisi myös merkuroimatonta aptameeria, aiheuttaisiko se mahdollisesti ongelmia. Olisi kiinnostavaa tietää löytäisivätkö esimerkiksi merkuroimattomat aptameerit nopeammin kohteensa ja näin estäisivät merkuroituja kiinnittymästä. Jos seos aiheuttaisi ongelmia, pystyttäisiinkö synteesiä mahdollisesti parantamaan jotenkin niin, että valmis tuote sisältäisi vain merkuroituja aptameereja. Sopivammalla liuottimella yhdisteelle **2** voitaisiin ainakin mahdollisesti parantaa oksimaation suoritusta ja näin maksimoida tuotteen saanto. Syntetisoidun organoelohopeayhdisteen tiedetään olevan myös hieman epäpuhdasta NMR:n perusteella, joten sen uudelleen syntetisoinnilla voisi myös olla vaikutusta. Yksi pohdittava näkökulma on myös organoelohopeayhdisteiden tiedetty myrkyllisyys. Voiko mahdollisesti esimerkiksi kohdeproteiinia sisältävän näytteen kanssa vaadittava organoelohopeayhdisteen konsentraatio olla sellainen että, se on haitallinen käytettävälle kudokselle.

Projektissa kohdattiin useita ongelmia mutta kaikkiin löytyi lopulta jokin ratkaisu. Tulevaisuudessa samankaltaisten oligonukleotidien syntetisointi on todennäköisesti helpompaa tämän työn aikana ilmenneiden ja ratkaistujen ongelmien tähden. Työn tarkoitus oli syntetisoida organoelohopea-aptameeri, joka voitaisiin havaita LA-ICP-MS-menetelmällä. Tässä tavoitteessa onnistuttiin.

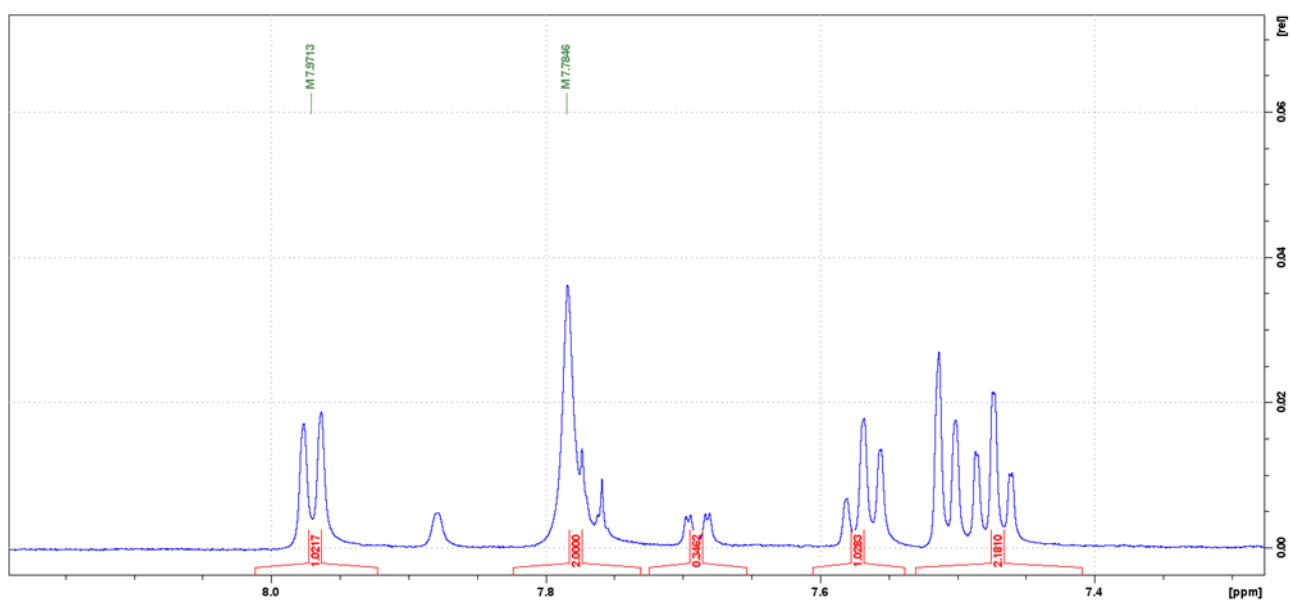
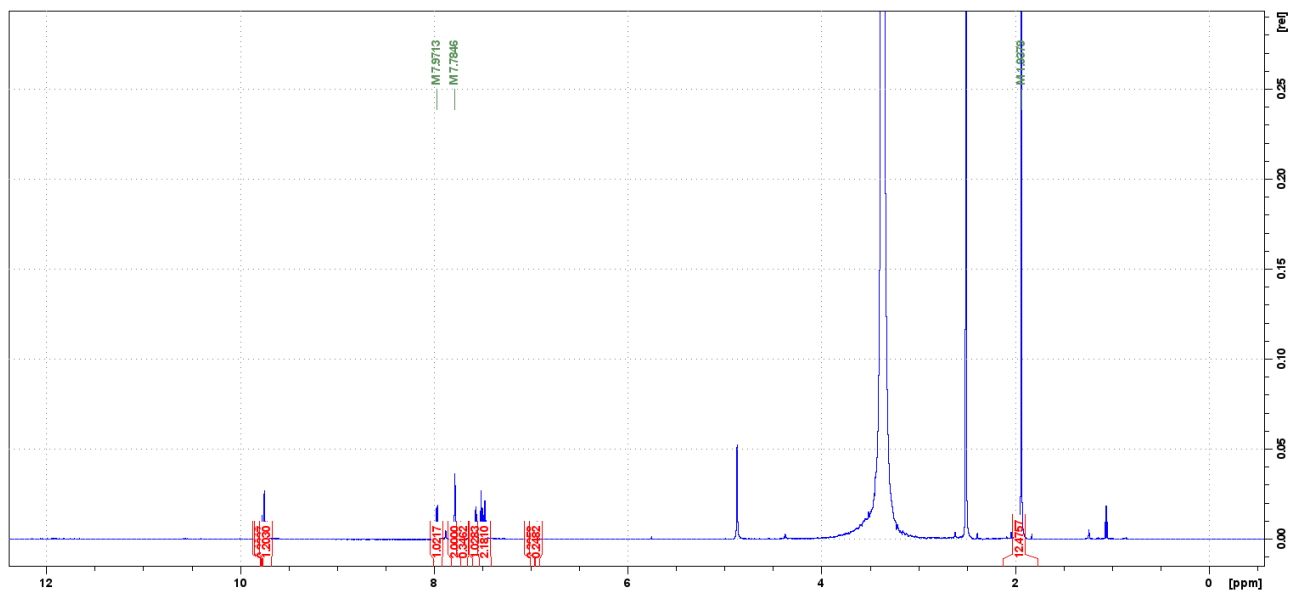
5. Viitteet

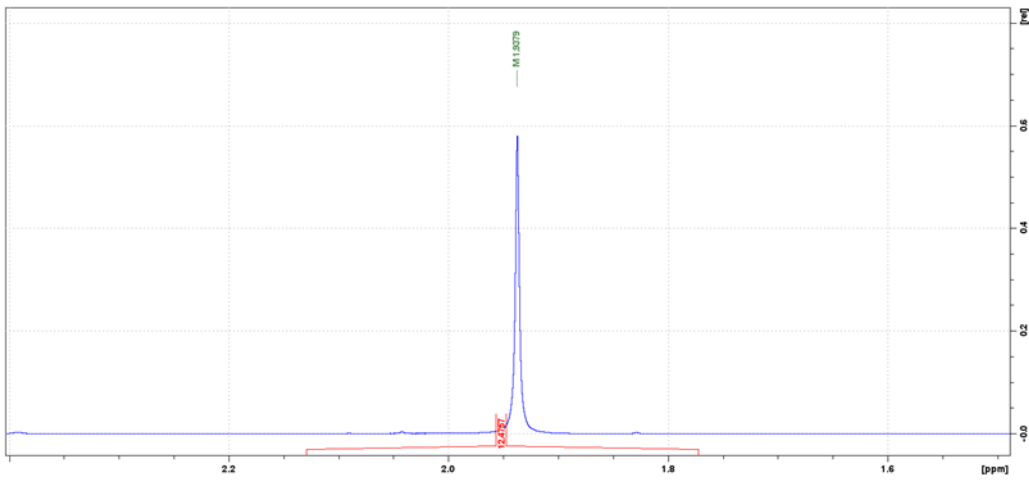
1. Röthlisberger P, Hollenstein M. Aptamer chemistry. *Adv Drug Deliv Rev* **2018**, 134, 3–21.
2. Kohlberger M, Gadermaier G. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2022**, 69, 1771–1792
3. Zhou J, et al. *Chem Biol* **2015**, 22, 379–390.
4. Wang C. Y., Lin B. L., Chen C. H. *Int J Cancer* **2016**, 138, 918–926.
5. Wolter, A. C. et al. *Angewandte Chemie* **2017**, 129, 412–415.
6. Huang, Y. et al. *Food Chem* **2015**, 166, 623–629.
7. Shrivastava S, Sohn I. Y., Son Y. M., Lee W. Il, Lee N. E. *Nanoscale* **2015**,7, 19663–19672.
8. Ellington A. D., Szostak J. W. *Nature* **1990**, 346, 818–822
9. Tuerk C, Gold L. *Science* **1990**, 249, 505–510
10. Sola M. et al. *Molecular Therapy Nucleic Acids* **2020**, 21, 192–204
11. Yüce M, Kurt H, Hussain B, Budak H. *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials: Concepts, Development and Clinical Translation* **2018**, 211–243.
12. Bayat P. et al. *Biochimie* **2018** 154, 132–155
13. Schütze T. et al.. *PLoS One* **2011**, 6, e29604.
14. Hays E. M., Duan W, Shigdar S. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2576.
15. Shangguan D. et al. *Pnas* **2006**, 103, 11838 –11843.
16. Shangguan D. et al. *Anal Chem* **2008**, 80, 721–728.
17. Kunii T, Ogura S. I., Mie M, Kobatake E. *Analyst* **2011**, 136, 1310–1312.
18. Cao H. Y., Yuan A. H., Chen W, Shi X. S., Miao Y. *BMC Cancer* **2014**, 14, 699.
19. Moghadam M. et al. *Int Immunopharmacol* **2016**, 36, 324–332.
20. Macedo B, Cordeiro Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 1023.
21. Griffin L. C., Tidmarsh G. F., Bock L. C., Toole J. J., Leung L. L. K. *Blood*, **1993**, 81, 3271-3276.
22. Matsunaga K. I. et al. *Sci Rep* **2015**, 5, 18478.
23. Stein C. A., Castanotto D. *Molecular Therapy* **2017**, 25 1069–1075.
24. Campbell J. M., Bacon T. A., Wickstrom E. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1990**,20, 259-267.
25. Singh S. K., Koshkin A. A., Wengel J, Nielsen P. *Chem. Commun.* **1998** 455–456.
26. Vater A., Klussmann S. *Drug Discovery Today* **2015**, 20, 147–155.
27. Chiu M. L., Goulet D. R., Teplyakov A., Gilliland G. L. *Antibodies* **2019**, 8, 55.
28. Thiviyanathan V., Gorenstein D. G. *Proteomics - Clinical Applications* **2012** 6 563–573.

29. Zhang Y., Lai B. S., Juhas M. *Molecules* **2019** 24, 941.
30. Yu Y. *et al.* *Anal Chem* **2020**, 92, 6312–6320.
31. Carvalho J. *et al.* *Sci Rep* **2019**, 9, 7945.
32. Doble P. A., de Vega R. G., Bishop D. P., Hare D. J., Clases, D. *Chem Rev* **2021**, 121, 11769–11822.
33. Barbosa L. D., Sussulini A. *Biomed Spectrosc Imaging* **2020**, 8, 47–54.
34. Pozebon D., Scheffler G. L., Dressler V. L. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2017**, 32 890–919.
35. Limbeck A. *et al.* *Anal Bioanal Chem* **2015**, 407, 6593–6617.
36. Figg D. J., Cross J. B. & Brink C. *Applied Surface Science* **1998**, 127, 287–291.
37. Wang M. *et al.* *Anal Chem* **2014**, 86, 10252–10256.
38. Reifschneider O. *et al.* *Chem Res Toxicol* **2020**, 33, 1250–1255.
39. Clases D., Sperling M., Karst U. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2018**, 104 135–147.
40. Prange A., Pröfrock D. *J Anal At Spectrom* **2008**, 23, 432–459.
41. He Y. *et al.* *Applied Spectroscopy Reviews* **2014**, 49, 492–512.
42. Maity S. K., Lönnberg T. A. *ACS Omega* **2019**, 4, 18803–18808.
43. Kotammagari T.K., Saleh L.Y., Lönnberg T. *Chem. Commun.* **2024**, 60, 3118–3128

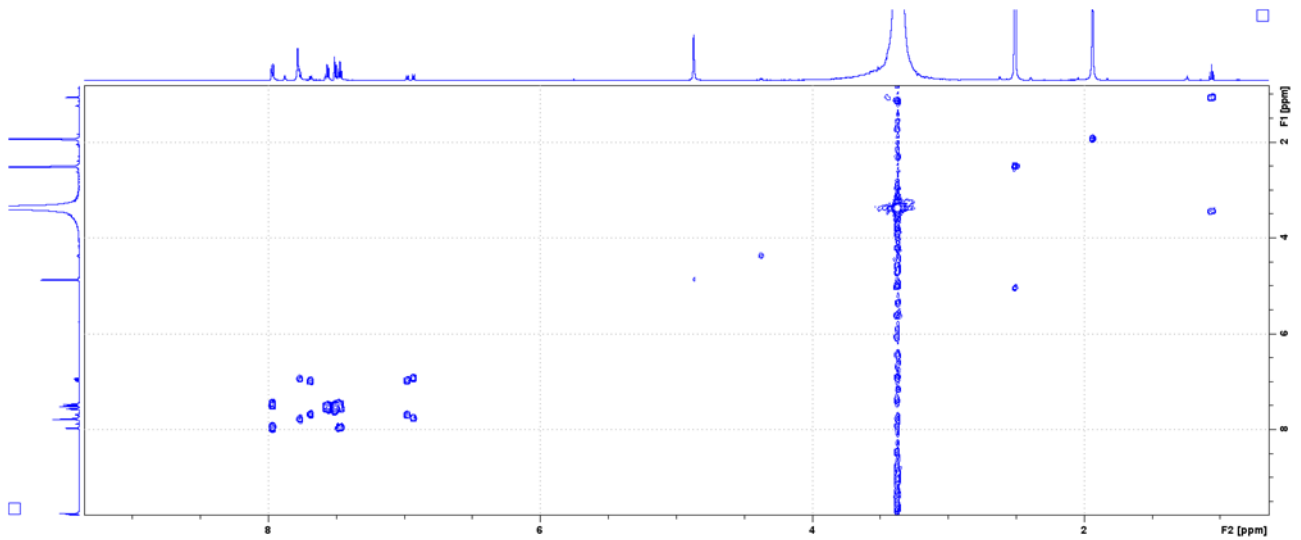
6. Liitteet

Liite 1. 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydin ^1H NMR-spektri.

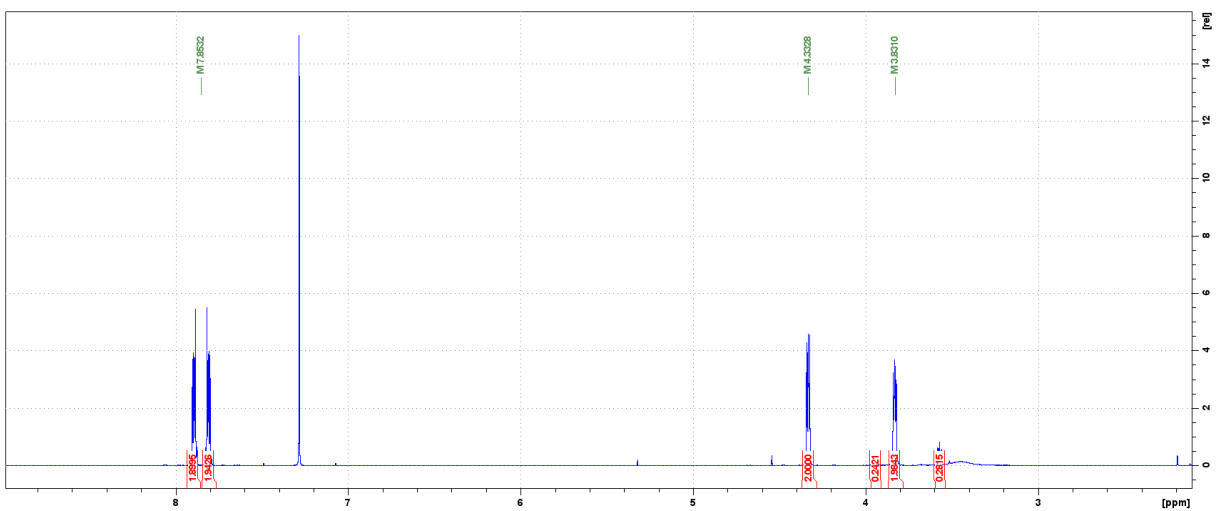


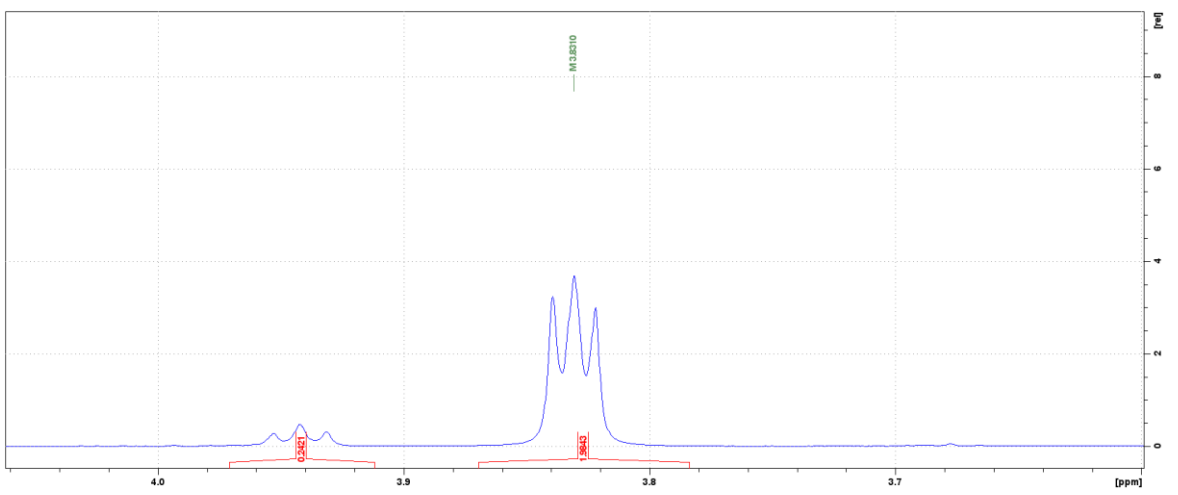
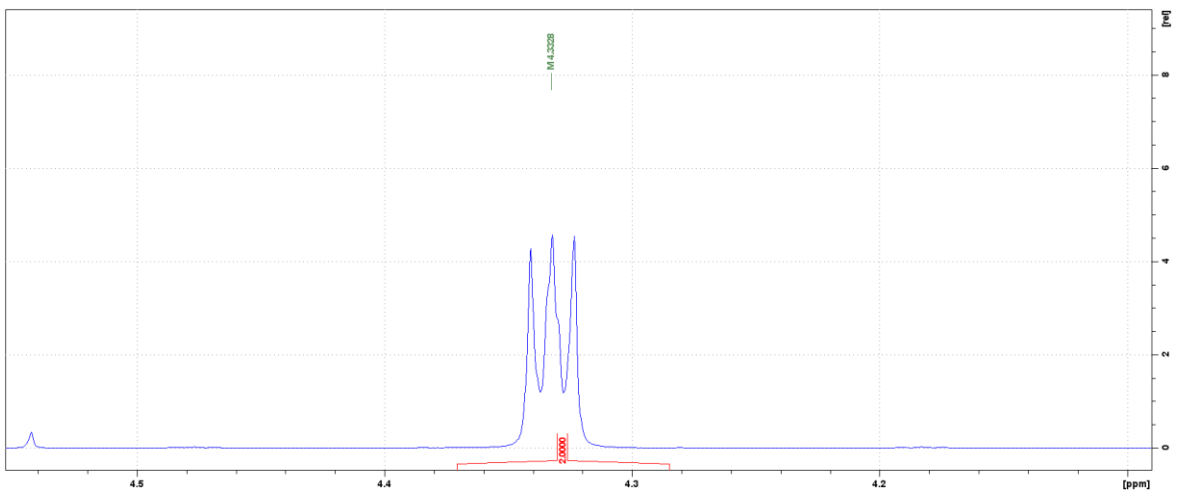
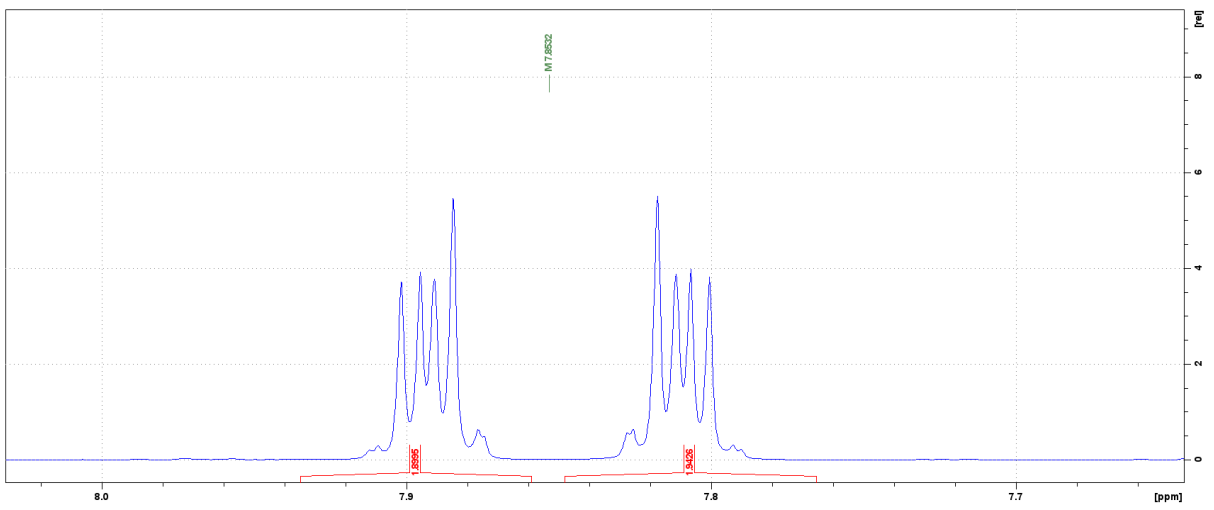


Liite 2. 3,5-Bis(asetoksimerkuri)-4-hydroksibentsaldehydin COSY.

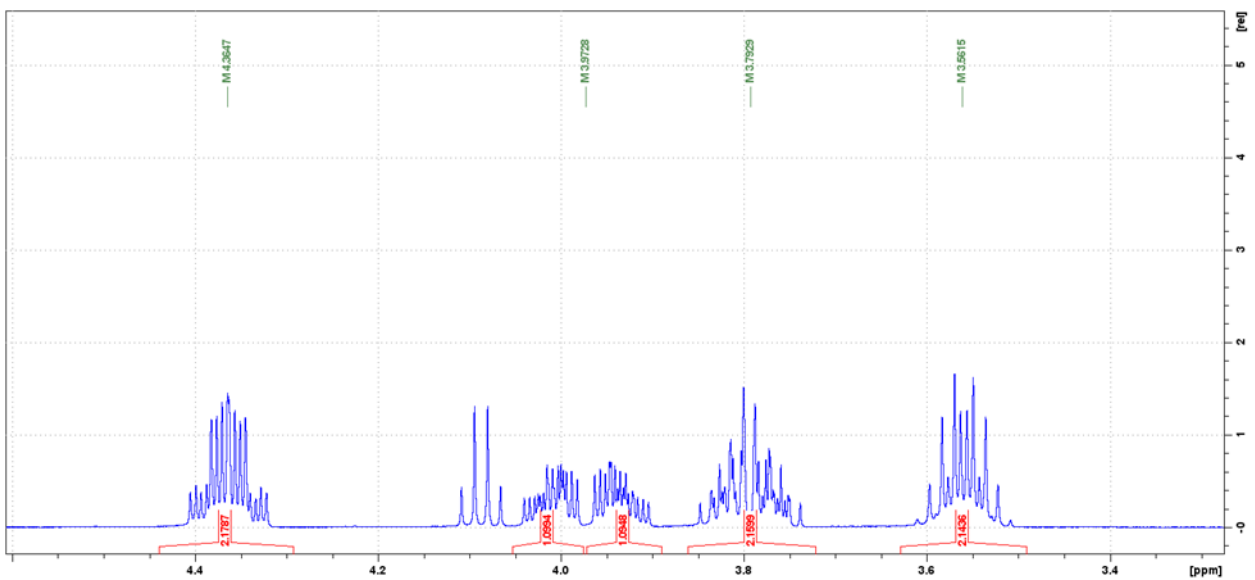
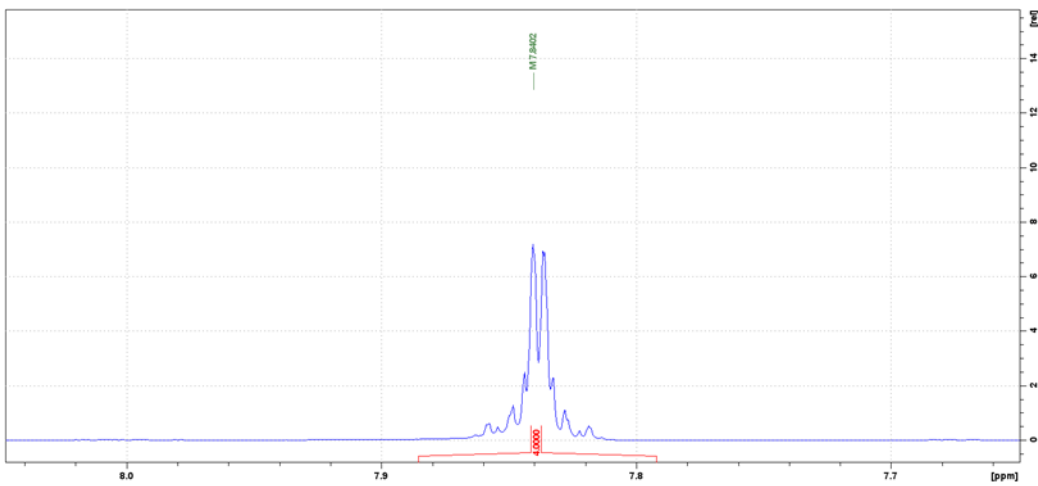
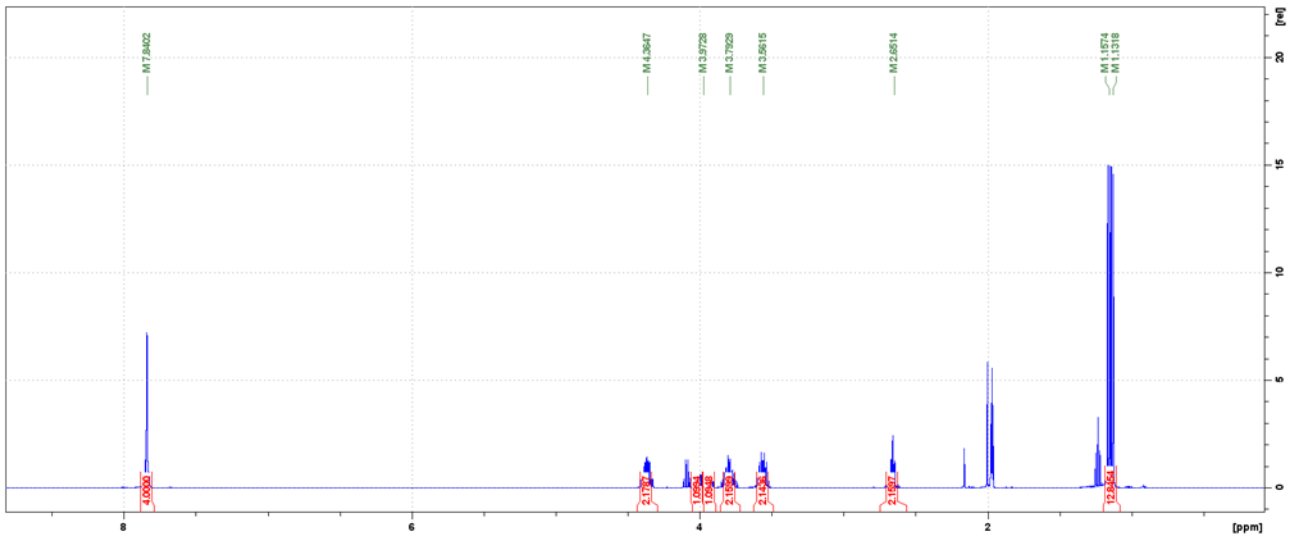


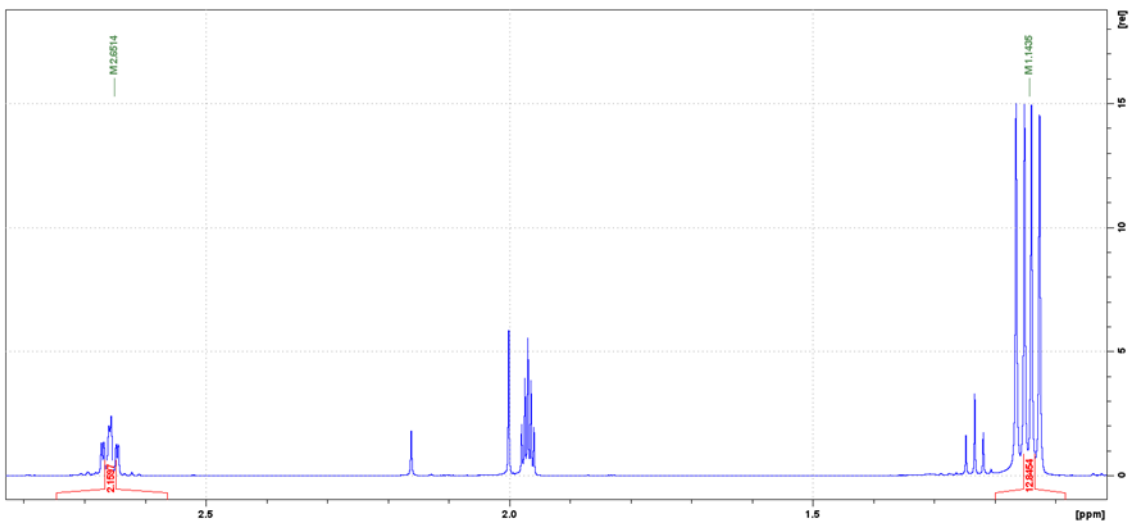
Liite 3. Välituotteen 4 ^1H NMR-spektri.



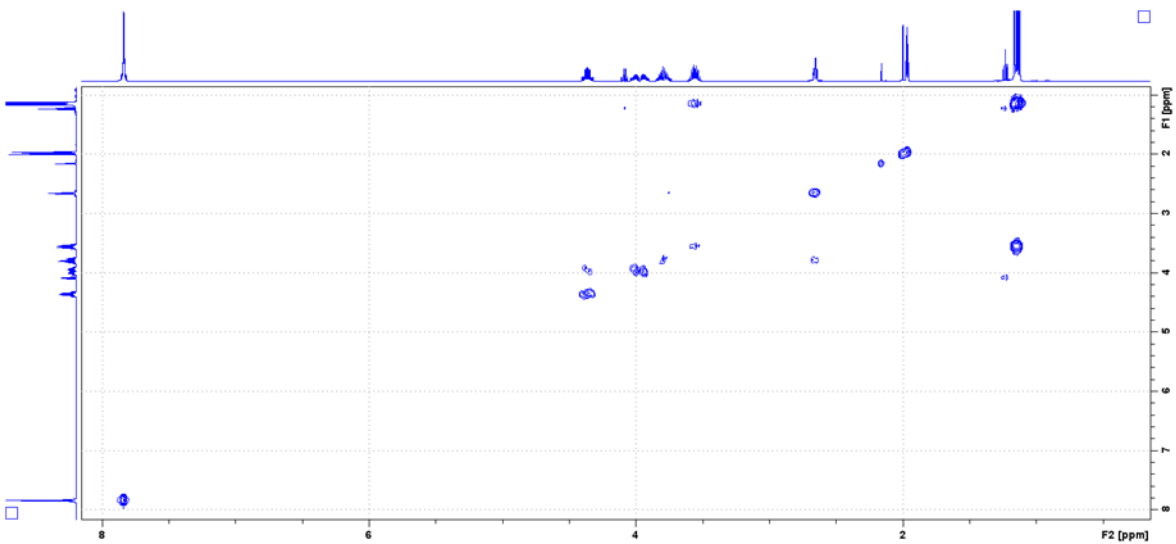


Liite 4. 2-syanoetyyli (2-((1,3-diooksoisindolin-2-yyli)oksi)etyyli) diisopropyylifosforamidiitin(5) ¹H NMR-spektri.

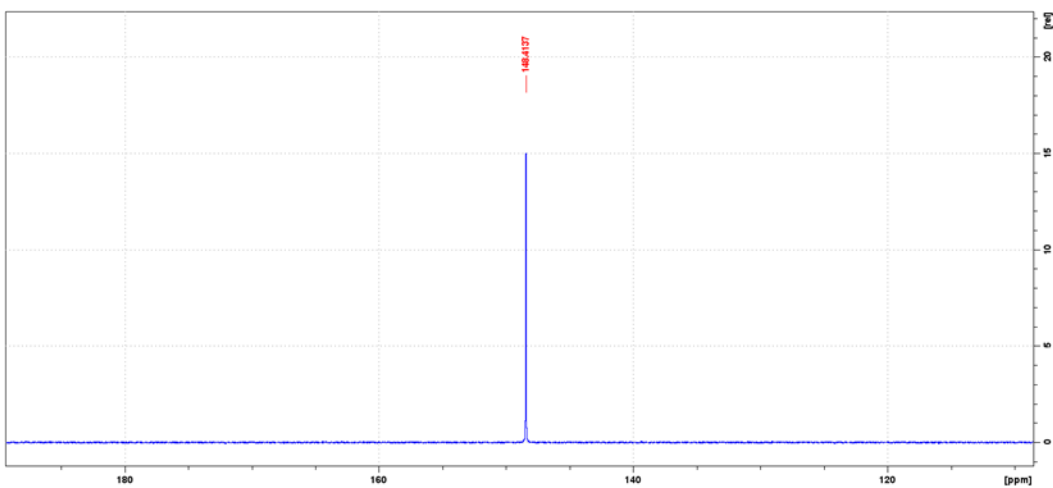




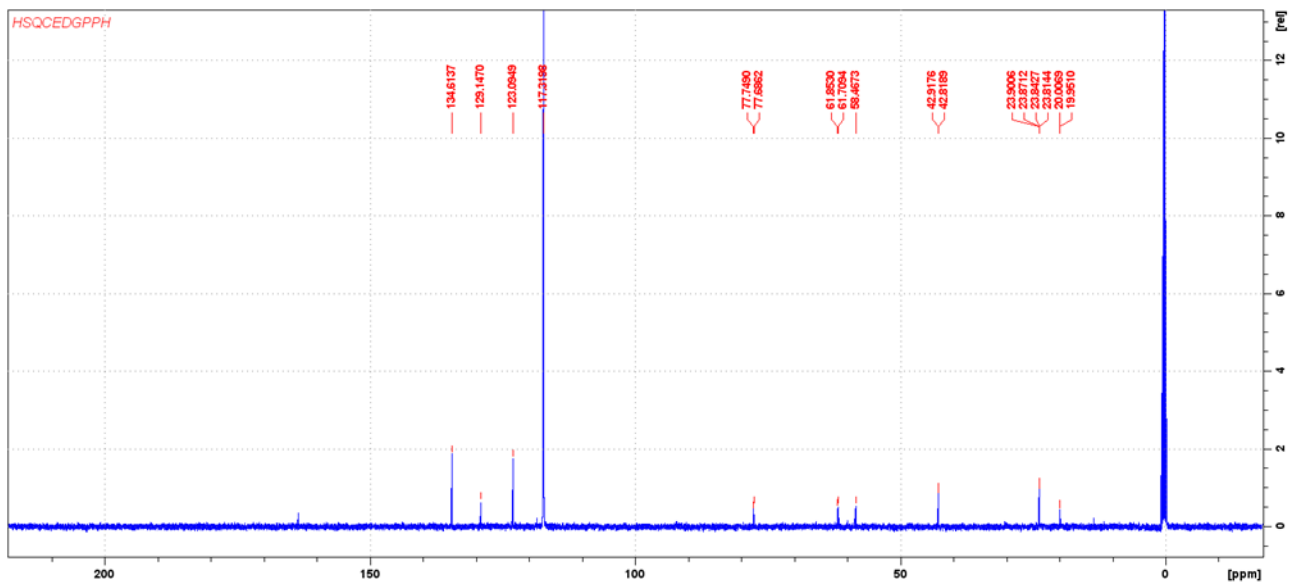
Liite 5. 2-syanoetyyli (2-((1,3-diooksoisoinolin-2-yyli)oksi)etyyli) diisopropyylifosforamidiitin (5) COSY.



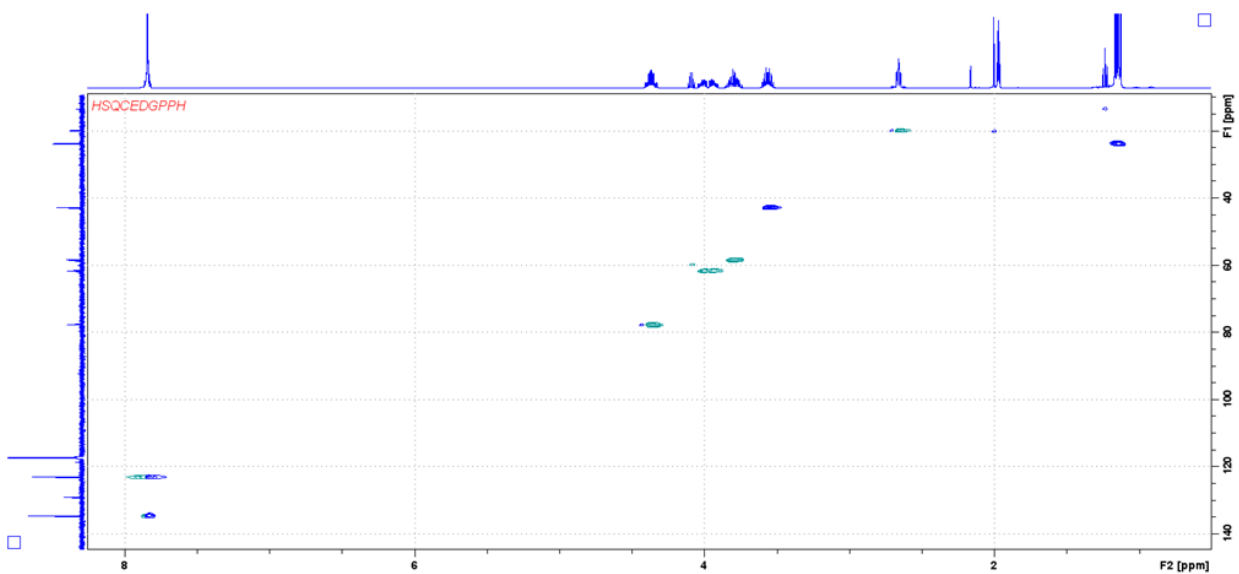
Liite 6. Liite 6. 2-syanoetyyli (2-((1,3-diooksoisoinolin-2-yyli)oksi)etyyli) diisopropyylifosforamidiitin(5) ^{31}P NMR- spektri.



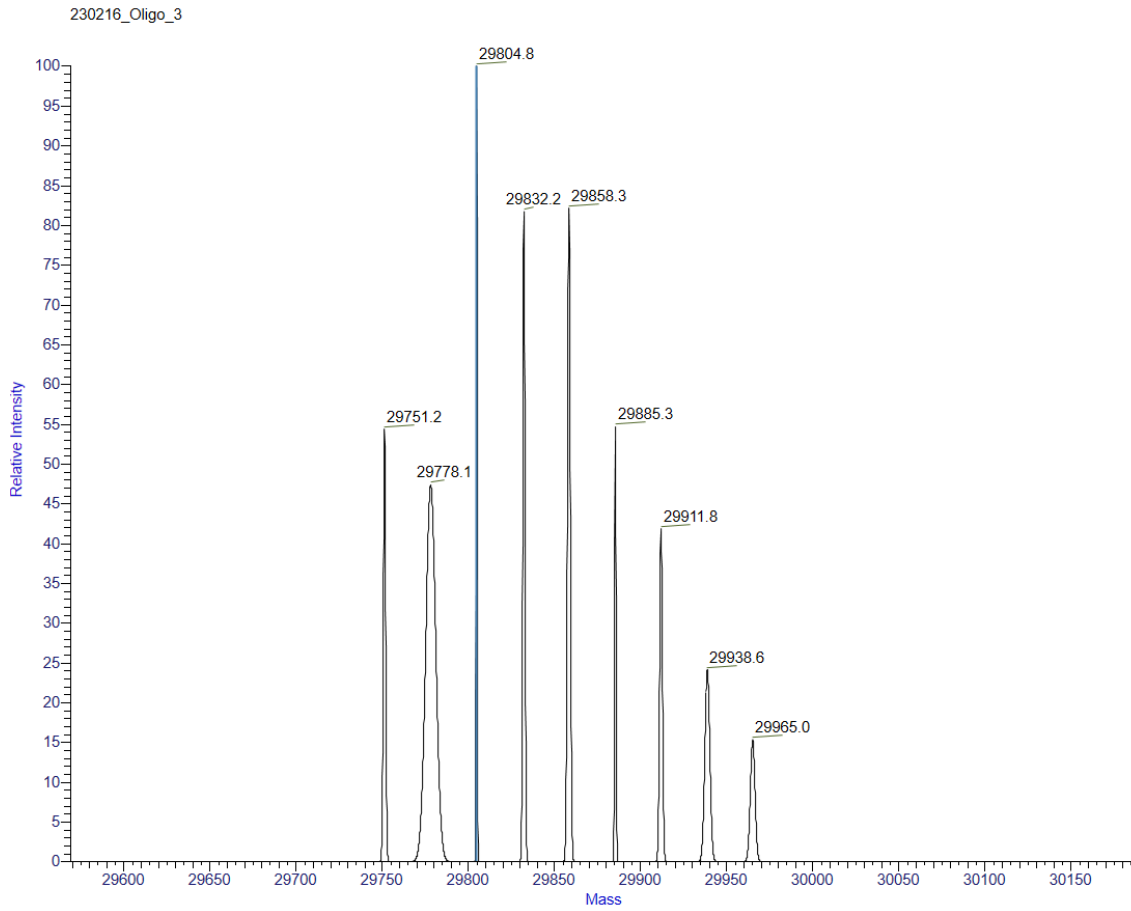
Liite 7. 2-syanoetyyli (2-((1,3-diooksoisindolin-2-yyli)oksi)etyyli) diisopropyylifosforamidiitin (5) ^{13}C NMR-spektri.



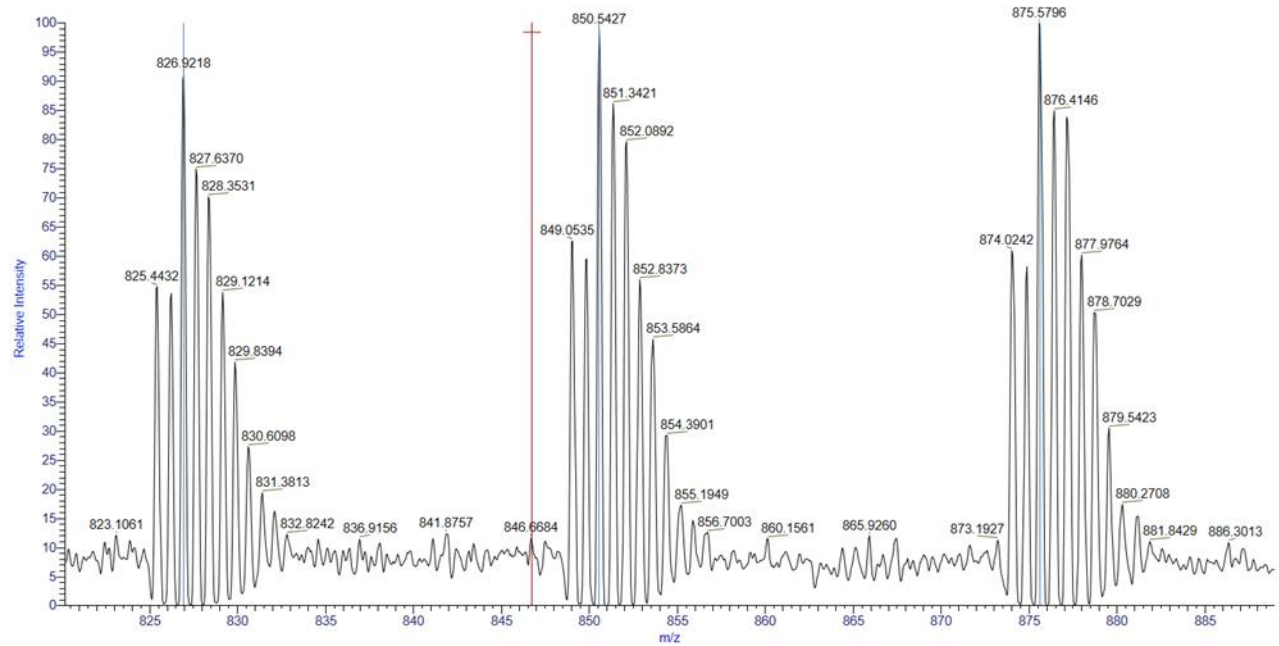
Liite 8. 2-syanoetyyli (2-((1,3-diooksoisindolin-2-yyli)oksi)etyyli) diisopropyylifosforamidiitin(5) HSQC.



Liite 9. Oligonukleotidin ONIX massaspektri Orbitrap fusion lumos massaspektrometrillä.

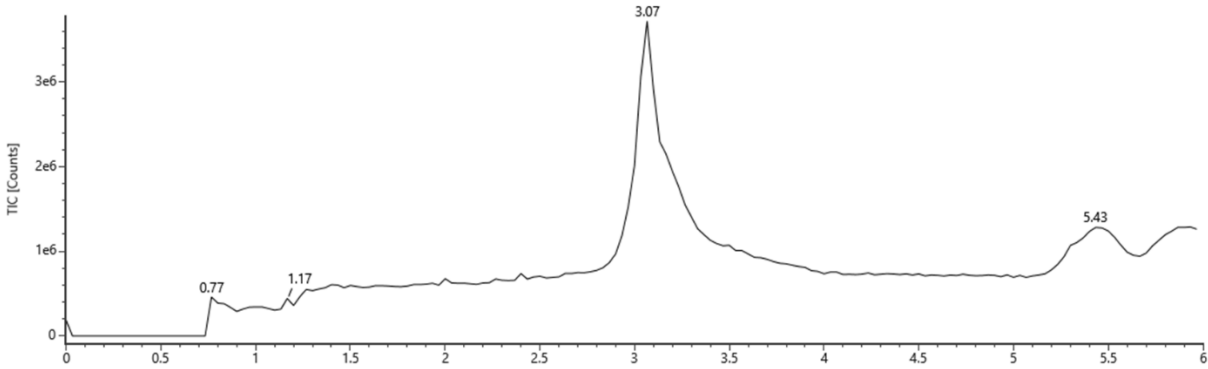


230216_Oligo_3 #761-905 RT:2.195-3.830 AV:145

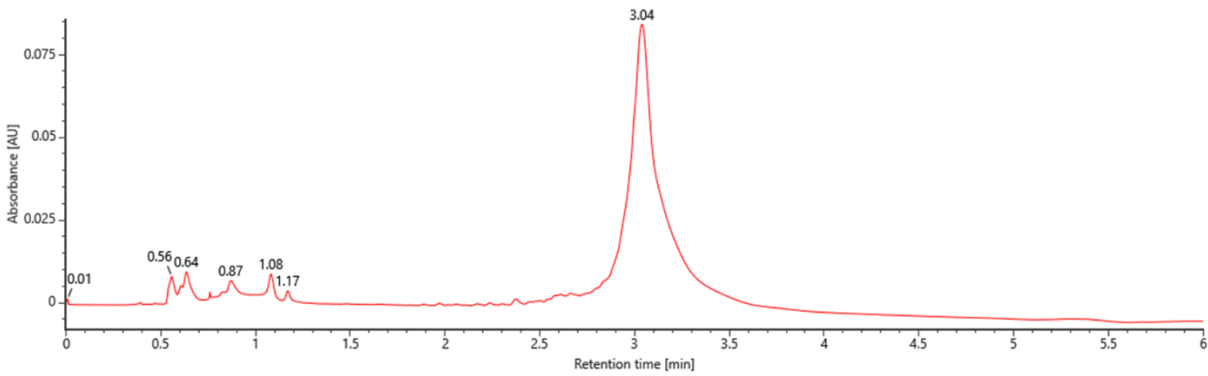


Liite 10. Oligonukleotidin ON2x UV- ja massaspektri.

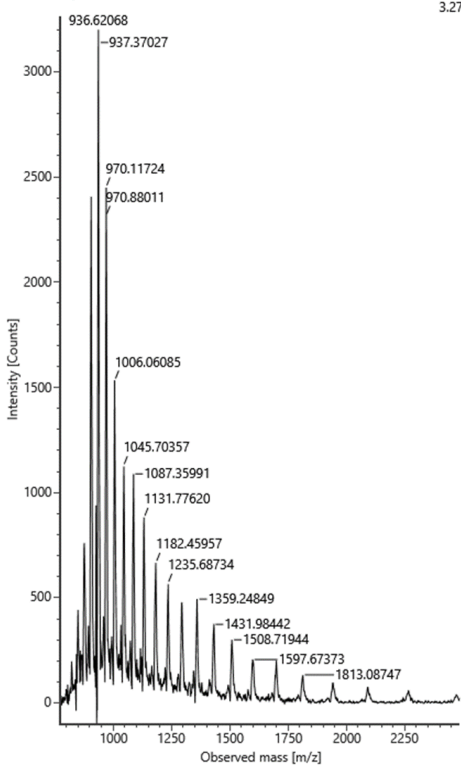
Item name: Ida 2
Channel name: 1: TOF MSe (400-5000) -43V ESI- (TIC)



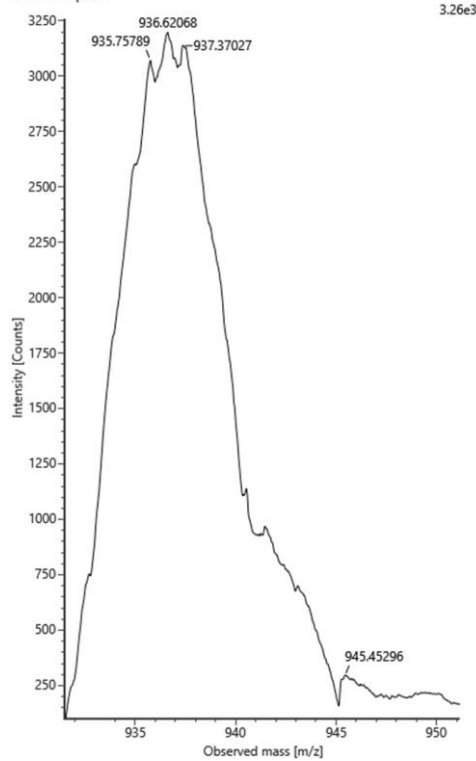
Item name: Ida 2
Channel name: PDA 254@1.2



Item name: Ida 2 Channel name: 1: Average Time 3.0668 min : TOF MSe...
Item description:

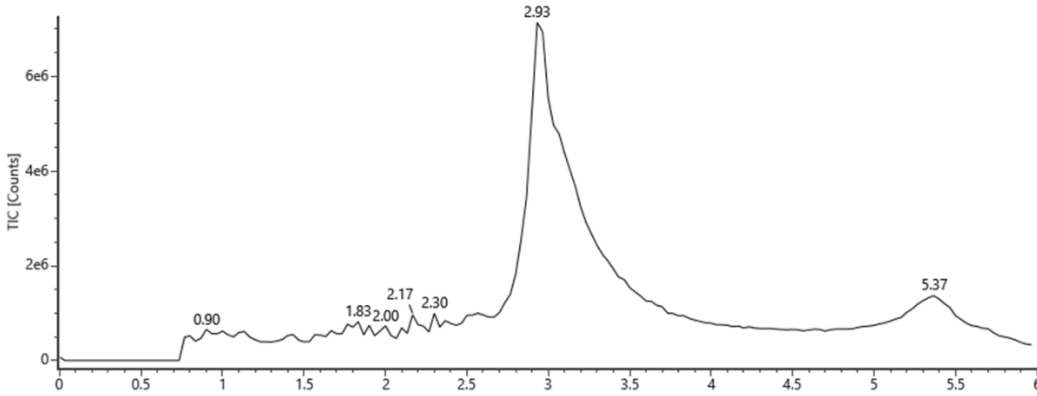


Item name: Ida 2 Channel name: 1: Average Time 3.0668 min : TOF MSe...
Item description:

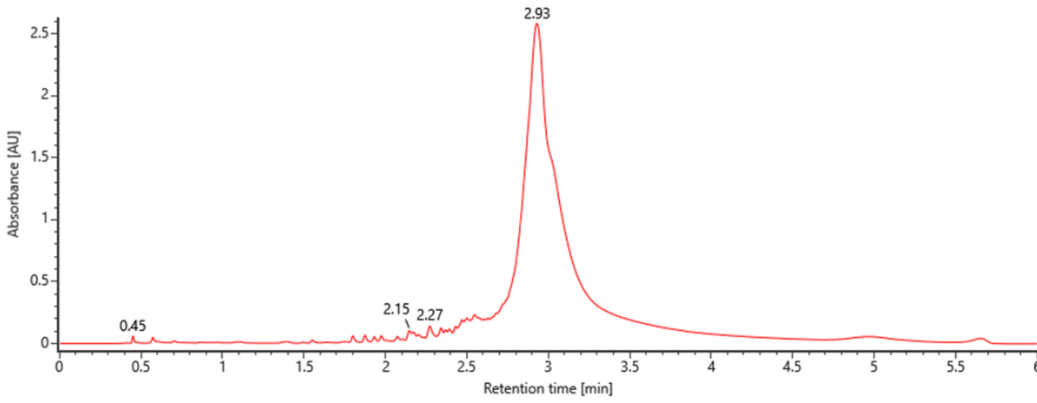


Liite 11. Oligonukleotidin ON2x-Hg₂ UV- ja massaspektri.

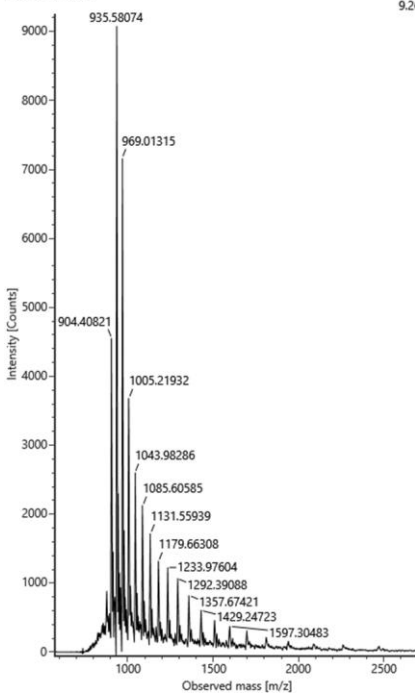
Item name: puhdas Hg-aptameeri 2
Channel name: 1: TOF MSe (400-5000) -43V ESI- (TIC)



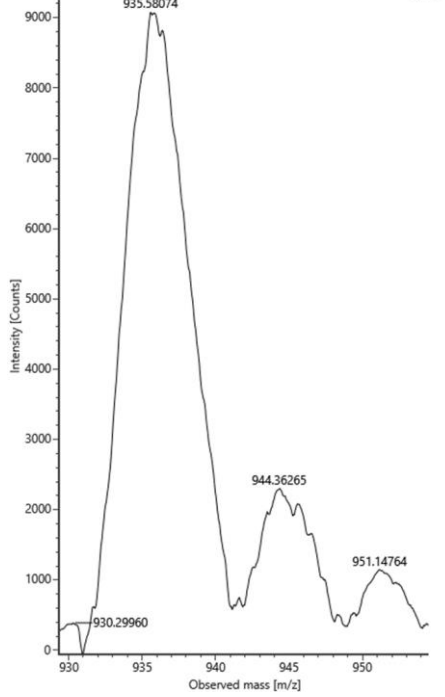
Item name: puhdas Hg-aptameeri 2
Channel name: PDA 254@1.2



Item name: puhdas Hg-aptameeri 2 Channel name: 1: Average Time 2.9...
Item description:

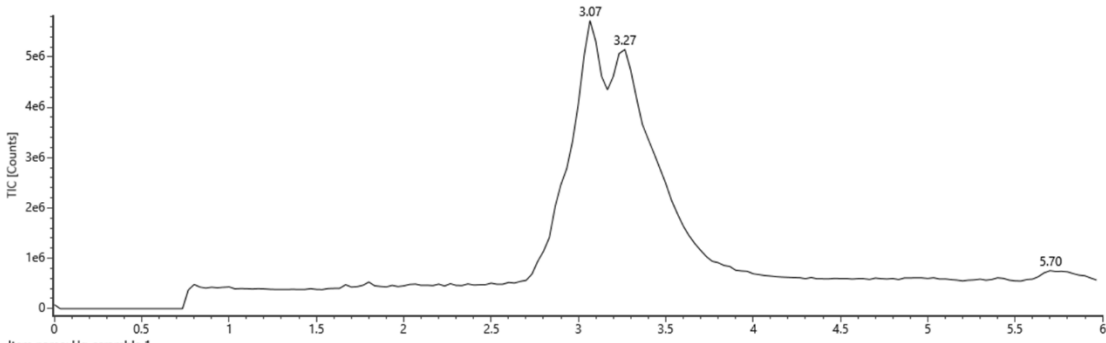


Item name: puhdas Hg-aptameeri 2 Channel name: 1: Average Time 2.9...
Item description:

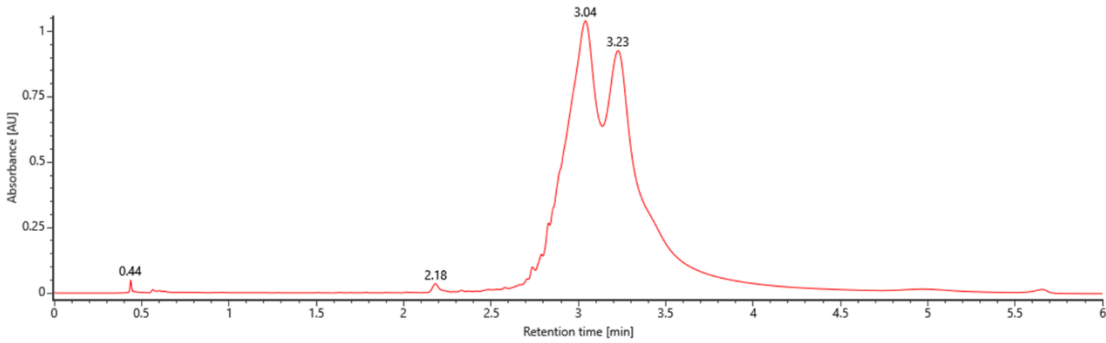


Liite 12. Oligonukleotidin ON3x-Hg₂ UV- ja massaspektri.

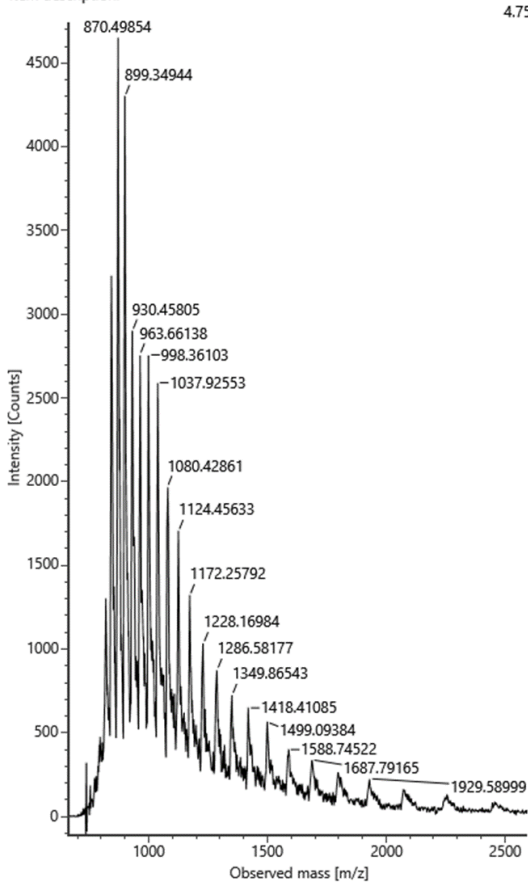
Item name: Hg-scramble 1
Channel name: 1: TOF MSe (400-5000) -43V ESI- (TIC)



Item name: Hg-scramble 1
Channel name: PDA 254@1.2



Item name: Hg-scramble 1 Channel name: 1: Average Time 3.0835 min ...
Item description:



Item name: Hg-scramble 1 Channel name: 1: Average Time 3.0835 min ...
Item description:

