



**PEPTIDOGLYKAANIN HAJOTTAMINEN, PUHDISTUS JA
KARAKTERISOINTI**

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

18.6.2019

Alexandra Ojala

TIIVISTELMÄ

Tutkielman kirjallisessa osassa perehdytään bakteerin soluseinän biosynteesin, peptidoglykaanin hajottamiseen, puhdistamiseen sekä karakterisointiin. Kokeellisessa osassa valmistettiin kahta lähtöainetta, joita voidaan käyttää lysostafiinientsyymien siirtymätila-analogin valmistamisessa. Valmistetut komponentit olivat suojattu aminometyylihyposforihapoke sekä *N*-akryloyylylglysiini.

Peptidoglykaanin biosynteesiä käydään läpi aloittaen sytoplasmassa tapahtuvista reaktioista siirtyen aikajanaan eteenpäin solukalvon sisäreunalla ja sen ulkopuolella tapahtuviin reaktioihin. Kussakin vaiheessa käydään läpi reaktioita mahdollistavat entsyymit. Biosynteesin tarkastelu päätetään ristsiltoja muodostavien entsyymien toimintaan. Peptidoglykaanin hajottamisesta käydään läpi niin autolysiinien kuin antibioottienkin toiminta. Useat antibiootit estävätkin juuri biosynteesissä vaikuttavien entsyymien toimintaan.

Peptidoglykaanin tutkimuksesta perehdytään peptidoglykaanin eristämiseen ja puhdistukseen, sekä erilaisiin menetelmiin, joita käyttäen voidaan karakterisoida sen rakennetta. Usein peptidoglykaani erotetaan muista soluseinän osista ja hajotetaan liukenevaan muotoon. On myös olemassa analyysimenetelmiä, joilla voidaan tutkia liukenematonta peptidoglykaania. Erikokoisia peptidoglykaanifragmentteja on myös mahdollista valmistaa.

Peptidoglykaanin rakenteen ja siihen vaikuttavien entsyymien tutkiminen on tärkeää sillä, ne ovat potentiaalisia kohteita esimerkiksi uusille antibiooteille. Entsyymejä voidaan tutkia siirtymätila-analogien avulla. Ymmärtämällä entsyymien toimintamekanismeja on mahdollista kehittää parempia inhibiittoreita tai uusia entsyymien kaltaisia molekyyliä, jotka voivat katalysoida haluttuja reaktioita.

ESIPUHE

Pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella helmikuun 2018 ja toukokuun 2019 välisenä aikana. Työtä ohjasivat dosentti Elina Sievänen ja professori Perttu Permi, joita haluan kiittää kannustavasta ja asiantuntevasta ohjauksesta.

Lisäksi haluan kiittää perhettäni ja Eeroa tuesta ja kannustamisesta sekä ystäviäni, etenkin tollopanoja, vertaistuesta ja loistavasta kahviseurasta.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	i
ESIPUHE	ii
SISÄLLYSLUETTELO.....	iii
KÄYTETYT LYHENTEET	v

KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO.....	1
2 PEPTIDOGLYKAANI	2
2.1 Peptidoglykaanin rakenne.....	3
2.1.1 Polysakkaridirungon rakenne ja vaihtelu	5
2.1.2 Peptidirisiltojen rakenne ja vaihtelu	7
2.2 Peptidoglykaanin biosynteesi	10
2.2.1 Sytoplasmassa tapahtuvat reaktiot	11
2.2.2 Solukalvon sisäkalvolla tapahtuvat reaktiot.....	15
2.2.3 Periplasmassa tapahtuvat reaktiot	16
2.2.4 Peptidoglykaanin biosynteesin säätely.....	18
2.3 Peptidoglykaanin hajottaminen solussa.....	18
2.3.1 Autolysiinit.....	19
2.3.2 Antibiootit	20
3 PEPTIDOGLYKAANIN TUTKIMINEN	26
3.1 Peptidoglykaanin hajottaminen	27
3.2 Peptidoglykaanin puhdistus	28
3.3 Peptidoglykaanin karakterisointi	32
3.3.1 Nestekromatografia	32
3.3.2 Massaspektrometria.....	36
3.3.3 NMR-spektroskopia	37
3.4 Peptidoglykaanifragmenttien valmistus synteettisesti.....	41

KOKEELLINEN OSA

4	TYÖN TARKOITUS	44
5	KÄYTETYT LAITTEET JA REAGENSIT	46
6	SIIRTYMÄTILA-ANALOGIN KOMPONENTTIEN VALMISTUS	48
6.1	Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus	48
6.2	<i>N</i> -akryloyyliyglysinaatin valmistus	49
7	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	50
7.1	Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus	51
7.2	<i>N</i> -akryloyyliyglysinaatin valmistus	54
8	YHTEENVETO	56
9	SYNTEESIOHJEET	58
9.1	Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus	58
9.2	<i>N</i> -akryloyyliyglysinaatin valmistus	59
	KIRJALLISUUSLUETTELO	61
	LIITTEET	65

KÄYTETYT LYHENTEET

ADP	Adenosiinidifosfaatti
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
Cbz	Bentsyyliformiaatti
CPaasi	Karboksipeptidaasi
COSY	Korrelaatio-spektroskopia
DA	Diaminohappo (yleensä L-lysiini tai mesodiaminopimelaatti)
D-AAT	D-aminohapotransferaasi
DAP	Diaminopimeliinihappo
Ddl	D-ala-D-ala-ligaasi
DNaasi	Deoksiribonukleaasi
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
EPaasi	Endopeptidaasi
ESI	Sähkösumutusionisaatio
FADH ₂	Flaviinialaniininukleotidi
FtsZ	Tubuliininkaltainen proteiini, joka vaikuttaa bakteerin solujakautumisessa
GlcNAc	<i>N</i> -asetyyliglukosamiini
GTaasi	Glykosyylitransferaasientsyymi
HEPES	4-(2-Hydroksietyyli)-1-piperatsiinietaanisulfonihappo
HMBC	Heteronukleaarinen pitkän kantaman korrelaatio-spektroskopia
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HSQC	Heteronukleaarinen lyhyen kantaman korrelaatio-spektroskopia

Lys	Lysiini
MALDI	Matriisiavustettu laserdesorptioionisaatio
MAS	Magic-Angle spinning, pyöritys maagisessa kulmassa
MreB	Aktiininkaltainen, bakteerien sauvamaista muotoa ylläpitävä proteiini
MurNAc	<i>N</i> -asetyylimuramiinihappo
NADPH	Nikotiiniamidiadeniinukleotididifosfaatti
NOESY	Nukleaariseen Overhauser-efektiin perustuva spektroskopia
PBP	Penisilliiniä sitovat proteiinit
PEP	Fosfoenolipyruvaatti
RNAasi	Ribonukleaasi
TFA	Trifluorietikkahappo
TPaasi	Transpeptidaasi
Tris	2-Amino-2-(hydroksimetyyli)-1,3-propaanidioli
TLC	Ohutkerroskromatografia
Troc	2,2,2-Trikloorietoksikarbonyylikloridi
UDP	Uridiidifosfaatti
UMP	Uridiinimonofosfaatti
UP	Undekaprenyylifosfaatti
UPLC	Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia
UTP	Uridiinitrifosfaatti

KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO

Tässä Pro Gradu -tutkielmassa käsitellään bakteerin soluseinän peptidoglykaanin biosynteesiä sekä peptidoglykaanin hajottamista, puhdistamista ja karakterisointia. Peptidoglykaani on bakteerin soluseinän tärkeä osa, joka koostuu polysakkaridirungosta sekä toisiinsa sitoutuneista peptidisilloista. Toistuvarakenteinen peptidoglykaani saa makromolekyylinä verkkomaisen rakenteen, joka suojaa bakteerisolua.

Peptidoglykaanin biosynteesi käydään läpi vaiheittain alkaen sytoplasmassa tapahtuvista reaktioista. Biosynteesissä on lukuisia vaiheita ja siihen osallistuu useita entsyymejä. Se on tarkasti säädelty prosessi. Biosynteesin vaiheita tapahtuu niin solukalvon sisä- kuin ulkopuolella. Ensin muodostuvat polysakkaridirunko ja kantapeptidi. Lopuksi uusi peptidoglykaani liitetään osaksi olemassa olevaa soluseinää.

Peptidoglykaania voidaan hajottaa solun itsensä toimesta. Hajottavia entsyymejä kutsutaan autolysiineiksi. Niiden lisäksi peptidoglykaani voidaan hajottaa käyttäen antibiootteja tai tiettyjen entsyymien toimesta. Tutkimuksessa käytettävät entsyymit valitaan sen mukaan, miten peptidoglykaania halutaan hajottaa. Peptidoglykaanista voidaan erikseen karakterisoida sen polysakkaridirunko, kantapeptidiketju ja muropeptideiksi kutsutut fragmentit, jotka sisältävät vaihtelevan määrän polysakkarirunkoa ja peptidiketjua.

Peptidoglykaanin tutkimuksessa peptidoglykaani tulee erottaa muista solun osista ja analyysimenetelmästä riippuen saada liukoiseen muotoon, sillä makromolekyylinä peptidoglykaani ei ole liukoinen. Lisäksi on olemassa analyysimenetelmiä, joilla voidaan tutkia liukenematonta peptidoglykaania. Erikokoisia peptidoglykaanifragmentteja on myös mahdollista valmistaa.

2 PEPTIDOGLYKAANI

Peptidoglykaani on tärkeä osa bakteerin soluseinää. Bakteerin soluseinän tehtävänä on muun muassa suojata solua osmoottiselta hajoamiselta sekä ylläpitää solun muotoa ja jäykkyyttä.¹ Toistuvarakenteinen peptidoglykaanimolekyyli koostuu polysakkaridirungosta, kantapeptidistä ja niitä ristosilloittavista peptidisilloista. Runko-osassa vuorottelevat sokerijohdannaiset *N*-asetyyli-glukosamiini (GlcNAc) ja *N*-asetyyli-muramiinihappo (MurNAc). Kantapeptidit ja peptidiristisillat koostuvat muutamasta aminohaposta, jotka voivat vaihdella.²

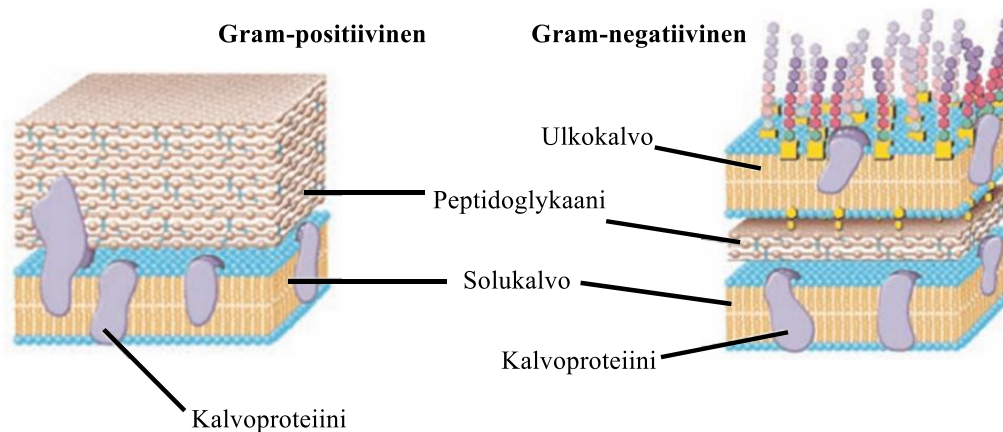
Soluseinän peptidoglykaanin kasvu on dynaaminen ja monimutkainen prosessi, jossa uuden peptidoglykaanin synteesi vaatii olemassa olevien sidosten katkaisemista soluseinässä ja uuden molekyylin samanaikaista liittämistä osaksi soluseinää. Tämän vuoksi prosessi on tarkoin säädelty ja sitä ohjaavat useat entsyymit. Biosynteesi tapahtuu kolmessa vaiheessa ja sen reaktioita tapahtuu niin solulimassa kuin solun sisä- ja ulkokalvolla.³

Peptidoglykaanin hajottamiseen bakteeri tarvitsee erilaisia hydrolysoivia entsyymejä. Niitä tarvitaan esimerkiksi uuden peptidoglykaanimolekyylin liittämiseen jo olemassa olevaan peptidoglykaaniin. Hydrolaasientsyymeitä tarvitaan lisäksi solunjakautumisessa ja itiön muodostamisessa sekä apoptoosissa eli ohjatussa solukuolemassa.⁴ Jokaiselle glykosidi- ja amidisidokselle on oma hydrolaasientsyyminsä, vaikka osalla näistä entsyymeillä voinkin olla useampia tehtäviä.⁴ Esimerkiksi lysosyyymi katkaisee *N*-asetyyli-glukosamiinin ja *N*-asetyyli-muramiinihapon välisiä glykosididoksia.¹

Peptidoglykaani ja sen biosynteesin vaiheet ovat erinomaisia kohteita pyrittäessä rajoittamaan bakteerien kasvua, sillä useat peptidoglykaanin biosynteesissä vaikuttavista entsyymeistä ovat välttämättömiä ja samoja bakteerilajista riippumatta. Entsyymeillä ei myöskään ole yhdenmukaisuutta nisäkässoluihin. Uusien antibioottien kehittäminen on tärkeää, sillä antibioottiresistenttejä bakteerikantoja kehittyä jatkuvasti.⁵ Hyvin tunnetuista antibiooteista penisilliini vaikuttaa peptidoglykaanin biosynteesin loppuvaiheessa inhiboimalla transpeptidaasientsyymejä, jotka liittävät peptidisilloja toisiinsa.¹

Bakteerit luokitellaan kahteen luokkaan niiden soluseinän rakenteen perusteella. Bakteerilajeilla vaihtelua havaitaan etenkin peptidiristisiltojen aminohappokoostumuksissa, mutta jossain määrin myös polysakkaridirungossa.⁴ Gram-positiivisilla bakteereilla soluseinä

on paksu ja koostuu pääosin peptidoglykaanista. Gram-negatiivisilla bakteereilla peptidoglykaanin määrä on huomattavasti pienempi kuin gram-positiivilla bakteereilla, sillä suurin osa niiden soluseinästä koostuu ulkokalvosta. Ulkokalvo on lipidikaksoiskalvo, joka sisältää polysakkaridien ja lipidien muodostamia komplekseja. Ulkokalvossa on huokosia, mikä tekee siitä suhteellisen läpäisevän pienille molekyyleille.¹ Kuvassa 1 on esitetty kaaviokuvat gram-positiivisen ja gram-negatiivisen bakteerin solukalvoista.



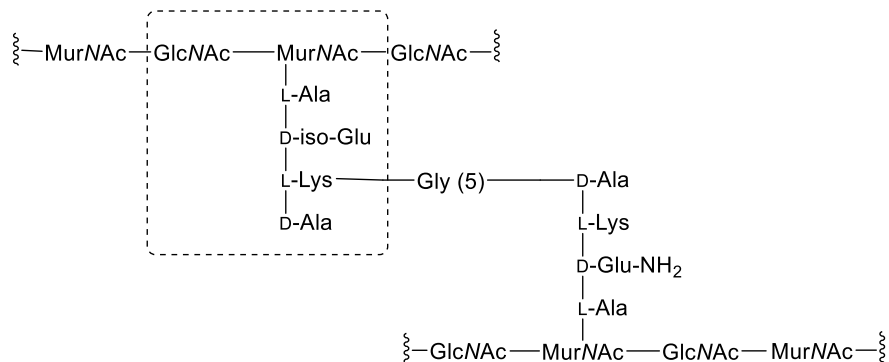
Kuva 1. Gram-positiivisen ja gram-negatiivisen bakteerin soluseinän kaaviokuvat.¹

Gram-värjäys on menetelmä, jolla bakteerit luokitellaan näihin kahteen luokkaan. Siinä bakteerit värjäytyvät soluseinänsä rakenteen perusteella eri tavoin. Gram-värjäyksessä solun sisälle muodostuu liukenematon violetti jodikompleksi. Kompleksi voidaan uuttaa ulos gram-negatiivisesta solusta, mutta ei gram-positiivisesta. Värjäyksessä gram-positiivisen solun soluseinä kuivuu alkoholin vaikutuksesta, mikä aiheuttaa seinän huokosten sulkeutumisen ja näin ollen estää jodikompleksin ulospääsyn. Gram-negatiivisilla bakteereilla alkoholi läpäisee ulkokalvon, jolloin jodikompleksi uuttuu ulos solusta. Alkoholikäsittelyn jälkeen gram-negatiiviset solut ovat värittömiä ja hankalasti havaittavissa, joten ne värjätään vielä toisella värjäysreagenssilla tarkastelun helpottamiseksi.¹

2.1 Peptidoglykaanin rakenne

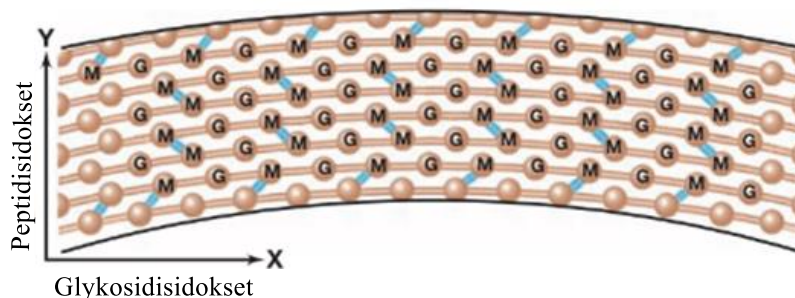
Peptidoglykaani on jäykkä, toistuvarakenteinen molekyyli, joka koostuu polysakkaridirungosta ja peptidiristisilloista. Runko-osassa vuorottelevat sokerijohdannaiset *N*-asetyyli-glukosamiini (GlcNAc) ja *N*-asetyylimuramiinihappo (MurNAc). Rakenteen kantapeptidit yhdistävät polysakkaridiketjut toisiinsa joko suoraan tai lyhyiden peptidiristisiltojen, kuten esimerkiksi

viidestä glysiinistä koostuvan peptidin, välityksellä.² Kuvassa 2 on esitetty peptidoglykaanin perusrakenne. Esimerkkinä kuvassa gram-positiivisen *Staphylococcus aureus*:n peptidoglykaanin rakenne.



Kuva 2. Peptidoglykaanin perusrakenne gram-positiivisella bakteerilla.

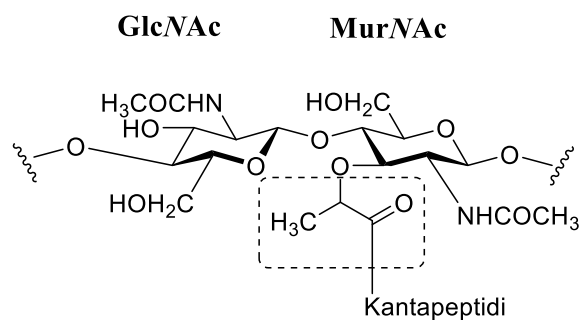
Polysakkaridirungosta ja kantapeptidistä muodostuu peptidoglykaanin toistuva yksikkö, glykaanitetrapeptidi, joka on kuvassa 2 ympyröity katkoviivalla. Sokeriosien välinen kovalenttinen glykosidisidos mahdollistaa rakenteen jäykkyyden yhdessä suunnassa ja kantapeptidit yhdistävien ristisiltojen aminohapot takaavat jäykkyyden myös toiseen suuntaan. Sidosten suunnat on esitetty kuvassa 3. Peptidoglykaanin perusrakenne on samankaltainen kaikilla bakteerilajeilla. Tietynlaista vaihtelua havaitaan kuitenkin niin glykaaniketjuissa, kantapeptidissä kuin lyhyiden peptidirisiltojen paikassa ja koostumuksessakin. Hienorakenteessa vaihtelua voi olla jopa saman lajin sisällä riippuen kasvuolosuhteista.²



Kuva 3. Peptidoglykaanin rakenne on jäykkä, mutta joustava glykosidi- ja peptidisidosten ansiosta.¹

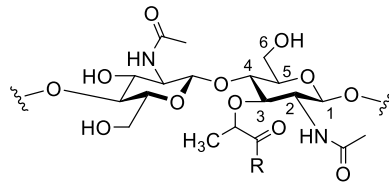
2.1.1 Polysakkaridirungon rakenne ja vaihtelu

Polysakkaridirungon sokeriosat, *N*-asetyyli-glukosamiiniin (*GlcNAc*) ja *N*-asetyyli-muramiinihapon (*MurNAc*), yhdistää toisiinsa kovalenttinen $\beta(1,4)$ -glykosidisisidos. Polysakkaridirungon rakenne pysyy samankaltaisena lajista riippumatta. Sokeriosien kemiallinen rakenne on esitetty kuvassa 4. *N*-asetyyli-muramiinihappo on muunnos *N*-asetyyli-glukosamiinista, jossa kolmannen hiilen OH-ryhmään on liittynyt eetterisidoksella *D*-laktyyliryhmä. Kantapeptidiketjut ovat kovalenttisesti kiinnittyneet *MurNAc*-yksikön *D*-laktyyliryhmän (ympyröity kuvassa 4) karbonyylihiileen. Kantapeptidit yhdistävät peptidiristisillat liittävä glykaaniketjut toisiinsa.²

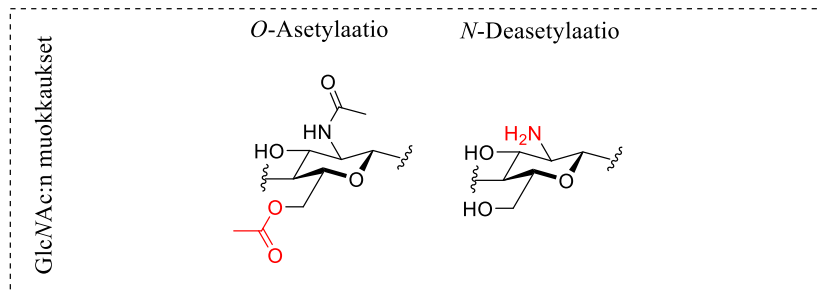
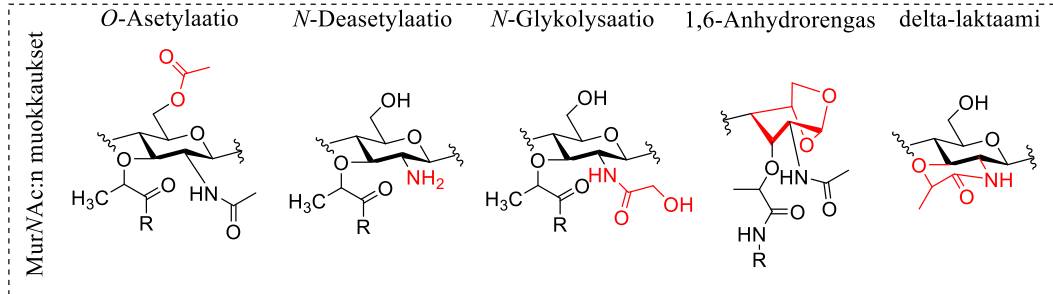


Kuva 4. Peptidoglykaanin sokeriosien rakenne. Vasemmalla *N*-asetyyli-glukosamiini ja oikealla *N*-asetyyli-muramiinihappo.

Peptidoglykaanin sokeriosia muokataan tai liitetään toisiin soluseinän molekyyliin lähes poikkeuksetta pian sen synteesin jälkeen. Yleisiä sokeriosien sekundaarisia muunnoksia ovat *N*-deasetylaatio ja *O*-asetylaatio (kuva 5). Muutokset tapahtuvat yleensä C-6 hiileen tai C-2 hiilen aminoryhmään. Peptidoglykaanin sokeriosien mahdolliset sekundaariset muutokset ja hiilien numerointi on esitetty kuvassa 5. Näitä synteesin jälkeisiä muokkauksia esiintyy sekä gram-positiivisilla että gram-negatiivisilla bakteerilajeilla.⁶ Gram-positiivisilla bakteereilla muutokset ovat pääasiassa liittymistä muihin soluseinän polymeereihin, kuten teikkohappoihin tai muihin polysakkarideihin. Liittymiset tapahtuvat fosfodiesterisidoksella jokaisesta *GlcNAc*- tai *MurNAc*-yksiköistä.²

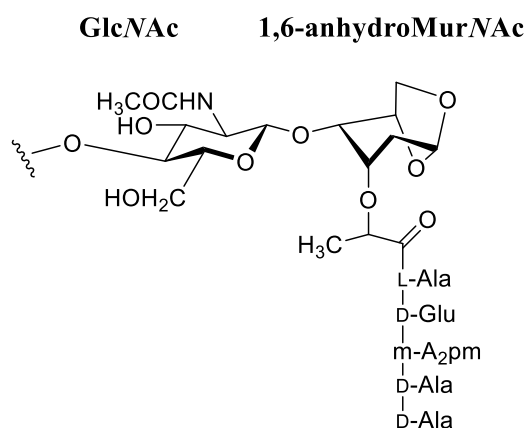


Muokkaamaton



Kuva 5. Peptidoglykaanin sokeriosien sekundaariset muutokset. Muokattu osa on esitetty kuvassa punaisella. Kuvassa R-ryhmä esittää peptidiketjua.

Gram-positiivilla bakteereilla polysakkaridiketjun pelkistävässä päässä voi olla joko MurNAc- tai GlcNAc-yksikkö. Gram-negatiivisilla bakteereilla ja joillakin gram-positiivisilla bakteereilla ei ole pelkistävää päätä. Niissä polysakkaridiketjun päättää 1,6-anhydroMurNAc-yksikkö, joka sisältää molekyylin sisäisen renkaan (kuva 5 ja kuva 6). Molekyylin sisäinen rengas on syntynyt hiilien C-1 ja C-6 välisen eetterisidoksen kautta. Niillä bakteerilajeilla, joiden glykaaniketjua katkaisevien entsyymien aktiivisuus on korkea, peptidoglykaani voi sisältää kaikkia mahdollisia ketjun päättämisyksiköitä.²



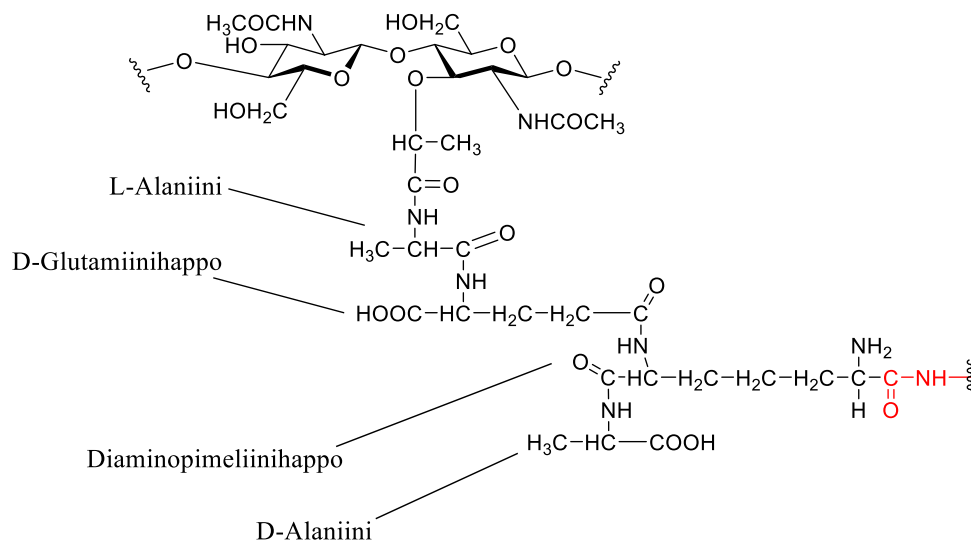
Kuva 6. Polysakkaridiketjun päättävän 1,6-anhydroMurNAc-yksikön rakenne.

Muutokset peptidoglykaanin polysakkaridirungossa vaikuttavat siihen, miten se hydrolysoituu tai laajenee solun kasvaessa. Lisäksi on havaittu, että useasti deasetyloidut tai *O*-asetyloidut glykaaniketjut ovat yleisiä patogeenisilla lajeilla. Muutokset voivat esimerkiksi vaikuttaa isäntäsolun kykyyn tunnistaa patogeeninen bakteeri tai auttaa bakteeria suojautumaan isäntäsolun puolustusmekanismeja, kuten lysosyymejä, vastaan.⁷

Vaihtelua bakteerilajeittain esiintyy myös glykaaniketjujen pituuksissa. On havaittu, että peptidoglykaanikerroksen paksuus ei korreloi glykaaniketjujen pituuden kanssa. Sekä gram-positiivisista, että gram-negatiivisista bakteereista löytyy lajeja, joiden glykaaniketjut ovat lyhyitä tai pitkiä. Keksimääräinen glykaaniketjun pituus on kahdenkymmenen ja neljäkymmenen sokeriyksikön väliltä. Lyhyitä glykaaniketjuja löytyy esimerkiksi gram-positiivisen *S. aureus*:n peptidoglykaanista. *E. coli*:n glykaaniketjujen pituuden on puolestaan havaittu vaihtelevan jonkin verran rasituksen ja kasvuolosuhteiden vaikutuksesta.⁷

2.1.2 Peptidirisiltojen rakenne ja vaihtelu

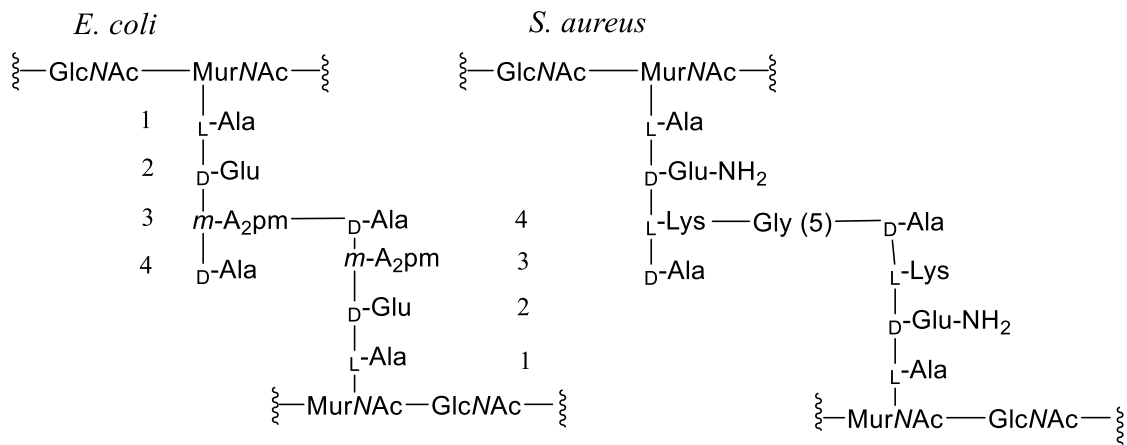
Polysakkaridiketjuja toisiinsa liittävät kantapeptidit koostuvat muutamasta aminohaposta, yleisimmin L-alaniinista, D-alaniinista, D-glutamiinihaposta ja diaminohapoista eli joko L-lysiinistä tai diaminopimeliinihaposta (DAP). Kantapeptidiketju on kiinni polysakkaridirungon *N*-asetyylimuramiinihapon D-laktyyliryhmässä. Kantapeptidiketjuissa on jonkin verran vaihtelua bakteerilajeittain ja sen mukaan, onko kyseessä gram-positiivinen vai gram-negatiivinen bakteeri.¹ Kuvassa 7 on kuvattu gram-negatiivisen bakteerin soluseinän peptidien liittymistä toisiinsa.



Kuva 7. Gram-negatiivisen bakteerin peptidoglykaanin peptidit. Punaisella on merkitty kohta, jossa peptidiketju liittyy toiseen peptidiketjuun.

Kantapeptidin ensimmäinen aminohappo on yleensä L-alaniini. Joissain harvoissa tapauksissa on havaittu L-alaniinin tilalla glysiini tai L-seriini. Toinen ketjuun liittynyt aminohappo on useimmiten D-isoglutamiinihappo. Gram-positiivisilla bakteereilla se voidaan amidoida, jolloin siitä tulee D-isoglutamiini. Kantapeptidissä eniten vaihtelua havaitaan ketjussa kolmantena olevassa diaminohapossa. Diaminopimeliinihappoa esiintyy yleisesti gram-negatiivisten bakteerien, kuten *E. coli:n*, soluseinässä. L-lysiiniä puolestaan löytyy gram-positiivisten bakteerien, kuten *S. aureus:n*, soluseinästä.² Ketjun viimeinen aminohappo, D-alaniini, lisätään synteesivaiheessa dipeptidinä, mutta toinen D-alaniini poistetaan kun peptidiketjut kiinnittyvät toisiinsa.^{2,3}

Peptidoglykaanissa eniten vaihtelua havaitaan peptidirisiltojen määrässä ja koostumuksissa. Yleisesti glykaaniketjun peptidirisilta on kolmannessa asemassa olevan diaminohapon aminoryhmän ja neljännessä asemassa olevan D-alaniinin karboksyyliiryhmän välillä. Kantapeptidit voivat liittyä toisiinsa joko suoraan tai lyhyellä peptidirisillalla. Suoraan liittymistä havaitaan etenkin gram-negatiivisilla bakteereilla, peptidirisilloja havaitaan puolestaan gram-positiivisilla bakteereilla. Gram-positiivisilla bakteereilla L-lysiinin ja pentaglysiinirisillan välisen sidoksen muodostuminen tapahtuu lysiinin sivuketjun ε-NH-ryhmän kautta.² Kuvassa 8 on esitetty, kuinka kantapeptidit liittyvät toisiinsa.



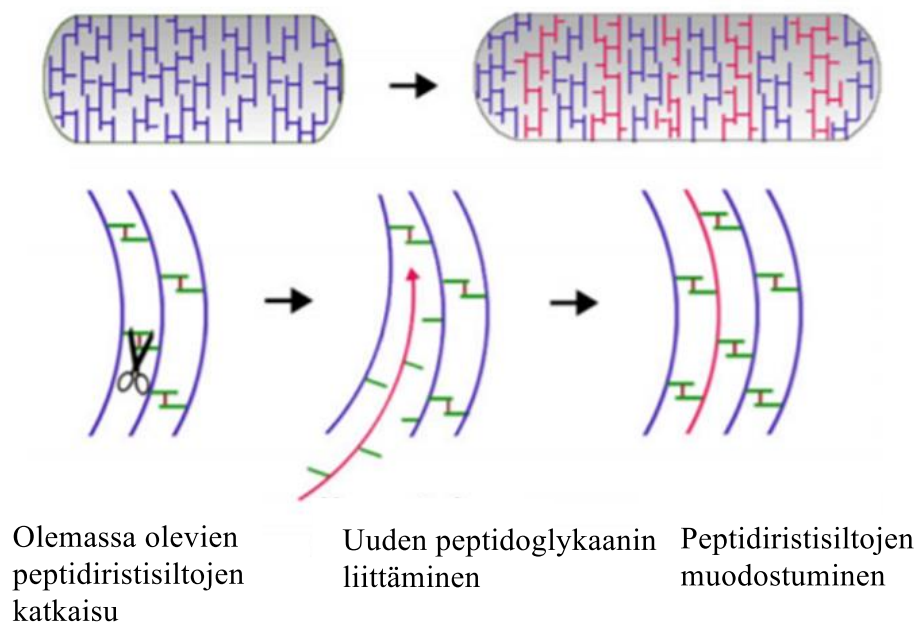
Kuva 8. Kantapeptidiketjujen ristosillat.

Peptidiristosilta voi joissain tapauksissa muodostua myös toisessa asemassa olevan D-glutamiinihapon ja neljännen aseman D-alaniinin välille, mutta tämä on harvinaisempaa. Tällöin kantapeptidien välille tarvitaan siltapeptidi, joka on diaminohappo. Kantapeptidien välisten ristosiltojen pituus vaihtelee yhdestä aminohaposta seitsemään.²

Sen lisäksi, että tapoja, joilla peptidiketjut liittyvät toisiinsa on runsaasti, havaitaan vaihtelua myös kantapeptidien välisten ristosiltojen määrissä. Liittymisen aste vaihtelee *S. aureus*:n jopa 93 %:sta *E. coli*:n noin 20 %:iin. Se tarkoittaa, että *E. coli*:lla suurin osa peptidoglykaanista esiintyy monomeerinä tai dimeerinä. Vastaavasti *S. aureus*:lla monomeerien määrä on pieni ja suurin osa peptidoglykaanista on oligomeerimuodossa.²

2.2 Peptidoglykaanin biosynteesi

Peptidoglykaanin biosynteesi solussa on monimutkainen prosessi, johon osallistuu useita entsyymejä. Biosynteesi tapahtuu kolmessa vaiheessa ja sen reaktioita tapahtuu niin sytoplasmassa kuin solun sisä- ja ulkokalvollakin. Uuden peptidoglykaanin synteesi vaatii olemassa olevien sidosten katkaisemista soluseinässä ja uuden molekyylin samanaikaista liittämistä osaksi soluseinää (kuva 9). Soluseinän sidosten katkaisuun käytetään autolysiinientsyymeitä, jotka hydrolysoivat sokeriosien välisiä sidoksia. Prosessi on tarkoin säädelty. Uudet glykaanitetrapeptidiyksiköt pitää liittää olemassa olevaan peptidoglykaaniin heti autolysiinientsyymien toiminnan jälkeen, jotta peptidoglykaaniin ei muodostu säröjä, jotka johtavat solun hajoamiseen.³



Kuva 9. Peptidoglykaanin kasvu vaatii olemassa olevien ristisiltojen katkaisemista.⁸ (Kopioitu Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America luvalla)

Bakteerin solutukirangan eri osat ohjaavat peptidoglykaanin synteesiä eri vaiheissa solusykliä. Solun jakautumisen jälkeen MreB, aktiininkaltainen ja bakteerin sauvamaista muotoa ylläpitävä proteiini, pidentää soluja lisäten peptidoglykaaniyksiköitä soluseinään useasta kohdasta samanaikaisesti. FtsZ, tubuliininkaltainen proteiini, joka vaikuttaa solujakautumisessa, liikkuu solun keskelle ja alkaa muodostaa tytärsolujen välille väliseinää mahdollistaen solunjakautumisen.³

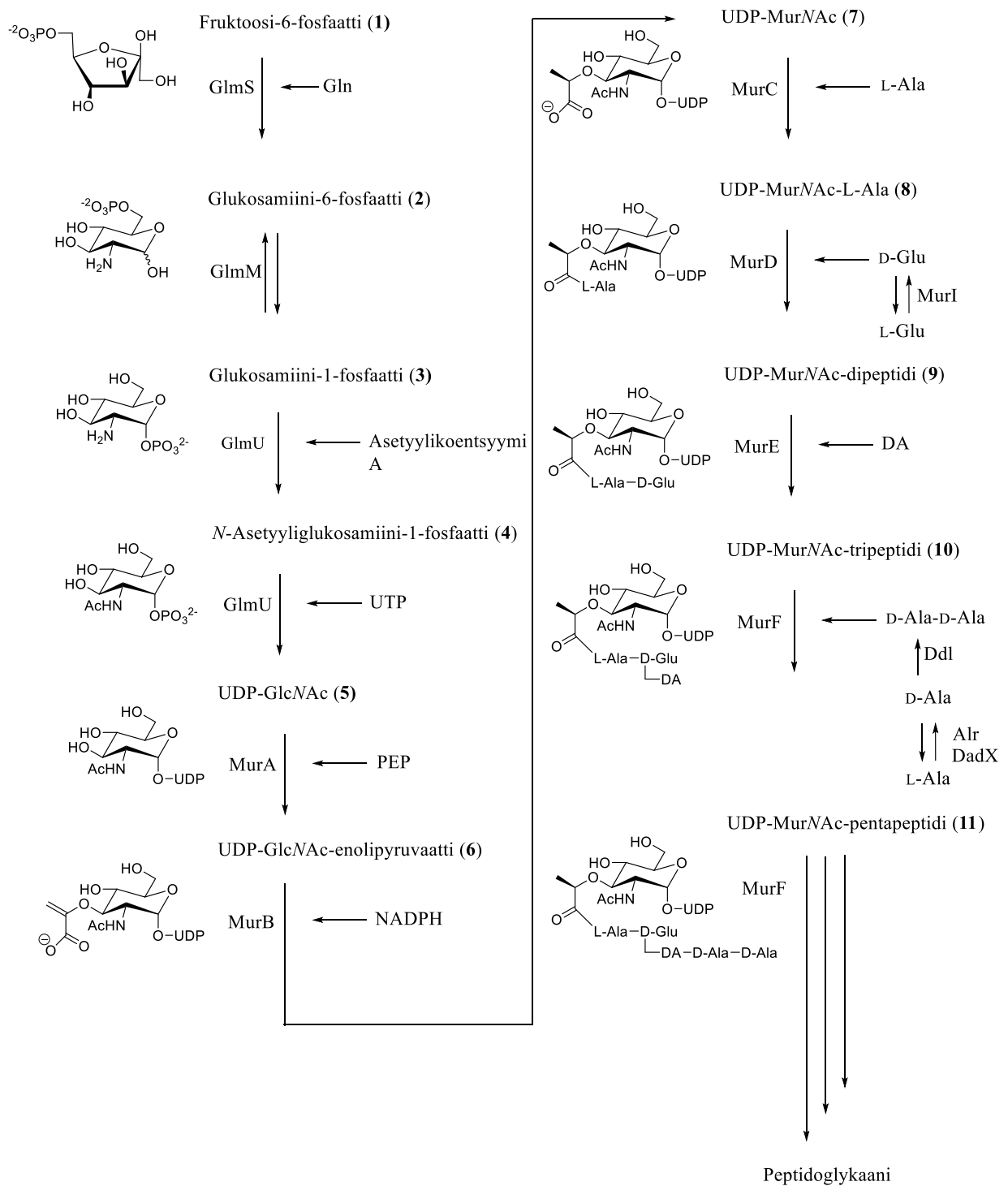
Biosynteesin ensimmäinen vaihe tapahtuu sytoplasmassa. Siellä liukoiset, aktivoidut nukleotidiprekursorit (UDP-*N*-asetyyli-glukosamiini ja UDP-*N*-asetyyli-muramyylipentapeptidi) syntetisoidaan. Toisessa vaiheessa solukalvon sisäkalvolla nukleotidiprekursori yhdistetään undekaprenyylifosfaattiin, jolloin muodostuu lipidiankkuroitu disakkariidipentapeptidimonomeerialayksikkö, joka tunnetaan nimellä lipidi II. Muodostunut molekyyli siirretään solukalvon toiselle puolelle. Kolmannessa vaiheessa lipidi II polymerisoidaan, jolloin undekaprenyylifosfaatti irtoaa ja jäljelle jäävä glykaaniketju liitetään olemassa olevaan soluseinään.³

2.2.1 Sytoplasmassa tapahtuvat reaktiot

Sytoplasmassa tapahtuvat peptidoglykaanin biosynteesin vaiheet voidaan jakaa neljään osaan: UDP-*N*-asetyyli-glukosamiinin (UDP-GlcNac, **5**) synteesi fruktoosi-6-fosfaatista (**1**), UDP-*N*-asetyyli-muramiinihapon (UDP-MurNac, **7**) synteesi UDP-*N*-asetyyli-glukosamiinista, UDP-*N*-asetyyli-muramyylipentapeptidin (**11**) muodostuminen ja lisäreaktiot, joissa syntetisoidaan peptidiketjun osat D-glutamiinihappo sekä dipeptidi D-alanyyli-D-alaniini. Reaktioihin osallistuu useita entsyymeitä, joiden toimintaa on tutkittu melko laajasti.⁹ Kuvassa 9 esitetään kaaviona sytoplasmassa tapahtuvat reaktiot ja niissä vaikuttavat entsyymit.

Ensimmäisessä vaiheessa fruktoosi-6-fosfaatista (**1**) syntetisoidaan UDP-*N*-asetyyli-glukosamiinia (**5**). Reaktio tapahtuu neljässä vaiheessa ja vaatii neljän entsyymin toimintaa. Glukosamiini-6-fosfaatisyntaasi (GlmS) katalysoi D-fruktoosi-6-fosfaatin reaktiota D-glukosamiini-6-fosfaatiksi (**2**), jossa L-glutamiinia käytetään typen lähteenä. Reaktiossa fruktoosi-6-fosfaatin rengasrakenne aukeaa ja aminoryhmä liittyy molekyyliin muodostaen fruktoosi-imiinivälituotteen, jota GlmS stabiloi.

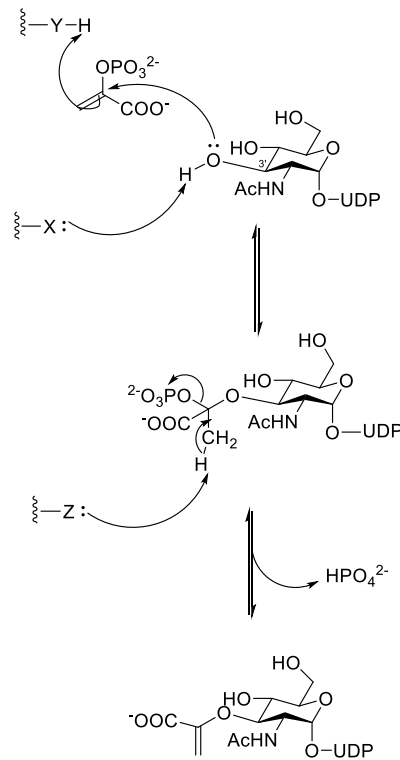
Seuraavaksi fosfoglukosamiinimutaasi (GlmM) katalysoi glukosamiini-6-fosfaatin muuttumista isomeerikseen glukosamiini-1-fosfaatiksi (**3**). Kahta seuraavaa vaihetta, asetyyli- ja uridyyliryhmien siirtoa, katalysoi sama bifunktionaalinen entsyymi GlmU. Ensin tapahtuu asetyyliryhmän siirto, jolloin glukosamiini-1-fosfaatista tulee *N*-asetyyli-glukosamiini-1-fosfaattia (**4**). Sen jälkeen uridiinidifosfaattiryhmä (UDP), jonka lähteenä toimii uridiinitrifosfaatti (UTP), liitetään *N*-asetyyli-glukosamiini-1-fosfaattiin magnesiumin läsnä ollessa, jolloin syntyy asetyyli-glukosamiiniuridyylidifosfaatti (UDP-GlcNac, **5**) ja epäorgaanista pyrofosfaattia. Reaktioketju voi katketa tähän tai jatkua seuraavaan vaiheeseen.⁹



Kuva 9. Sytoplasmassa tapahtuvat peptidoglykaanin biosynteesin vaiheet ja niissä tarvittavat entsyymit. DA on diaminohappo, yleensä L-lysiini tai mesodiaminopimelaatti (meso-A₂pm).

Muramiiniglukosamiiniuridyylidifosfaattia (UDP-MurNAc, 7) syntetisoidaan UDP-GlcNAc:sta kahden erillisen reaktion kautta. Ensimmäisessä reaktiossa MurA-entsyymi katalysoi enolipyrvaattiryhmän, jonka lähteenä toimii fosfoenolipyrvaatti (PEP), liittämistä

UDP-GlcNAc:n 3'-pään hydroksyyliin. Reaktiossa muodostuu sivutuotteena epäorgaanista fosfaattia. Reaktio mekanismi esitetään kuvassa 10. Reaktiossa UDP-GlcNAc:n 3'-pään hydroksyyliin deprotonoituu ja samalla PEP-molekyylin liittyy protoni. Tetraedrisen välivaiheen jälkeen fosfaattiryhmä eliminoituu, jolloin muodostuu enolipyruvaatti (6).⁹



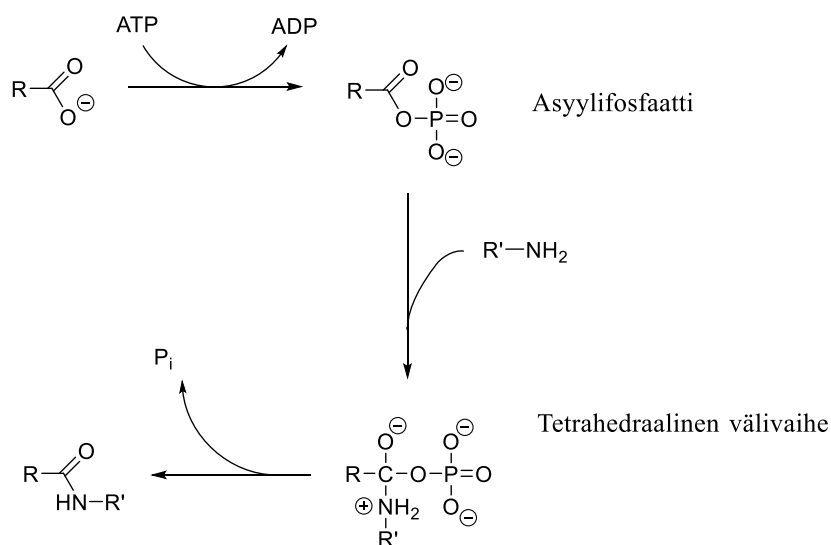
Kuva 10. MurA-entsyymin katalysoima additio-eliminaatioreaktion mekanismi. X, Y ja Z kuvaavat entsyymin sivuketjuja, jotka osallistuvat reaktioon.

Seuraavaksi muodostunut enolipyruvaatti reagoi NADPH:n (nikotiiniamidiadeniini-nukleotididifosfaatti) ja liuottimen luovuttaman protonin kanssa MurB-entsyymin katalysoimana. Reaktio tapahtuu kahtena puolireaktiona. Ensimmäinen puolireaktio on FAD:n (flaviinialaniininukleotidin) pelkistyminen FADH₂:ksi. Pelkistyminen tapahtuu NADPH:n avulla ja alkaa, kun NADPH kiinnittyy MurB-entsyymiin ja protoni siirretään NADPH:lta entsyymiin kiinnittyneeseen FAD:iin. NADP⁺:n vapautuminen johtaa siihen, että UDP-GlcNAc-enolipyruvaatti (6) sitoutuu MurB-entsyymiin. Toisessa puolireaktiossa vinyylinen enolieetteriryhmä pelkistyy FADH₂:n vaikutuksesta ja muodostuu UDP-MurNAc (7), johon on kiinnittynyt D-laktyyliryhmä.⁹

Peptidiketjun kokoamisesta vastaavat entsyymit tunnetaan Mur-ligaaseina (MurC, D, E ja F). Peptidit liitetään UDP-MurNAc:in D-laktyyliryhmään. MurC-entsyymi vastaa L-alaniinin ja

MurD D-glutamiinihapon lisäämisestä. MurE puolestaan vastaa diaminohapon, tyypillisesti mesodiaminopimelaatin (meso-A₂pm) tai L-lysiinin, liittämistä. Dipeptidi D-alanyyli-D-alaniinin liittämistä vastaa MurF. Mur-ligaasit katalysoivat amidi- tai peptidisidosten muodostumista ja samanaikaisesti ATP:n pilkkoutumista ADP:ksi ja fosfaatiksi. Reaktio tarvitsee tapahtuakseen kahdenarvoisen kationin, joka on joko Mg²⁺ tai Mn²⁺.⁹

Mur-ligaasien tyypillisiin ominaisuuksiin kuuluvat samanlainen reaktiomekanismi ja ATP:n sitoutumiskohdan lisäksi esiintyvä kuuden muuttumattoman aminohapon sarja rakenteessa. Lisäksi kristallografisissa tutkimuksissa on havaittu, että kolmen domeenin kolmiulotteinen rakenne on samanlainen. Mur-ligaasien reaktiomekanismi on esitetty kuvassa 11. Ensimmäisessä reaktiossa UPD-prekursorin (R-COO⁻) karboksyyli-ryhmä reagoi ATP:n kanssa muodostaen asyylifosfaattivälivaiheen ja ADP:ta. Aminohapon tai dipeptidin (R'-NH₂) aminoryhmä liittyy nukleofiilisesti asyylifosfaattiin, jolloin muodostuu tetraedrinen välivaihe, joka hajoaa amidiksi tai peptidiksi ja fosfaatiksi.⁹



Kuva 11. Mur-ligaasien reaktiomekanismi.

Sytoplasmassa tapahtuviin peptidoglykaanin synteesin vaiheisiin kuuluu myös muutamia lisäreaktioita, kuten UDP-MurNac:iin liitettävien aminohappojen synteesit. D-glutamiinihappoa voidaan syntetisoida kahdella eri mekanismilla eri entsyymien toimesta. Glutamaattirasemaasi (MurI) muuttaa glutamaatin L-enantiomeerin suoraan D-enantiomeeriksi. Toisessa mekanismissa D-aminohapotransferaasi (D-AAT) katalysoi reaktioita, joissa D-alaniinista ja α -ketoglutaraatista muodostuu D-glutamaattia ja pyruvaattia. D-AAT on aktiivinen useilla gram-positiivisilla bakteereilla.⁹

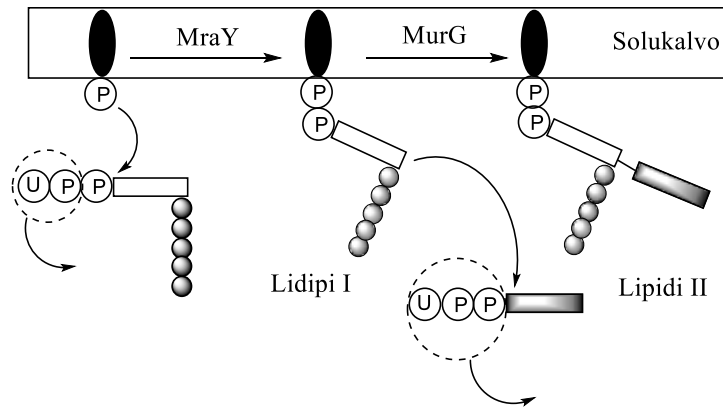
Dipeptidi D-alanyyli-D-alaniinin synteesissä L-alaniini muutetaan alaniinirasemaasi-entsyymin avulla D-alaniiniksi. Alaniinirasemaasia voi bakteerilajista riippuen koodata joko yksi tai kaksi geeniä, *alr* ja *dadX*. Geeneistä *alr* on välttämätön solun kasvun kannalta. *dadX*-Geenin koodaama entsyymi on puolestaan tarpeellinen vain, jos L-alaniinia käytetään solussa hiilen ja energian lähteenä. Kahden D-alaniinin liittymistä toisiinsa katalysoi spesifinen ATP-riippuvainen D-ala-D-ala-ligaasi (Ddl).⁹

L-Lysiiniä voidaan valmistaa solussa kahden eri synteesireitin kautta. Toisen synteesireitin lähtöaineena on asetyylikoentsyymi A ja α -ketoglutaratti.¹⁰ Toisessa reitissä lähtöaineena puolestaan toimii L-aspartaatti. Synteesireitit ovat pitkiä ja sisältävät useita entsyymejä. Toinen peptidoglykaanissa esiintyvä diaminohappo, mesodiaminopimelataatti (meso-A₂pm), on L-aspartaatista lähtevän synteesireitin viimeinen välituote ennen L-lysiiniä.¹¹

2.2.2 Solukalvon sisäkalvolla tapahtuvat reaktiot

Ensimmäistä solukalvoon liittyvää reaktiota katalysoi integraalinen kalvoproteiini, MraY. Sytoplasmassa syntetisoitu UDP-MurNAc-pentapeptidi (**11**) siirretään ja kiinnitetään undekaprenyylifosfaattikantajaan (UP). Tutkimusten perusteella on ehdotettu, että MraY-entsyymin aktiivinen kohta liittyy nukleofiilisellä additioreaktiolla UDP-MurNAc-pentapeptidin fosfaattiryhmään, jolloin entsyymin ja MurNAc-pentapeptidin välille muodostuu kovalenttinen sidos ja samalla vapautuu uridiinimonofosfaattia (UMP). Sen jälkeen undekaprenyylifosfaatin oksianioni liittyy muodostuneeseen välituotteeseen ja lipidi I muodostuu. Vaihtoehtoiseksi reitiksi on ehdotettu lipidi I:n muodostumista yhdessä vaiheessa.⁵

Lipidi I -välituotteen määrä solussa on suhteellisen matala. Tämä johtuu MraY- ja MurG-entsyymien vuorovaikutuksista. MurG on entsyymi, joka katalysoi lipidi I:n muuttumista lipidi II:ksi. Se kiinnittää UDP-aktivoitun N-asetyyli-glukosamiinin (UDP-GlcNAc, **5**) MurNAc-pentapeptidiin.⁵ Kuvassa 12 on havainnollistettu solukalvon sisäkalvolla tapahtuvat reaktiot.



Kuva 12. Solukalvon sisäkalvolla tapahtuvat reaktiot. Katkoviivat kuvaavat irtoavia uridiinifosfattyryhmiä.

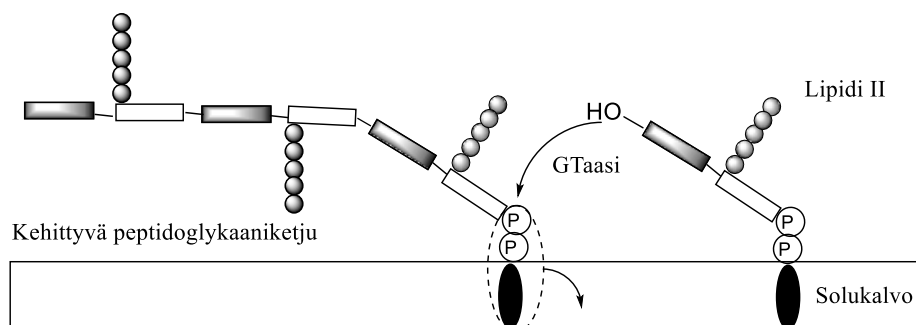
Kun lipidi II on valmis, se siirretään toiselle puolelle solukalvoa. Kääntymisen jälkeen lipidi II on edelleen kiinnittynään undekaprenyylifosfattiin.⁵ On havaittu, että kääntymisen ei ole spontaani prosessi vaan tapahtuu proteiinivälitteisesti.¹² Kääntymisen tarkkaa mekanismia tai osallistuvia proteiineja ei täysin tunneta. Vahvimmat ehdokkaat lipidi II:n kääntäjiksi ovat MurJ ja FtsW/RodA. MurJ on polytooppinen kalvoproteiini ja sen on havaittu olevan välttämätön *E. coli*:lle. FtsW ja RodA ovat myös polytooppisia kalvoproteiineja. FtsW toimii solun jakautuessa peptidoglykaanin synteesissä, kun taas RodA liittyy solun pidentymiseen ja sauvamuodon ylläpitämiseen.⁵ Uusimmat *in vivo* -tutkimukset ovat osoittaneet MurJ:n todennäköisimmäksi lipidi II:n kääntäjäproteiiniksi ainakin *E. coli*:lla.¹³

2.2.3 Periplasmassa tapahtuvat reaktiot

Periplasmassa kehittyvä glykaaniketju polymerisoituu ja samanaikaisesti muodostuu glykaaniketjuja yhdistäviä ristsiltoja. Sekä glykaaniketjun polymerisaatiosta, että ristsiltojen muodostumisesta vastaavat transpeptidaasientsyymit tunnetaan nimellä penisilliiniä sitovat proteiinit, PBPs (penicillin-binding proteins). Ne voidaan jakaa kolmeen ryhmään, joista ensimmäiseen kuuluvat bifunktionaaliset entsyymit. Niillä on sekä glykosyylitransferaasi- että transpeptidaasiaktiivisuutta. Kahteen muuhun ryhmään kuuluvat pelkästään glykosyylitransferaasi- (GTAasi) tai transpeptidaasi (TPaasi) -aktiiviset proteiinit.⁵

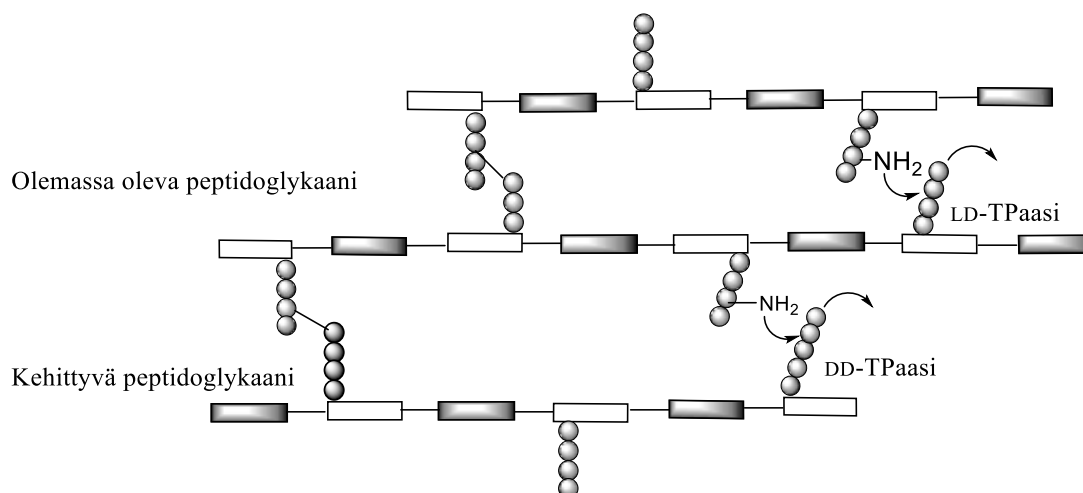
Periplasmassa glykosyylitransferaasientsyymi (GTAasi) katalysoi polymerisaatioreaktiota, jossa lipidi II -prekursori liitetään kehittyvään peptidoglykaaniketjuun. Reaktiossa uusi $\beta(1,4)$ -

glykosididisidos muodostuu asetyyliglukosamiinin (GlcNAc) ja asetyylimuramiinihapon (MurNAc) välille. Samanaikaisesti kehittyvästä peptidoglykaaniketjusta irtoaa edelleen solukalvossa kiinni oleva undekaprenyylifosfaatti.⁵ Reaktio esitetään kuvassa 13. Reaktio tapahtuu lipidi II:n asetyyliglukosamiinin hydroksyyliiryhmästä kehittyvän peptidoglykaanin pelkistävässä päässä.¹⁴



Kuva 13. Lipidi II -prekursorin liittyminen osaksi kehittyvää peptidoglykaaniketjua.

Peptidoglykaaniketjun pidentyessä se liittyy samanaikaisesti viereiseen peptidoglykaaniketjuun peptidiristisiltöjen välityksellä. Kyseessä on nukleofiilinen additioreaktio, jossa yhden peptidiketjun vapaa aminoryhmä ja toisen ketjun terminaalinen peptidisidos reagoivat. Reaktiossa terminaalinen D-alaniini irtoaa ja kahden glykaaniketjun välille muodostuu ristisiltana toimiva peptidisidos. Reaktiota katalysoi DD-transpeptidaasi (DD-TPaasi).³ Entsyymien toiminta kuvataan kuvassa 14. Lisäksi kuvassa esitetään, kuinka transpeptidaasientsyymi (LD-TPaasi) muodostaa ristisillan kolmannessa asemassa olevasta aminohaposta toisen ketjun kolmannessa asemassa olevaan aminohappoon.

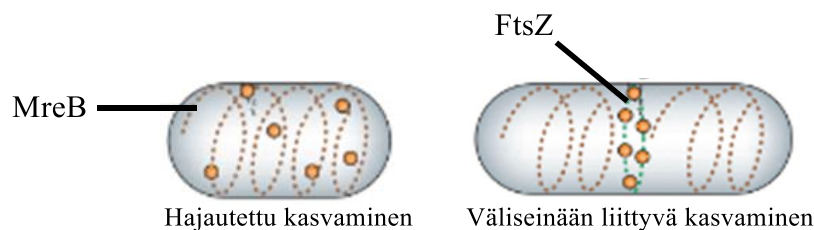


Kuva 14. Transpeptidaasientsyymien toiminta.

2.2.4 Peptidoglykaanin biosynteesin säätely

Peptidoglykaanin biosynteesin säätely ja solun tukirangan toiminta liittyvät läheisesti toisiinsa. Bakteerissa peptidoglykaania valmistetaan etenkin solun jakautumisen ja kasvun aikana, mutta sitä tarvitaan myös esimerkiksi vaurioiden korjaamiseen. Solusyklin eri vaiheissa bakteerin solutukirangan eri osat ohjaavat peptidoglykaanin synteesiä. Solun tukirangan osat säätelevät peptidoglykaanisynteesin proteiinikompleksien aktiivisuutta ja ohjaavat ne oikeaan kohtaan. Tubuliininkaltainen FtsZ, joka paikantuu solun keskelle ja muodostaa väliseinän tytärsolujen välille, on tärkeä proteiini solun jakautumisessa.³

Solun jakautumisen jälkeen MreB, aktiininkaltainen ja bakteerin sauvamaista muotoa ylläpitävä proteiini, kasvattaa solua lisäten peptidoglykaaniyksiköitä soluseinään useasta kohdasta samanaikaisesti. MreB vuorovaikuttaa useiden proteiinien, kuten lipidi II -synteesistä vastaavien entsyymien, kanssa ja säätelee solun kasvua.³ MreB-filamentit liikkuvat solun reunoja pitkin vertikaalisesti pitkän sivun suuntaisesti.¹⁵ Kuvassa 15 on kuvattu MreB- ja FtsZ-proteiinien toiminta.



Kuva 15. MreB- ja FtsZ-proteiinien toiminta.³ (Kopioitu Nature Reviews Microbiology luvalla)

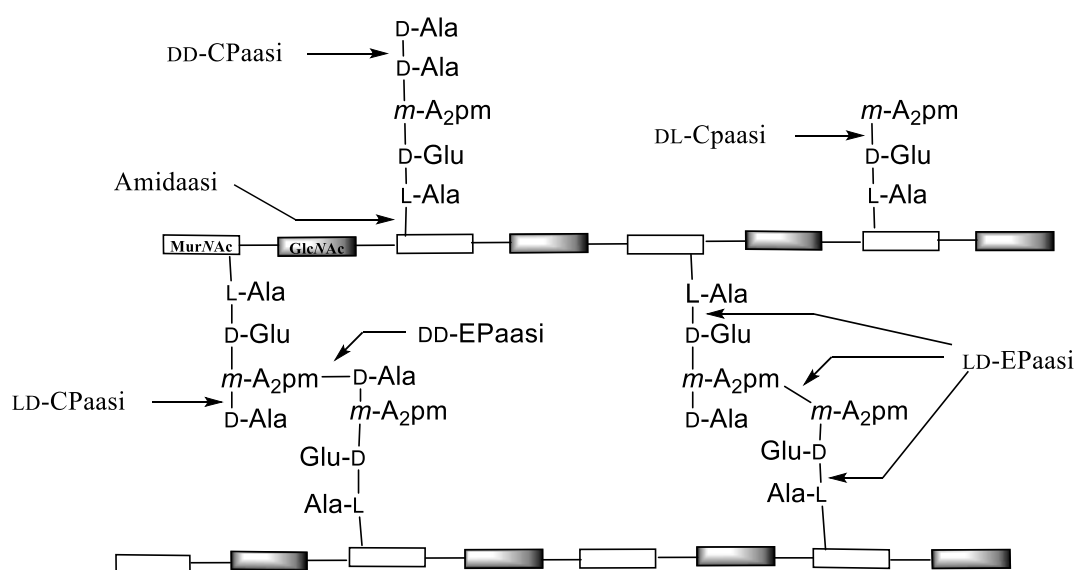
2.3 Peptidoglykaanin hajottaminen solussa

Soluseinän rakennusvaiheessa entsyymit voivat lyhentää peptidiketjuja ja katkaista olemassa olevia ristisilloja. Autolyttisessä hajottamisessa solu aktivoi itse hajotukseen tarvittavia entsyymejä, joita ovat esimerkiksi erilaiset hydrolaasientsyymit.⁴

Bakteerit tarvitsevat hydrolysoivia entsyymejä esimerkiksi uuden peptidoglykaanimolekyylin liittämiseen jo olemassa olevaan peptidoglykaaniin. Lisäksi hydrolaasientsyymeitä tarvitaan muun muassa solunjakautumisessa, itiön muodostamisessa ja apoptoosissa eli ohjatussa solukuolemassa.⁴ Antibiootit voivat hajottaa peptidoglykaania sekä sen ristisilloja. Ne ovat antimikrobisia yhdisteitä, joita käytetään erityisesti lääketieteellisiin tarkoituksiin.¹

2.3.1 Autolysiinit

Autolyttisesta hajottamisesta vastaavat erilaiset hydrolaasientsyymit. Osalla hydrolaasientsyymeistä voi olla useampia tehtäviä. Jokaiselle glykosidi- ja amidisidokselle on oma hydrolaasientsyyminsä, mutta niitä kaikkia ei esiinny jokaisella bakteerilajilla. *N*-asetyylimuramyyl-L-alaniiniamidaasit hydrolysoivat glykaanirungon ja peptidiketjun välisiä sidoksia. Karboksi- ja endopeptidaasit katkaisevat peptidiketjun aminohappojen välisiä DD-, DL- ja LD-peptidisidoksia. Näiden lisäksi on olemassa kolme entsyymityyppiä, joka katkoo glykaanirungon sokerien välisiä glykosididoksia.⁴ Kuvaan 16 on koottu hydrolaasientsyymien katkaisukohtia.

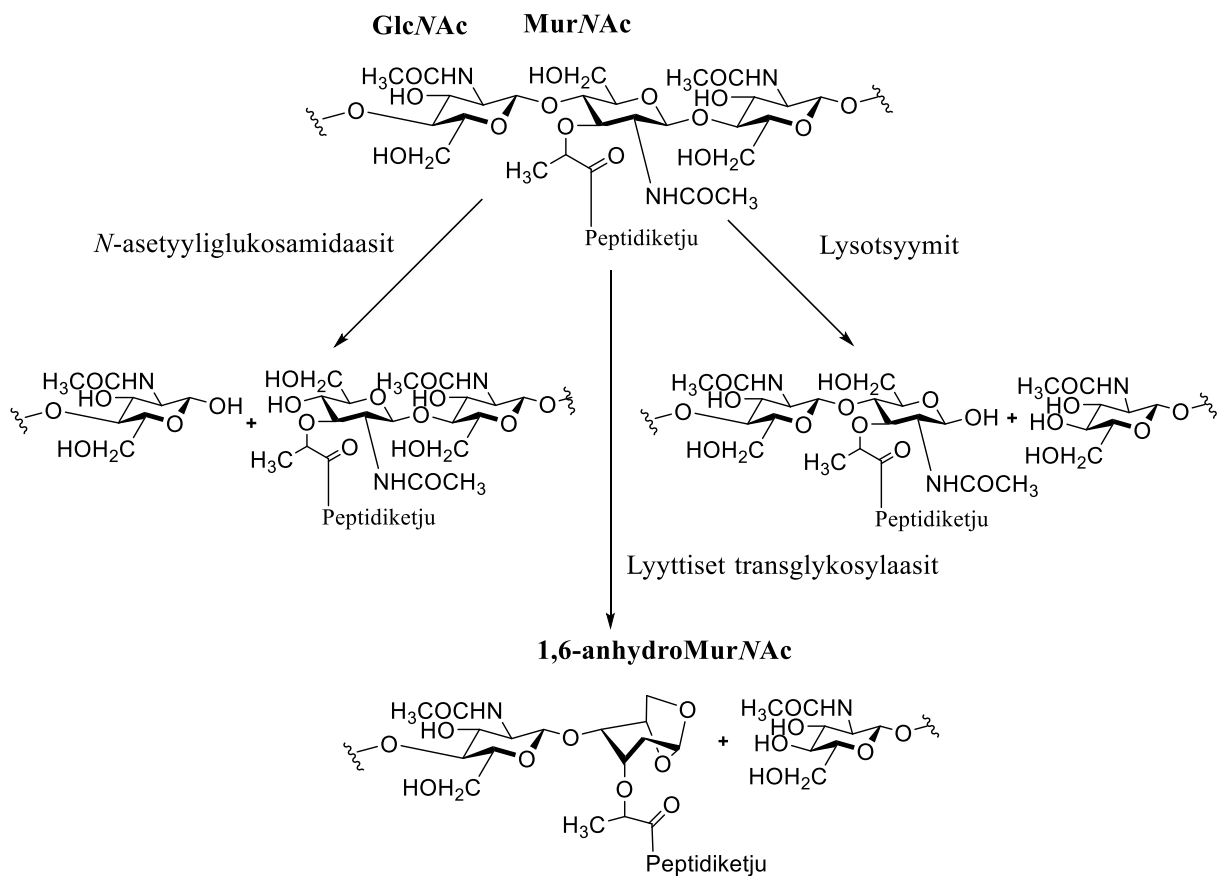


Kuva 16. Peptidoglykaanin hydrolyysikohtat.

N-asetyylimuramyyl-L-alaniiniamidaasit (kuvassa amidaasi) katkaisevat amidisidoksen, joka liittyy peptidiketjun L-alaniinista glykaanirungon *N*-asetyylimuramyyliin. Useimmiten nämä amidaasit esiintyvät osana bakteerin autolyttistä systeemiä ja kantavat signaalipeptidiä *N*-päässään. Tämä mahdollistaa niiden siirtymisen solukalvon läpi. Karboksipeptidaasit (kuvassa CPaasit) katkaisevat peptidiketjujen aminohappojen välisiä peptidisidoksia. Endopeptidaasit (kuvassa EPaasit) katkaisevat peptidisidoksia niin ristisilloista kuin peptidiketjuistakin. DD-peptidaasit katkoo sidoksia kahden D-alaniinin välillä. DL- tai LD-peptidaasit katkoo sidoksia L- ja D-aminohappojen väliltä.⁴

N-asetyyl- β -D-muramidaasit ovat entsyymejä, jotka katkaisevat $\beta(1,4)$ -glykosididoksia MurNAC- ja GlcNAc-yksiköiden väliltä. Sidos voidaan hydrolysoida kahdella tavalla.

Lysotsyymin katalysoidessa sidoksen hydrolyysiä muodostuu terminaaliseen päähän pelkistävä MurNAc-yksikkö. Lyyttisten transglykolaasien hydrolysoidessa sidoksen tapahtuu intermolekulaarinen transglykosylaatioreaktio, jossa muodostuu 1,6-anhydrorengas MurNAc-yksikköön. Endo-*N*-asetyyli- β -D-glukosamidaasi puolestaan katkaisee sidoksia *N*-asetyyli- β -D-glukosamiiniyksiköiden ja viereisen monosakkaridin välillä. Sen toiminta ei ole rajoittunut vain peptidoglykaaniin vaan sen substraatteihin kuuluvat myös kitiini ja *N*-glykaanit.⁴ Kuvassa 17 on kuvattu näiden entsyymien toiminta.



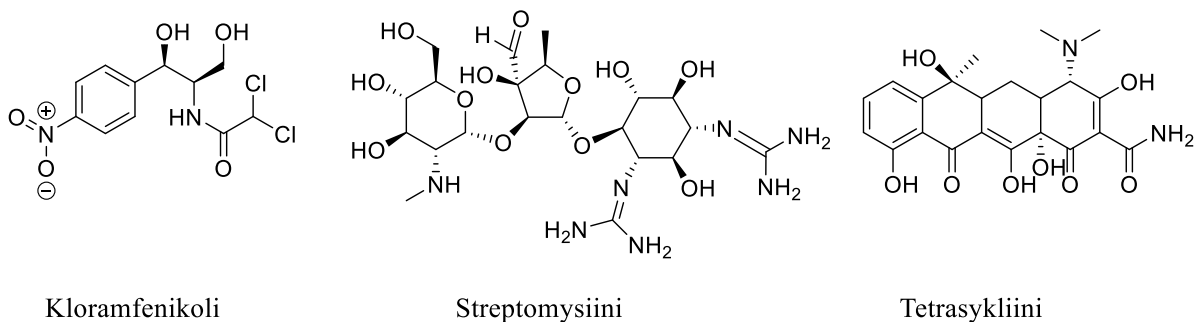
Kuva 17. Glykosidididosten hydrolyysit peptidoglykaanissa.

2.3.2 Antibiootit

Antibiootit ovat mikro-organismien, esimerkiksi sienien ja bakteerien, tuottamia mikrobeja tuhoavia aineita. Antibiootit voivat vaikuttaa, joko bakteriostaattisesti eli bakteerien kasvua hidastamalla tai bakteriosidisesti eli bakteereja tappavasti. Luonnollisia antibiootteja voidaan muokata. Tällöin puhutaan puolisynteettisistä antibiooteista. Täysin synteettisiä antibiootteja lääketieteellisessä käytössä on vain muutamia.¹⁶ Mikrobin herkkyys antibiootteja kohtaan vaihtelee huomattavasti. Esimerkiksi samat antibiootit eivät tehoa sekä gram-positiivisiin että

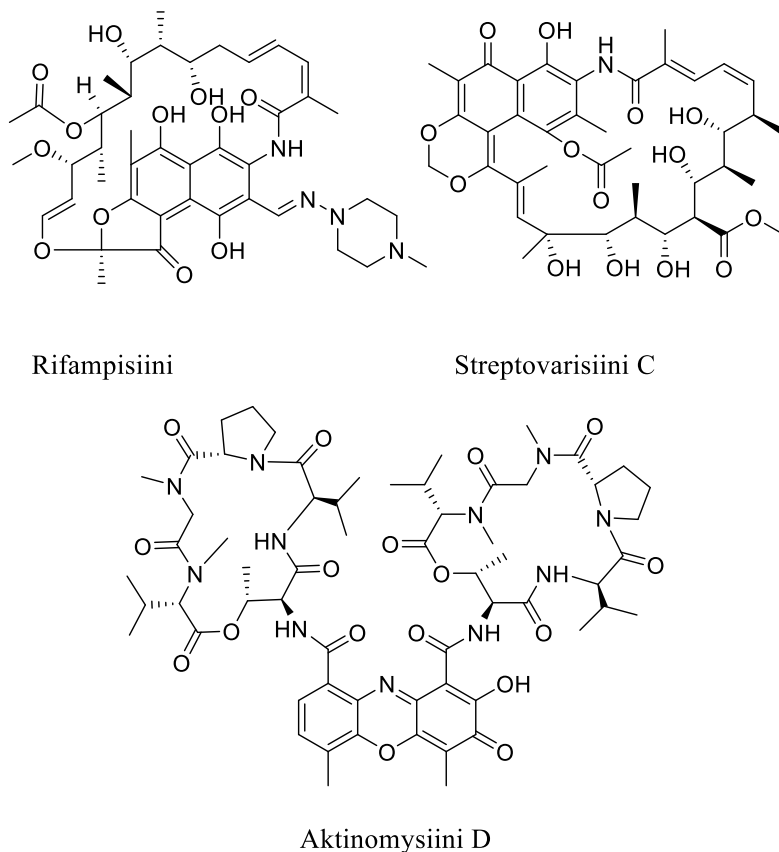
gram-negatiivisiin bakteereihin. Laajakirjoisista antibiooteista puhuttaessa tarkoitetaan sellaisia antibiootteja, jotka tehoavat useimpiin bakteerilajeihin.¹

Antibiooteilla on useita eri vaikutustapoja. Osa inhiboi proteiinisynteesiä häiritsemällä translaatiota sitoutumalla ribosomeihin. Tällaisia antibiootteja ovat esimerkiksi kloramfenikoli, streptomysiini ja tetrasykliini (kuva 18). Näiden antibioottien kohteena ovat vain bakteerien ribosomit, eikä niillä ole vaikutusta eukaryoottien sytoplasman ribosomeihin. Toisaalta mitokondrioiden ja kloroplastien ribosomien evolutiivinen alkuperä on bakteereissa, joten proteiinisynteesiä inhiboivat antibiootit saattavat vaikuttaa myös näiden ribosomien toimintaan. Tällaisten antibioottien lääketieteellinen käyttö on kuitenkin mahdollista, sillä antibiootit vaikuttavat esimerkiksi mitokondriaalisiin ribosomeihin vasta lääkehoidossa käytettäviä pitoisuuksia huomattavasti korkeammilla pitoisuuksilla.¹



Kuva 18. Esimerkkejä translaatiota inhiboivista antibiooteista.

Osa antibiooteista vaikuttaa transkriptioon inhiboimalla RNA-synteesiä. Tällaisia antibiootteja ovat esimerkiksi rifampisiini ja streptovarikiini, jotka sitoutuvat bakteerien, mitokondrioiden ja kloroplastien RNA-polymeraasin β -alaysikköön. Aktinomysiini on antibiootti, joka inhiboi RNA-synteesiä liittymällä DNA:han ja estämällä RNA:n pidentymistä.¹ Näiden antibioottien rakenteet on esitetty kuvassa 19.



Kuva 19. Esimerkkejä translaatiota inhiboivista antibiooteista.

2.3.2.1 Peptidoglykaanin biosynteesiä estävät antibiootit

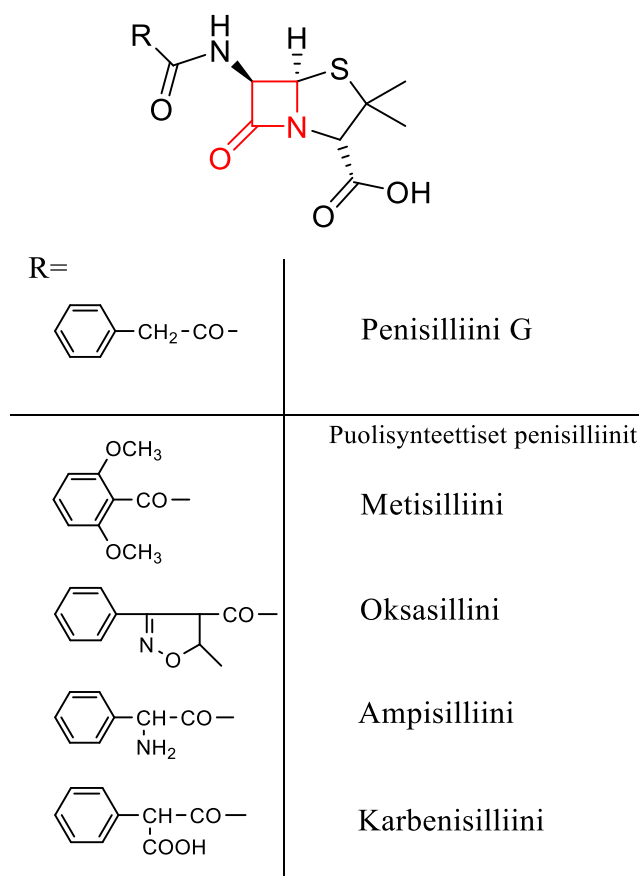
Entsyymit, jotka osallistuvat bakteerin soluseinän peptidoglykaanin biosynteesiin ovat välttämättömiä bakteereille, eikä niitä yleensä esiinny nisäkässoluissa. Sen vuoksi ne ovat hyviä kohteita antibiooteille. Peptidoglykaanin synteesiin vaikuttavia antibiootteja ovat esimerkiksi β -laktaamit, kuten penisilliini, sekä fosfomysiini ja vankomysiini.¹

β -Laktaamit ovat peptidoglykaanin biosynteesiä inhiboivia antibiootteja. Niiden rakenteessa on β -laktaamirengas (punaisella kuvassa 20) sekä viisiatominen tiatsolidiinirengas.¹ β -Laktaamien rakenne muistuttaa D-alanyyli-D-alaniinidipeptidiä. Siksi transpeptidaasientsyymin aktiivisen kohdan seriini pystyy sitoutumaan β -laktaamirenkaaseen, muodostaen kestävän palautumattoman kovalenttisen asyylientsyymikompleksin. Tämän vuoksi sidosten muodostuminen peptidoglykaaniketjujen välille estyy. Penisilliinit vaikuttavat bakteerisoluihin ja niiden transpeptidaasientsyymien toimintaan solunjakautumisvaiheessa.⁵

Ensimmäinen tunnettu antibiootti on penisilliini G, joka on β -laktaami. Se pystyy estämään vain gram-positiivisten bakteerien transpeptidaatiota. Sitä muuntelemalla saadaan aikaan

puolisyntheettisiä penisilliinejä, jotka toimivat myös gram-negatiivisia bakteereja vastaan. Puolisyntheettisiä penisilliinejä kehitettäessä on pyritty parantamaan niiden haponkestävyyttä, jota tarvitaan suolistosta imeytymiseen, sekä muun muassa pidentämään niiden vaikutusaikaa ja lisäämään niiden β -laktamaasikestävyyttä ja tehoa gram-negatiivisia bakteereja vastaan. Yhdellekään puolisyntheettiselle penisilliinille ei ole pystytty lisäämään kaikkia haluttuja ominaisuuksia.¹⁶

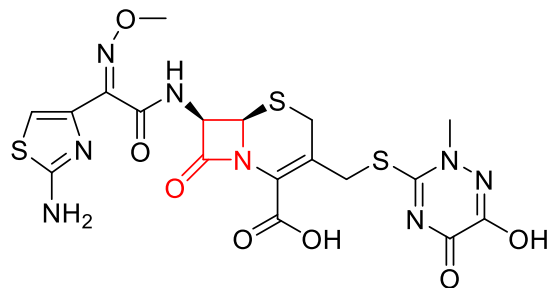
Puolisyntheettiset penisilliinit pääsevät kulkeutumaan gram-negatiivisen bakteerin ulkokalvon sisäpuolelle, jossa ne voivat vaikuttaa bakteerin soluseinään. Penisilliini G on herkkä β -laktamaasille, joka on penisilliiniresistenttien bakteerien tuottama penisilliiniä hajottava entsyymi. Puolisyntheettisistä penisilliineistä metisilliini ja oksasilliini ovat β -laktamaasille resistenttejä.¹ Penisilliini G:n ja joidenkin yleisesti lääkekäytössä olevien puolisyntheettisten penisilliinien rakennekaavat on esitetty kuvassa 20.



Kuva 20. β -Laktaamien rakenne. R-ryhmän muuntelulla voidaan saavuttaa erilaisia ominaisuuksia. β -Laktaamirengas on esitetty kuvassa punaisella.

Kefalosporiinit ovat *Cephalosporium sp.* -sienen tuottamia antibiootteja. Niiden rakenteessa on β -laktaamirengas, mutta tiatsolidiinirengaan sijasta kuusiatominen dihydrotiatsiinirengas.

Kefalosporiinien toimintamekanismi on samanlainen kuin β -laktaameilla eli ne kiinnittyvät palautumattomasti transpeptidaasientsyymeihin ja estävät ristisidosten muodostumista. Kefalosporiinit ovat vastustuskykyisempiä β -laktamaaseille kuin β -laktaamit. Lisäksi ne ovat laajakirjoisempia. Lääketieteellisessä käytössä olevat kefalosporiinit ovat puolisynteettisiä. Kuvassa 21 on esitetty yhden kefalosporiinin, keftriaksonin, rakenne.¹

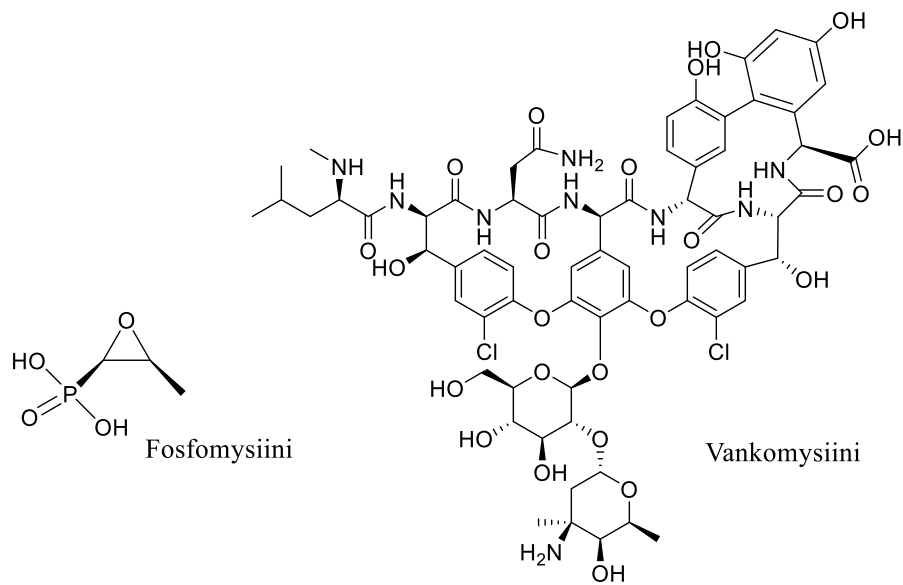


Keftriaksoni

Kuva 21. Keftriaksonin rakennekaava. β -Laktaamirengas kuvassa punaisella.

Fosfomysiini (kuva 22) on luontaisesti esiintyvä antibiootti, jota tuottavat fosfoenolipyruvaatista esimerkiksi useat *Pseudomonas* ja *Streptomyces* -lajit. Fosfomysiini inaktivoi MurA-entsyymien toimintaa jäljittelemällä fosfoenolipyruvaattimolekyylin (PEP) rakennetta ja muokkaamalla aktiivista kohtaa sitoutumalla siihen kovalenttisesti. MurA on entsyymi, joka peptidoglykaanin biosynteesissä katalysoi fosfoenolipyruvaatista (PEP) muodostuvan enolipyruvaattiryhmän liittämistä UDP-GlcNAc:n 3'-päähän hydroksyyliiryhmään. UDP-GlcNAc on myös osa sienien kitiinisoluseinää, joten MurA-entsyymien inaktivointi on niin sieni- kuin bakteerilääkkeidenkin mahdollinen vaikutuskohta.⁵

Vankomysiini (kuva 22) on antibiootti, joka vaikuttaa peptidoglykaanin biosynteesin loppuvaiheessa. Se estää ristisidosten muodostumisen peptidoglykaaniyksiköiden välille. Se kiinnittyy UDP-MurNAc:n peptidiketjun D-alanyyli-D-alaniiniosaan estäen ristisidosten tekevän transpeptidaasientsyymien toiminnan. Vankomysiiniresistenteillä bakteereilla on peptidiketjun päässä D-Ala-D-Ala-yksikön sijasta esimerkiksi D-alanyyli-D-laktaatti- tai D-alanyyli-D-seriini-yksiköt, jolloin ristisidosten syntyminen on mahdollista vankomysiinin läsnä olosta huolimatta.⁵



Kuva 22. Fosfomysiinin ja vankomysiinin rakennekaavat.

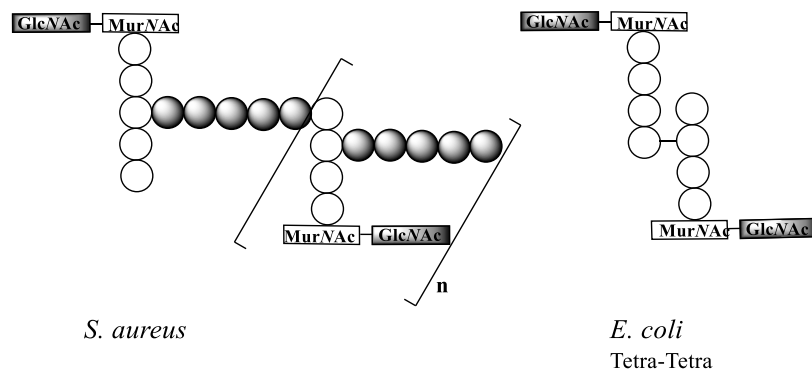
3 PEPTIDOGLYKKAANIN TUTKIMINEN

Peptidoglykaanin rakenteen tutkimista varten solu usein hajotetaan ja soluseinä pilkotaan valituilla entsyymeillä, jotka hydrolysoivat tiettyjä peptidoglykaanin sidoksia. Hajottaminen on useimpien analyysimenetelmien, esimerkiksi nestekromatografian (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography), kannalta pakollista, sillä peptidoglykaani ei ole makromolekyylinä liukoinen. Nestekromatografian lisäksi peptidoglykaanin rakennetta voidaan tutkia muun muassa massaspektrometrian ja NMR-spektroskopian (Nuclear Magnetic Resonance) avulla. Kokonaista peptidoglykaania on mahdollista tutkia esimerkiksi atomivoimamikroskoopilla (AFM, Atom Force Microscope) tai läpäisyelektronimikroskoopilla (TEM, Transmission Electron Microscope).

Peptidoglykaanitutkimuksia varten bakteerisoluja voidaan kasvattaa leimattuja hiilen ja typen lähteitä sisältävillä kasvualustoilla. Tällaisia ovat esimerkiksi ^{13}C -glukoosi ja ^{15}N -ammoniumkloridi. Leimattuja hiilen ja typen lähteitä käytetään etenkin NMR-tutkimuksia varten kasvatettujen solujen tapauksessa, mutta leimattuja aminohappoja voidaan käyttää myös HPLC-analyysissä.¹⁷

Entsyymien avulla pilkottuja peptidoglykaanifragmentteja kutsutaan muropeptideiksi. Niissä glykaaniketju on hajonnut disakkarideiksi, mutta kantapeptidi ja mahdollisesti osa ristisidoksista on vielä jäljellä. Muropeptidejä nimetään sen mukaan, kuinka pitkä kantapeptidiketju on jäljellä, eli esimerkiksi tri-, tetra- tai pentapeptidit.¹⁸

Myös multimeeristen muropeptidien muodostuminen on mahdollista. Tällöin kahden tai useamman disakkaridiyksikköjen ja niiden kantapeptidien välillä on jäljellä ristisilta. Esimerkiksi *S. aureus*:n peptidoglykaani voi hajota multimeeriseksi muropeptidiksi, jossa on kaksi disakkariyksikköä ja niiden kantapeptidit, sekä kaksi pentaglysiinistä koostuvaa ristisiltaa. *E. coli*:n multimeerinen muropeptidi voi puolestaan sisältää kaksi disakkaridiyksikköä, esimerkiksi tetra-tetra, joissa molemmissa on tertapeptidiketju ja ristisilta kolmannessa asemassa olevan diaminohapon aminoryhmän ja neljännessä asemassa olevan D-alaniinin karboksyyliiryhmän välillä.¹⁸ Kuvassa 23 esitetään sekä *S. aureus*:lla, että *E. coli*:lla yleisesti esiintyvät multimeeriset muropeptidit.



Kuva 23. *S. aureus*:lla ja *E. coli*:lla esiintyvät multimeeriset muropeptidit.

3.1 Peptidoglykaanin hajottaminen

Peptidoglykaani hajoaa muropeptideiksi erilaisten peptidoglykaanin sidoksia pilkkovien entsyymien avulla. Rakenneanalyysiä varten peptidoglykaanista tulee irrottaa muita siihen liittyneitä molekyyliä, kuten proteiineja tai sokereita. Hajotukseen käytettävät entsyymit valitaan sen mukaan, mitä peptidoglykaanista halutaan tutkia.

Proteaasit ovat entsyymejä, jotka pilkkovat proteiineja hydrolysoimalla aminohappojen välisiä peptidisisoksia.¹⁹ Pronaasi on sekoitus useita epäspesifejä endo- ja eksoproteaaseja, jotka pilkkovat proteiineja yksittäisiksi aminohapoiksi. Sitä käytetään etenkin DNA:n ja RNA:n erityksessä.²⁰ Peptidoglykaanin käsittelyssä pronasaa käytetään hajottamaan proteiinit, jotka ovat kiinnittyneinä peptidoglykaaniin.¹⁷ Toinen proteiinien pilkkomiseen käytetty entsyymi on trypsiini. Se toimii etenkin peptidiketjun lysiini- tai arginiiniaminohappojen karboksyyli-päästä.¹⁹

Mutanolysiiniksi kutsuttua entsyymiseosta käytetään peptidoglykaanin käsittelyssä hajottamaan se liukeneviksi fragmenteiksi.¹⁷ Mutanolysiini sisältää kolmea gram-positiivisen bakteerin, *Streptomyces globisporus*:n tuottamaa bakteriolyttistä entsyymiä, kahta erilaista *N*-asetyylimuramidaasia sekä proteolyttistä *N*-asetyylimuramyyl-L-alaniiniamidaasia.²¹

Lysotsyymit hydrolysoivat *N*-asetyylimuramiinihapon ja *N*-asetyyliglukosamiinin välisiä $\beta(1,4)$ -glykosididoksia. Lysotsyymejä esiintyy kaikilla eliöillä bakteereista kasveihin ja selkärangkaisiin. Lysotsyymit eli endo-*N*-muramidaasit jaetaan neljään luokkaan muun muassa niiden aminohappojärjestyksen ja katalyyttisen aktiivisuuden perusteella. Ch-tyypin muramidaasit on nimetty *Chalaropsis* -sienestä eristetyn muramidaasin mukaan. Ne pystyvät muista lysotsyymiluokista poiketen pilkkomaan $\beta(1,4)$ -glykosididoksien lisäksi 6-*O*-

asetyloitua peptidoglykaania, jota esiintyy esimerkiksi *S. aureus*:n soluseinässä. *O*-asetyloiduissa glykaaniketjuissa MurNAc-yksikön kuudenteen hiileen on liitetty asetyyliryhmä. Vaikka luokan ensimmäinen muramidaasi on löydetty sienestä, on suurin osa luokkaan kuuluvista muramidaaseista eristetty bakteriofageista tai gram-positiivisista bakteereista. Tutkimuksessa käytetään usein *Streptomyces coelicolor* -bakteerista eristettyä Ch-tyypin muramidaasia, sellosyyliä.²²

Lysostafiini on entsyymi, joka on alun perin löydetty *S. simulans* -bakteerin tuottamana.²³ Lysostafiinityypin entsyymeitä esiintyy kuitenkin useilla bakteereilla ja bakteriofageilla. Se on metalloendopeptidaasi, joka tarvitsee toimiakseen sinkkiä.²⁴ Se hajottaa penta-glysiiniristisiltoja, joita esiintyy etenkin *S. aureus*:n ja muiden *Staphylococcus* -bakteerien soluseinässä. Lysostafiinin on havaittu katkaisevan etenkin kolmannen ja neljännen glysiiniyksikön välisen sidoksen. Bakteerit, joiden peptidoglykaanissa on korkeampi määrä seriiniä kuin glysiiniä ovat suhteellisen resistenttejä lysostafiinille. Lysostafiini pystyy hajottamaan jo olemassa olevaa peptidoglykaania, eikä vaikuta vain sen biosynteesiin, kuten useimmat muut soluseinää hajottavat entsyymit.²⁵

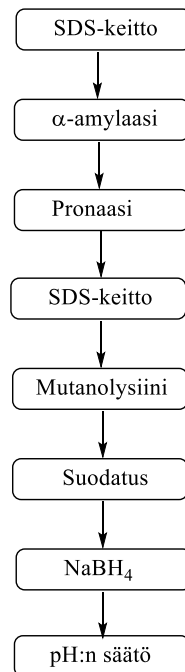
3.2 Peptidoglykaanin puhdistus

Peptidoglykaani ei liukene veteen. Kromatografista ja massaspektrometristä analyysiä varten peptidoglykaani tulee saada liukenevaan muotoon. Ensin peptidoglykaani erotetaan muista solun osista. Erottaminen tehdään yleisesti keittämällä solupellettejä natriumdodekyylisulfaatti (SDS) -liuoksessa. Jäähdytyksen jälkeen sentrifugoimalla massasta erottuu liukenematon peptidoglykaani.¹⁷

Tässä vaiheessa peptidoglykaani on saatu erotettua useimmista solun komponenteista, mutta kovalenttiset sidokset peptidoglykaanin ja esimerkiksi joidenkin soluseinän proteiinien tai polysakkaridien välillä ovat vielä olemassa. Niiden rikkomista varten peptidoglykaani käsitellään ensin α -amylaasientsyymillä, joka irrottaa peptidoglykaanista siihen kiinnittyneet polysakkaridit. Proteaasientsyymikäsitelyllä katkaistaan peptidoglykaanin ja proteiinien väliset sidokset. Lisäksi gram-positiiviset bakteerit käsitellään 1 M suolahapolla niihin kiinnittyneiden teikkohappojen irrottamiseksi.¹⁷

Tämän jälkeen SDS-käsittely toistetaan ja liukenemattoman peptidoglykaanin joukosta saadaan poistettua niistä irrotetut proteiinit ja polysakkaridit, jotka liukenevat liuottimeen.

Laimennettujen peptidoglykaaninäytteiden joukkoon lisätään mutanolysiinientsyymiä, joka pilkkoo peptidoglykaania pienemmiksi liukeneviksi fragmenteiksi. Mutanolysiinin ja liukenemattomien fragmenttien poistamiseksi näytteet suodatetaan. Tämän jälkeen näytteeseen lisätään natriumboorihydridiä (NaBH_4), jolloin pilkotun peptidoglykaanin sokeriosat pelkistyvät ja fragmentit saadaan erotettua kromatografisesti. Pelkistysreaktion lopettamiseksi pH säädetään happamaksi 85 % fosforihapolla.¹⁷ Kuvassa 24 on esitetty tiivistetysti peptidoglykaanin puhdistuksen vaiheet HPLC-analyysiä varten.



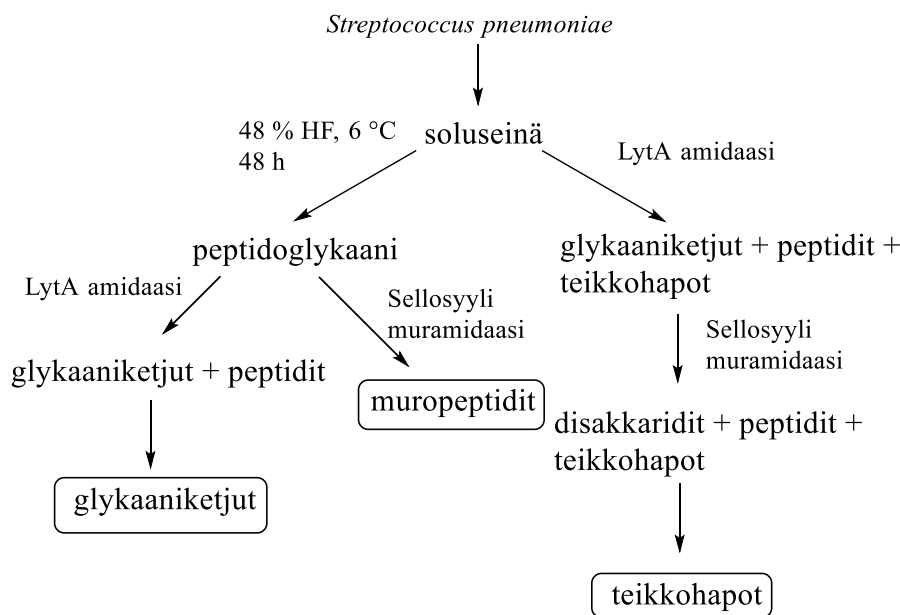
Kuva 24. Tiivistetty kuvaus peptidoglykaanin puhdistuksesta HPLC-analyysiä varten.

Peptidoglykaanin puhdistus kestää edellä kuvattua menetelmää käyttäen noin viikon. Uudella nopeammalla menetelmällä peptidoglykaanin voi puhdistaa kerralla 24:ssä tunnissa. Menetelmä on hyvin samankaltainen kuin edellä kuvattu, mutta sen etuna on nopeus ja se mahdollistaa suuremman peptidoglykaanimäärän tutkimisen nopeammin. Menetelmän käyttö yhdistettynä UPLC-MS-analyysiin on tehokas tapa kartoittaa hajotuksessa ja puhdistuksessa syntyviä muropeptidejä.¹⁸ Kirjallisuudesta löytyy myös muita menetelmiä peptidoglykaanin puhdistukseen.²⁶

S. pneumoniae on gram-positiivinen bakteeri, jonka soluseinässä on runsaasti siihen kovalenttisesti kiinnittyneitä teikkohappoja. Niiden poistamiseksi soluseinä käsitellään vetyfluoridihapolla (HF), jonka jälkeen peptidoglykaani käsitellään sellosyylillä, jolloin saadaan muropeptidejä. Toinen mahdollisuus on käyttää amidaasikäsitelyä, jolloin

peptidoglykaanista irrotetaan kantapeptidit, mikä mahdollistaa pelkkien glykaaniketjujen tutkimisen.²⁶

Teikkohappojen tutkimiseksi soluseinä käsitellään ensin amidaasilla, mikä irrottaa glykaaniketjut ja kantapeptidit toisistaan. Sellosoylikäsittelyllä glykaaniketjut pilkotaan disakkarideiksi, joista teikkohapot voidaan erottaa kokoeksklusiokromatografiaa käyttäen. Tämän jälkeen teikkohapot voidaan analysoida esimerkiksi massaspektrometriaa käyttäen.²⁶ Kuvassa 25 esitetään käsittelykaavio, jonka lopputuloksena *S. pneumoniae*:n peptidoglykaani ja teikkohapot saadaan eristettyä.



Kuva 25. Kaavio *S. pneumoniae*:n peptidoglykaanin ja teikkohappojen puhdistuksesta.

Kiinteän tilan NMR-analyysi (ss-NMR) voidaan tehdä koko solusta tai eristetystä kokonaisesta soluseinästä.²⁷ Kiinteän tilan NMR-analyysiä varten bakteerisoluja kasvatetaan leimattuja aminohappoja tai muita ¹³C:n ja ¹⁵N:n lähteen sisältävissä kasvatusliuoksissa.^{27,28} Näytteen käsittelyt eri lähteissä poikkeavat jonkin verran, mutta pääosin vaiheet ovat samankaltaisia.

Solut kerätään, sentrifugoidaan ja niille tehdään SDS-keitto, jolla poistetaan ei-kovalenttisesti sitoutuneet solun osat. SDS poistetaan pesemällä solupellettiä 1 M natriumkloridiliuoksella ja vedellä. Solupelletti sekoitetaan veteen ja hajotetaan helmimyllyllä. Hajotetut solun osat otetaan talteen ja käsitellään 100 mM TrisHCl-liuoksella (2-amino-2-(hydroksimetyyli)-1,3-propanidolihydrokloridi), joka sisältää 20 mM magnesiumsulfaattia (MgSO₄). Näyte käsitellään DNAasi- ja RNAasientsyymeillä, jolloin DNA ja RNA saadaan hajotettua. Sen

jälkeen näytteeseen lisätään 10 mM kalsiumklorida (CaCl_2) ja trypsiiniä, joka hydrolysoi peptidisidoksia. Näiden entsyymien toiminta pysäytetään keittämällä näytettä SDS:n kanssa.²⁷

Tämän jälkeen näyte sentrifugoidaan ja pelletti sekoitetaan 8 M litiumkloridiliuokseen (LiCl). Inkuboinnin ja uudelleen sentrifugoinnin jälkeen pelletti sekoitetaan etyleenidiamiini-tetraetikkahappoon (EDTA). Inkuboinnin jälkeen pelletti pestään vedellä ja asetonilla. Soluseinäpelletti käsitellään 48 % vetyfluoridihapolla (HF), minkä jälkeen se sentrifugoidaan, pestään vedellä ja TrisHCl-puskurilla ja vielä uudelleen vedellä. Näin saadaan erotettua ehjä peptidoglykaani, joka voidaan sekoittaa 50 mM HEPES-puskuriin (4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiinietaanisulfonihappo).²⁷

NMR-näytettä varten solut kerätään logaritmisen kasvuvaiheen lopussa. Solut sentrifugoidaan ja solupelletti pestään 40 mM trietanoliamiinihydrokloridiliuoksella, minkä jälkeen pelletti sekoitetaan trietanoliamiinihydrokloridiliuokseen, jäädytetään nestetypellä ja kylmäkuivataan. Kylmäkuivattu jauhe puristetaan pelletiksi, josta voidaan mitata NMR-spektri.²⁷

Kylmäkuivatusta solujauheesta voidaan eristää myös pelkät soluseinät. Tällöin solujauhe sekoitetaan kylmään veteen ja sentrifugoidaan muutama kertaan trietanoliamiinihydrokloridin poistamiseksi. Sen jälkeen pelletti sekoitetaan jälleen veteen, jossa sitä keitetään. Tämä inaktivoi solut. Näyte sentrifugoidaan ja pelletti sekoitetaan kylmään kaliumfosfattiin. Tämän jälkeen näyte käsitellään DNAasientsyymillä, ja solut hajotetaan helmimyllyllä. Helmet suodatetaan näytteestä. Suodos sentrifugoidaan ja sekoitetaan kylmään veteen, johon lisätään vähitellen kiehuvaa SDS-liuosta.

Lisäyksen jälkeen näytettä keitetään puoli tuntia, minkä jälkeen sen annetaan jäähtyä. SDS poistetaan pesuilla ja sentrifugoinnilla. Jäljelle jäänyt pelletti sekoitetaan Tris-puskuriin, joka sisältää DNAasia, trypsiiniä ja kymotrypsiiniä. Inkuboinnin jälkeen näyte pestään ja sentrifugoidaan. Näytteestä poistetaan hajonneet soluseinän osat. Eristetyistä soluseinistä koostuva pelletti sekoitetaan 40 mM trietanoliamiinihydrokloridiliuokseen, jäädytetään, kylmäkuivataan ja kylmäkuivatusta jauheesta puristetaan pelletit, joista NMR-spektrit voidaan mitata.²⁷

3.3 Peptidoglykaanin karakterisointi

Pilkottuja liukoisia peptidiglykaanifragmentteja, muropeptidejä, voidaan analysoida käyttämällä korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa.^{17,29} Laitteiden kehittymisen myötä peptidoglykaania voidaan nykyään tutkia myös UPLC-laitteistoilla (Ultra Performance Liquid Chromatography).^{18,29,30} HPLC:aan verrattuna UPLC:n etuna on korkeampi resoluutio pienemmällä injektio-tilavuudella ja eluointiajalla.³⁰ Nestekromatografian ja massaspektrometrian yhdistelmää käytetään etenkin peptidoglykaanin muropeptidikoostumusten kartoittamiseen.¹⁷

Kiinteän tilan ydinmagneettinen resonanssispektroskopia mahdollistaa kokonaisen soluseinän tai hajottamattoman peptidoglykaanin tutkimuksen.²⁶ NMR-analyysiä varten soluja on kasvatettava leimattuja hiilen ja typen lähteitä sisältävillä kasvatusalustoilla.²⁸ Kiinteän tilan NMR-analyysin avulla on pystytty ratkaisemaan peptidoglykaanin kolmiulotteista rakennetta.²⁹ Bakteerin soluseinää ja sen peptidoglykaania voidaan tutkia myös kuvantamalla esimerkiksi atomivoimamikroskooppia tai läpäisyelektronimikroskoopilla. Kuvantamismenetelmiä on käytetty etenkin soluseinän muodon avaruudelliseen hahmottamiseen.^{29,30}

FACE (Fluorescence-Assisted Carbohydrate Electrophoresis) on menetelmä, jota voidaan käyttää muropeptidien erottamiseen. Menetelmä perustuu kovalenttisesti leimattujen muropeptidien erottamiseen niiden liikkeessä polyakryyliamidigeelin läpi sähkön vaikutuksesta. Detektointi tapahtuu UV-valon avulla.³¹

3.3.1 Nestekromatografia

Nestekromatografia on kvantitatiivinen menetelmä, jota käyttäen voidaan muun muassa tarkastella peptidoglykaanin rakenteen muutoksia eri bakteerilajien, kasvuolosuhteiden tai mutaatioiden suhteen. Nestekromatografian avulla voidaan määrittää peptidiketjujen pituudet ja ristiinsitoutumisen aste ja siten saada tietoa peptidoglykaanin kokonaisrakenteesta.¹⁷ Vaikka erilaisia muropeptidejä esimerkiksi *E. coli*:n tapauksessa on pystytty karakterisoimaan yli 80, 30 yleisintä muropeptidiä sisältyy prosentuaalisesti yli 96–98 %:iin kaikista esiintyvistä muropeptideistä.²⁹

Nestekromatografia perustuu erotettavien yhdisteiden poolisuuseroihin. Ajon aikana näyte jakaantuu komponenteikseen, jotka kulkeutuvat eluentin eli liikkuvan faasin mukana kolonnin

eli stationäärifaasin läpi. Yhdisteiden kulkeutumista kolonnin läpi mitataan ajan funktiona.³² Muropeptidien rakenteella ja retentioajalla on vahva korrelaatio. Pooliset, pienen molekyylipainon omaavat muropeptidit eluoituvat ensin ja poolittomat, molekyylipainoltaan suuremmat muropeptidit viimeisenä.²⁹

Tyypillisesti peptidoglykaanianalyysi HPLC:aa käyttäen suoritetaan ODS-C18 (oktadekyyylisilaani) -käänteisfaasikolonnilla.²⁹ Kolonnissa silikan hydroksyyliiryhmät on korvattu oktadekyyliiryhmillä. Käänteisfaasikromatografiassa liikkuvan faasin ja stationäärifaasin poolisuudet ovat käänteiset normaalifaasikromatografiaan verrattuna. C18-materiaali on hyvin pooliton, jolloin liikkuvan faasin eli eluentin on oltava poolinen.³³

Peptidoglykaanianalyysissä liikkuvana faasina käytetään yleisesti metanolia sisältävää natriumfosfaattipuskuria.²⁹ Puskuri voi olla esimerkiksi 50 mM natriumfosfaattiliuos, jossa on 15 % metanolia.¹⁷ Eluenttina voidaan käyttää myös trifluoretikkahappoa (TFA) metanoligradientilla. Koska TFA on haihtuvaa, voidaan tätä eluenttia käyttää suoraan massaspektrometriseen analyysiin.¹⁸ Natriumatsidin (NaN_3) lisääminen puskuriin tasapainottaa metanolin aiheuttamaa UV-absorptiota.³⁰

HPLC-analyysissä käytetään usein gradienttiajua metanolin suhteen. Ajo aloitetaan puskurilla, joka ei sisällä lainkaan metanolia ja ajon aikana metanolin määrää lisätään vähitellen 0:sta 100 %:iin esimerkiksi 120 minuutin aikana. Kolonnin pitäminen 30 °C:ssa takaa fragmenttien tasaisen erottumisen. Muropeptidien retentioaika on riippuvainen puskurin pH:sta, liuottimen metanolin prosenttiosuudesta ja lämpötilasta. Pilkotut ja toisistaan erotetut peptidoglykaanifragmentit voidaan tunnistaa massaspektrometrian avulla tai UV-detektiolla. UV-detektiossa käytetään aallonpituutta 205–210 nm.¹⁷

Soluseinän pilkkominen entsyymeillä tuottaa siis monomeerisiä muropeptidejä sekä ristiinsitoutuneita oligomeerejä (dimeerejä, trimeerejä ja tetrimeerejä). Lisäksi saadaan anhydromuropeptidejä, jotka sisältävät terminaalisen 1,6-anhydroMurNAc-yksikön. Erilaisten muropeptidien suhteelliset osuudet näytteessä antavat tietoa peptidoglykaanin ja bakteerin soluseinän rakenteesta. Oligomeerien molaariset osuudet voidaan laskea kromatogrammista piikkien pinta-alojen avulla. Molaaristen osuuksien avulla voidaan puolestaan laskea ristiinsitoutumisen aste (%) seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$\text{ristisidosten \%} = \quad (1)$$

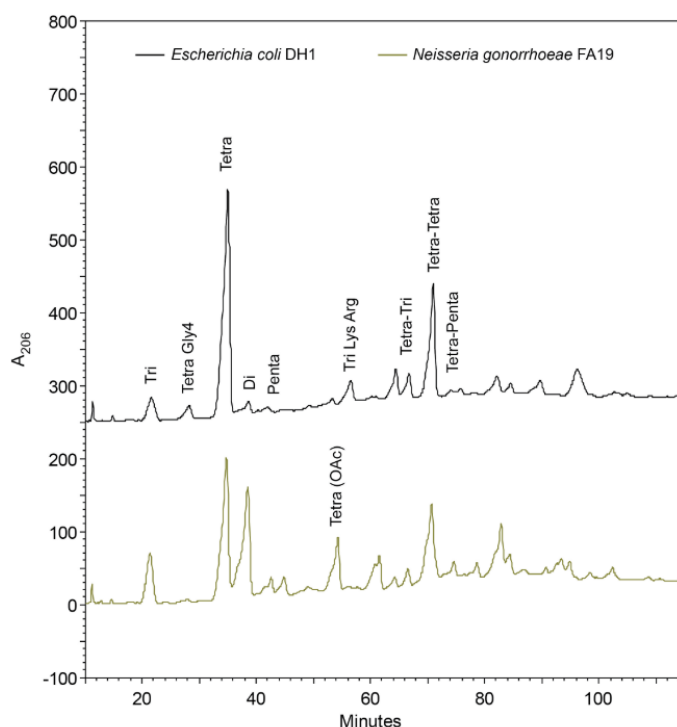
$$\text{dimeerien mol \%} + 2 \times (\text{trimeerien mol \%}) + 3 \times (\text{tetrimeerien mol \%}).^{30}$$

Kaavassa kertoimilla osoitetaan ristisidosten määrä oligomeeriä kohden. Esimerkiksi trimeerissä on kaksi ristisidosta, joten sen kerroin on kaksi. 1,6-AnhydroMurNAc-yksiköt sijaitsevat aina peptidoglykaaniketjujen päässä, joten niitä sisältävien muropeptidien suhteellista määrää voidaan käyttää keksimääräisen glykaaniketjun pituuden määrittämiseen, kuten alla oleva yhtälö osoittaa:

$$\text{keskimääräinen glykaaniketjun pituus} = \quad (2)$$

$$\frac{100 \text{ muropeptidiä}}{\text{kaikkien 1,6-anhydropiikkien mol \%}} \cdot 30$$

Useat peptidoglykaanifragmentit ovat samanlaisia lajista riippumatta, kuten alla olevasta kuvasta (kuva 26) voidaan havaita. Kuvassa on allekkain esitettyinä sauvamaisen gram-negatiivisen *E. coli*:n ja diplokokkina esiintyvän gram-positiivisen *N. gonorrhoeae*:n kromatogrammit. Kromatogrammit eroavat toisistaan muun muassa sen vuoksi, että *N. gonorrhoeae*:n peptidoglykaani on *O*-asetyloitu ja siitä puuttuu Tri-Lys-Arg -osa. Kuvassa vaaka-akselilla on aika ja pystyakselilla absorbanssi aallonpituudella 206 nm.¹⁷



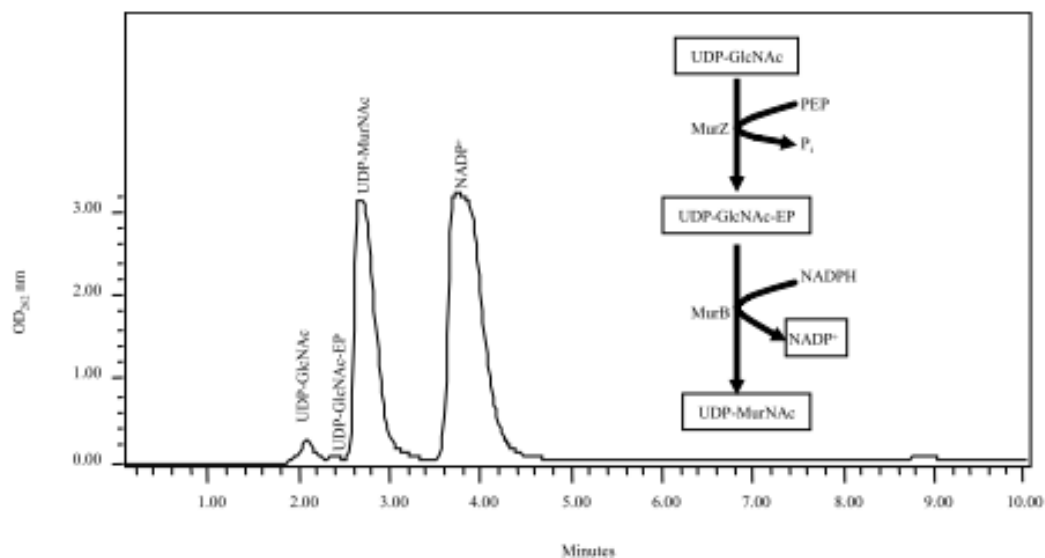
Kuva 26. Kromatogrammit erotetuista peptidoglykaanifragmenteista *E. coli*:n ja *N. gonorrhoeae*:n tapauksessa.¹⁷ (Kopioitu Bio-protocol luvalla)

Muropeptidit jaotellaan usein luokkiin, joiden esiintyvyys kertoo bakteerin soluseinän rakenteesta. Esimerkiksi runsas määrä monomeerisiä muropeptidejä kertoo siitä, että

soluseinässä on vähemmän ristiinsitoutumista, jolloin peptidoglykaani on joustavampaa. Dimeerit, trimeerit ja tetrameerit ovat peptidoglykaanin haaroittumiskohtia, joten niiden lisääntynyt määrä kertoo korkeammasta ristiinsitoutumisen määrästä ja jäykemmästä soluseinästä.²⁹

Terminaalisen 1,6-anhydroMurNAc-yksikön sisältävien muropeptidien suuri määrä kertoo soluseinän peptidoglykaaniketjujen lyhydestä ja peptidoglykaanin joustavuudesta. Kun kahden peptidoglykaaniyksikön välinen ristsidos on muodostunut ensimmäisen yksikön kolmannesta aminohaposta toisen yksikön kolmanteen aminohappoon, peptidoglykaaniketjujen välinen etäisyys on keskiarvoa lyhempi, mikä aiheuttaa resistenssin β -lakteameja vastaan. Pentapeptideillä on peptidiketjussaan D-alanyyli-D-alaniiniyksikkö. Se mahdollistaa vankomysiinin kaltaisten yhdisteiden sitoutumisen ja osoittaa, että lajilta puuttuvat karboksipeptidaasit (CPaasi).²⁹

Nestekromatografiaa on käytetty myös erottamaan peptidoglykaanin biosynteesin välituotteita. Raymond *et al.* pystyivät erottamaan UDP-MurNAc-yksikköjä *E. coli*:sta käyttäen bakteerista eristettyjä entsyymeitä MurZ ja MurB. Kuvassa 27 on esitetty reaktiot, joilla UDP-MurNAc:ta saatiin valmistettua UDP-GlcNAc:sta. Reaktiot vastaavat biosynteesin reaktioita. UDP-MurNAc erotettiin käyttäen HPLC:tä.³⁴



Kuva 27. UDP-MurNAc:n valmistus ja kromatogrammi erotetusta reaktioseoksesta.³⁴
(Kopioitu Federation of European Microbiological Society luvalla)

3.3.2 Massaspektrometria

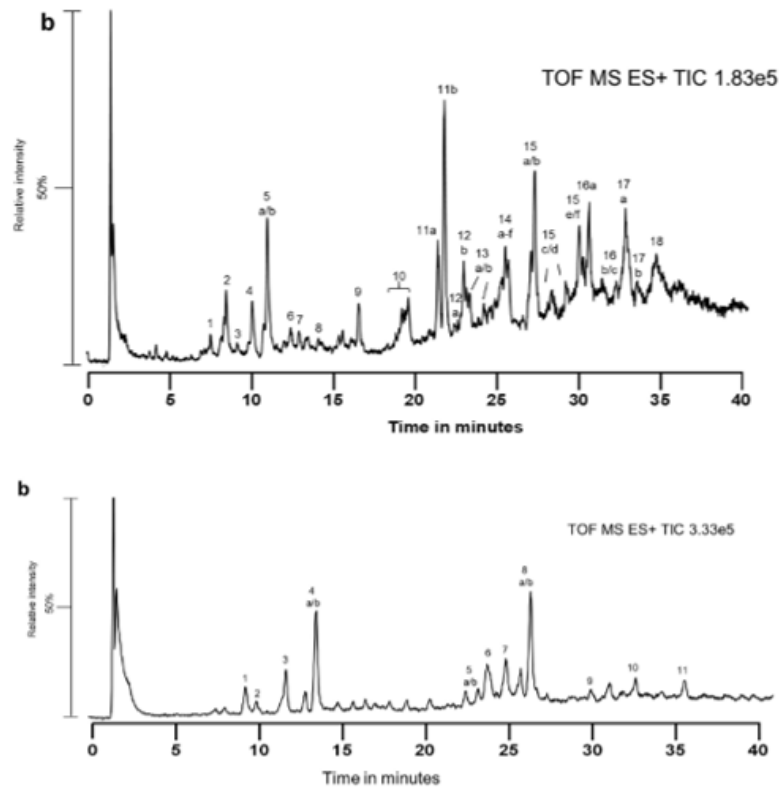
Massaspektrometrian avulla muropeptidit voidaan karakterisoida tarkasti.²⁹ Massaspektrometriassa tutkittavat yhdisteet ionisoidaan molekyyli-ioneiksi, jotka pilkkoutuvat edelleen pienemmiksi fragmenteiksi. Fragmentit erottuvat toisistaan massa-varaussuhteen (m/z) perusteella. Massaspektrometreissa on erilaisia ionisaatio-, erottelu- sekä detektiomenetelmiä, joista valitaan tutkittavalle näytteelle sopiva.³³

Peptidoglykaanianalyyseissä voidaan käyttää esimerkiksi sähkösumutus-ionisaatiota (ESI, Electrospray Ionization) tai matriisiavusteista laserdesorptio-ionisaatiota (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization).³⁵ Detektointiin käytetään tyypillisesti lentoaikadetektoria (TOF, Time of flight).¹⁷ MALDI:n massa-alue sopii hyvin muropeptidien karakterisoimiseen eikä se vaadi suuria näytemääriä. Ionisaatiomenetelmänä se sietää suhteellisen hyvin suolakontaminaatiota.²⁹

Edellä mainittujen menetelmien lisäksi myös tandemmassaspektrometriaa (MS/MS) voidaan käyttää peptidoglykaanin rakenneanalyyseissä.³⁶ Sitä käytetään erityisesti silloin, kun tutkittavilla yhdisteillä on samantyyppinen massaspektri ja sama retentioaika nestekromatografiassa. Jos yhdisteet ovat erilaisia, niiden tytäriönien massaspektrit eroavat toisistaan ja yhdisteet voidaan tunnistaa.³³

Nestekromatografian ja massaspektrometrian yhdistelmässä jokaisesta kromatografialla erotetusta yhdisteestä mitataan oma massaspektri. HPLC:lta massaspektrometrille tuleville näytteille tulee tehdä suolanpoisto ennen massa-analyysiä, jotta nestekromatografiassa käytetty eluentti ei kontaminoi massaspektrometriä. Suolanpoistopuskurina voidaan käyttää esimerkiksi 50 %:sta asetonitriililiuosta, jossa on 0,05 % trifluorietikkahappoa.¹⁷

Kuvassa 28 esitetään *S. aureus*:n ja *E. coli*:n UPLC/MS –analyysin spektrit. Spektreistä voidaan havaita, kuinka *S. aureus*:n muropeptideissa on enemmän vaihtelua. Suurempi vaihtelu johtuu etenkin pentaglysiiniristisilloista ja siitä, että *S. aureus*:lla esiintyy enemmän oligomeersiiä muropeptidejä. Tästä kertoo myös se, että *S. aureus*:n spektrissä piikkejä havaitaan enemmän suuremmalla retentioajalla.¹⁸

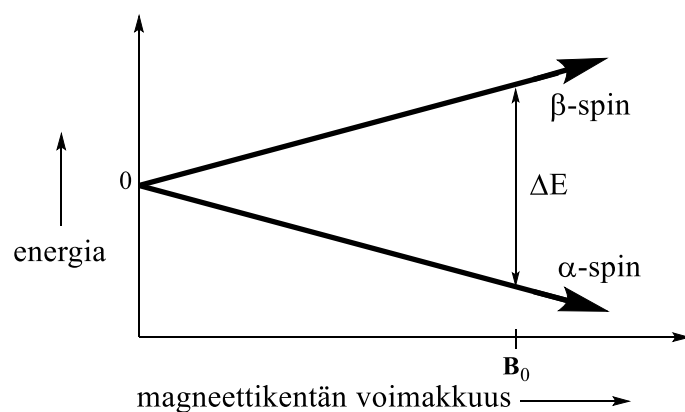


Kuva 28. *S. aureus*:n ja *E. coli*:n UPLC/MS-spektrit.¹⁸ (kopioitu Nature luvalla)

3.3.3 NMR-spektroskopia

NMR-spektroskopia perustuu atomiytimien käyttäytymiseen ulkoisessa magneettikentässä. Kaikki atomiytimet eivät ole NMR-aktiivisia. NMR-aktiivisissa ytimissä protonien ja neutronien määrä on pariton. Yleisimmin tarkasteltuihin NMR-aktiivisiin ytimiin kuuluvat esimerkiksi ^1H , ^{13}C , ^{15}N ja ^{31}P .³³

Sähköisesti varatut ytimet pyörivät akselinsa ympäri aiheuttaen ympärilleen magneettikentän. Ulkoisessa magneettikentässä ytimet käyttäytyvät kuin magneetit ja asettuvat joko magneettikentän suuntaisesti (α -spin) tai sitä vastaan (β -spin). Magneettikentän vastaisesti asettuneilla ytimillä on hieman korkeampi energia kuin kentän suuntaisesti olevilla ytimillä.³⁷ Energiaeroa havainnollistetaan kuvassa 29.



Kuva 29. Spin- $\frac{1}{2}$ -ytimen α - ja β -spintilojen välinen energiaero.

Spin-tilojen energiaero on suoraan verrannollinen ulkoisen magneettikentän voimakkuuteen ja vastaa tietyn radiotaajuuden suuruista energiakvanttia. Radiotaajuisella säteilyllä voidaan siis siirtää ytimiä energiatilalta toiselle. Virittävään taajuuteen vaikuttaa ulkoisen magneettikentän lisäksi gyromagneettinen suhde, joka riippuu atomiytimeistä.³⁷

Atomiytimet ovat magneettikentässä hyrrämäisessä liikkeessä, jonka taajuutta kutsutaan Larmor-taajuudeksi tai resonanssitaajuudeksi. Spektriä mitattaessa näytteeseen ohjataan lyhytikäinen radiotaajuinen pulssi, joka poikkeuttaa positiivisen z-akselin suuntaisen kokonaismagnetisaatiovektorin tasapainotilastaan. Koska ytimet värähtelevät niille ominaisilla Larmor-taajuuksilla, indusoituu xy-tasossa olevaan vastaanottokäämiin magneettikentän muutoksien vaikutuksesta virta. Vastaanottimen havaitsema signaali vaimenee sitä mukaa kun ytimet palaavat takaisin tasapainotilaansa. Fourier-muunnoksella signaalin amplitudi ajan suhteen muunnetaan amplitudiksi taajuuden suhteen, jolloin saadaan tulkittava spektri.³⁷

Molekyylissä olevat atomiytimet resonoivat eri taajuuksilla sen mukaan, millainen ytimen magneettinen ympäristö on. Ulkoisessa magneettikentässä tutkittavan molekyylin elektronit joutuvat kiertoliikkeeseen, joka vaikuttaa tutkittavat ytimen esimerkiksi protonin kokemaan magneettikenttään tietyllä kertoimella, varjostusvakiolla. Elektronegatiiviset atomit pienentävät tutkittavan ytimen elektronitiheyttä ja varjostusta, jolloin tutkittava ydin kokee suuremman magneettikentän ja sen resonanssitaajuus kasvaa.³⁷

^1H ja ^{13}C NMR-spektreissä tutkittavat ytimen kemiallista siirtymää verrataan vertailuyhdisteenä käytetyn tetrametyylisilaanin (TMS) siirtymään. Kemialliset siirtymät esitetään ppm-asteikolla. Spektriä mitattaessa tutkittava yhdiste liuotetaan NMR-liuottimeen, joita ovat esimerkiksi

deuteroitu kloroformi ja metanoli. Käytettyjen liuottimien jäännösprotonien signaalit ovat tunnettuja, joten niitä käytetään ppm-asteikon kiinnittämiseen.³³

NMR-signaali jakautuu lähellä olevien NMR-aktiivisten ytimien vaikutuksesta. Tätä kutsutaan spin-spin-kytkennäksi ja sen avulla saadaan resonoivan ytimen lähellä olevien ytimien lukumäärä ja kytkennän voimakkuus. Signaali jakautuu noudattaen yhtälöä $2nI + 1$, missä n on kytkeytyneiden ytimien lukumäärä ja I kytkeytyneiden ytimien spinkvanttiluku. Kun protonispektrejä tulkitaan, käytetään hyväksi kemiallisen siirtymän arvojen lisäksi signaalien lukumäärää ja kytkentäpattereiden analyysiä sekä signaalien integraaleja, jotka ovat verrannollisia protonien määrään. ^1H -irtikytketyssä ^{13}C NMR-spektrissä kukin magneettisesti erilaisessa ympäristössä oleva hiili antaa spektriin oman signaalinsa, sillä toisista ^{13}C -ytimistä aiheutuvaa jakautumista ei havaita ^{13}C -ytimien vähäisen luonnollisen runsauden (1,1 %) vuoksi.³³

2-D NMR-spektreillä saadaan selville mitkä ytimet ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Homonukleaarisen korrelaatio-spektroskopian avulla saadaan selville kahden samanlaisen ytimen keskinäinen korrelaatio, kun taas heteronukleaarisessa korrelaatio-spektroskopiassa voidaan havaita esimerkiksi protonin ja hiilen keskinäiset korrelaatiot. Yleisimpiä ytimiä, joiden keskinäisiä korrelaatioita tutkitaan ovat ^1H ja ^{13}C sekä ^1H ja ^{15}N . HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence Spectroscopy) -mittauksella saadaan selville, mikä protoni on kytkeytynyt mihin heteroytimeen, kun taas HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy) -mittaus antaa tietoa korrelaatioista kahden tai useamman sidoksen yli. Lisäksi on olemassa mittauksia, joilla voidaan tarkastella ytimien avaruudellista läheisyyttä riippumatta siitä, onko ytimien välillä sidosta. Yksi tällainen koe on nimeltään NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy).³⁷

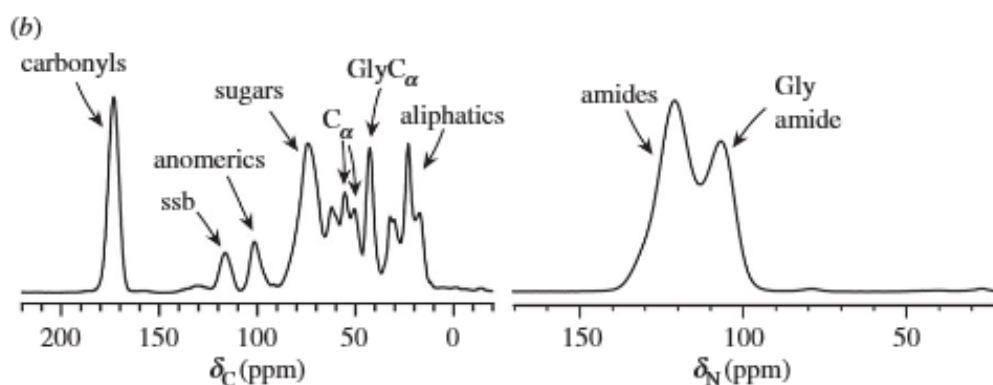
NMR-spektroskopiolla saadaan siis tietoa ytimien kemiallisesta siirtymästä ja sitä kautta niiden magneettisesta ympäristöstä, ytimien suhteellisesta määrästä ja ytimien kytkeytymisestä. Näiden tietojen avulla voidaan ratkaista molekyylien rakenteita. Lisäksi saadaan tietoa ydinten avaruudellisesta sijoittumisesta ja voidaan tutkia molekyylien dynamiikkaa ja kemiallisia muutoksia ajan suhteen.³⁷

Kiinteän tilan NMR-spektroskopiolla (ss-NMR, solid state NMR) voidaan tutkia näytteitä kiinteässä tilassa, ilman että ne täytyy liuottaa johonkin liuottimeen. Tämä mahdollistaa heikkoliukoisten molekyylien tutkimisen NMR-spektroskopian avulla. Kiinteiden näytteiden mittauksessa signaalit ovat leveitä, joten on kehitetty erilaisia tekniikoita, joilla signaalit saadaan tulkittaviksi.³⁸

MAS (Magic-Angle Spinning) -tekniikassa hienoksi jauhettu näyte asetetaan roottoriin, jota pyöritetään 1-111 kHz:n nopeudella $54,7^\circ$:n kulmassa ulkoiseen magneettikenttään nähden. Tämän seurauksena dipolikytkennät ja kemiallisen siirtymän anisotropia keskiarvoistuvat ja piikkien resoluutio on lähellä nestetilän NMR-spektroskopiaa.^{28,38}

Kiinteän tilan NMR-spektroskopiaa voidaan käyttää molekyylin rakenteen ja esimerkiksi sen sisäisen pakkautumisen määrittämiseen. Lisäksi sillä voidaan määrittää atomien ydinten välisiä etäisyyksiä ja esimerkiksi peptidoglykaanin tapauksessa tutkia muutoksia peptidoglykaanin rakenteessa, tarkastella peptidoglykaanin ristisiltojen pituuksien vaikutusta sen kolmiulotteiseen rakenteeseen sekä saada tietoa glykaaniketjujen suunnasta solukalvoon verrattuna.^{39,40} Kiinteän tilan NMR-spektroskopian avulla voidaan myös tutkia kokonaista peptidoglykaanikerrosta ja liukenemattomia, korkean molekyylipainon peptidoglykaani-teikkohappokomplekseja.²⁶

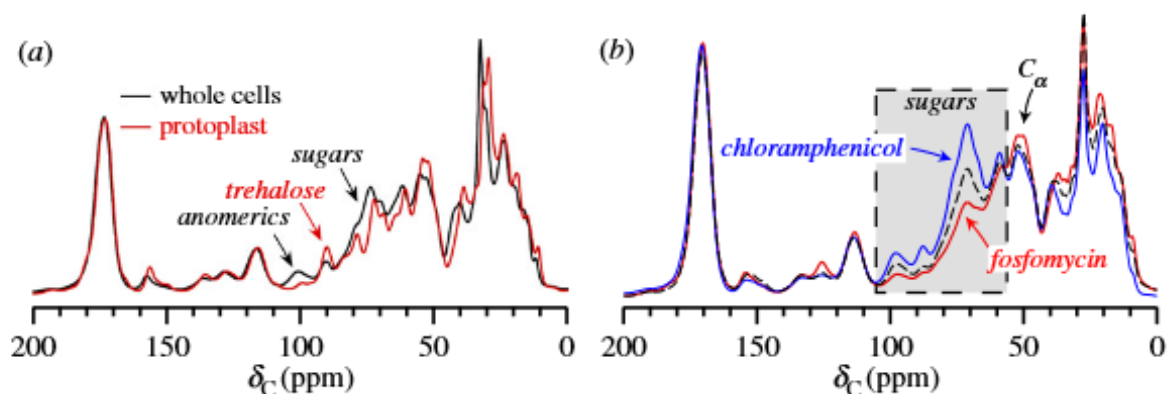
Kiinteän tilan NMR-tutkimusten perusteella on havaittu, että esimerkiksi *S. aureus*:n peptidoglykaani on hyvin järjestäytyntä ja tiheään pakkaantunutta. Glykaaniketju esiintyy symmetrisessä kierteisessä muodossa, jossa disakkaridiyksiköt ovat 40 \AA :n päässä toisistaan. *S. aureus*:n peptidoglykaaniverkko on muodostunut siten, että viereiset ketjut ovat orientoituneet samansuuntaisesti.⁴⁰ Kuvassa 30 on *S. aureus* -bakteerista eristettyjen soluseinien ^{13}C ja ^{15}N CP-MAS spektrit. Spektreissä on esitetty soluseinän osien tyypillisiä kemiallisia siirtymiä.



Kuva 30. *S. aureus* -bakteerista eristettyjen soluseinien ^{13}C ja ^{15}N CP-MAS spektrit.³⁹
(Kopioitu Royal Society Publishing luvalla)

Kuvassa 31 esitetään toinen esimerkki kiinteän tilan NMR-spektroskopian käytöstä peptidoglykaanin tutkimisessa. Vasemmalla olevassa spektrissä havainnollistetaan kokonaisen solun ja protoplastin (bakteerisolun, josta on poistettu soluseinä) ^{13}C CP-MAS-spektrien eroja ja

oikealla fosfomysiinin (punaisella) ja kloramfenikolin (sisisellä) vaikutuksia kokonaisen solun ^{13}C CP-MAS-spektriin. Fosfomysiini toimii soluseinän kasvun inhibiittorina, kun taas kloramfenikoli vaikuttaa proteiinisynteesiin. Fosfomysiinin vaikutus havaitaan selkeästi vähentyneenä polysakkaridihiliien määränä.³⁹

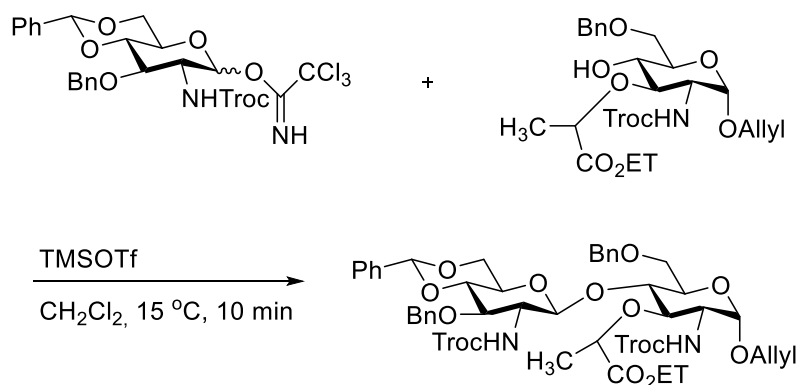


Kuva 31. Kokonaisen solun ja protoplastin ^{13}C CP-MAS-spektriin vertailu, sekä antibioottien vaikutus kokonaisen solun ^{13}C CP-MAS-spektriin.³⁹ (Kopioitu Royal Society Publishing luvalla)

3.4 Peptidoglykaanifragmenttien valmistus synteettisesti

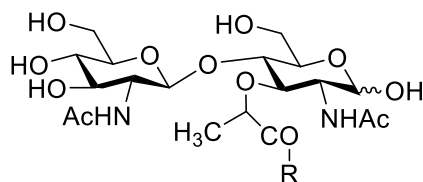
Paitsi eristämällä soluseinästä, peptidoglykaanifragmentteja voidaan saada myös valmistamalla niitä synteettisesti.^{41,42} Synteettisesti valmistettuja peptidoglykaanifragmentteja on käytetty erityisesti immunologisiin tutkimuksiin.⁴¹ Esimerkiksi Inumura *et al.*⁴¹ valmistivat peptidoglykaanin tetrasakkaridi- ($\text{GlcNAc-}\beta\text{-1,4-MurNAc}$)₂ ja oktasakkaridifragmentteja ($\text{GlcNAc-}\beta\text{-1,4-MurNAc}$)₄ sekä tetrasakkaridifragmentteja, jotka olivat joko peptidiketjuttomia tai joissa oli joko di-, tri-, tetra- tai pentapeptidi. Suorien ketjujen lisäksi on pystytty valmistamaan myös ristiinsitoutuneita peptidoglykaanifragmentteja.⁴³

Synteesissä välituotteena oli glukosamiinimuramiinihappodisakkaridi. Sen muodostuessa suojattu ($\text{GlcNTroc-}\beta\text{-1,4-MurNTroc}$)-triklooriasetoimidaatti sitoutuu ($\text{GlcNTroc-}\beta\text{-1,4-MurNTroc}$)-glykosyyliin. Glukosamiinimuramiinihappodisakkaridin muodostuminen on esitetty kuvassa 32.⁴¹ Troc (2,2,2-trikloorietoksikarbonyylikloridi) on yleinen amiinien suojaukseen käytetty suojaryhmä. Se voidaan poistaa esimerkiksi sinkin avulla.⁴⁴



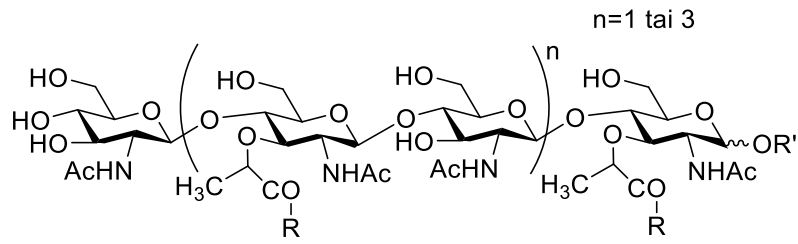
Kuva 32. Glukosamiinimuramiinihappopodisakkaridin synteesi.

Seuraavaksi Troc-suojaryhmät purettiin sinkkikuparireagenssilla etikkahapossa, minkä jälkeen etikkahapon anhydridiä käytettiin asetylaatioon. H₂-aktivoitun iridiumkatalyytin, [Ir(cod)(MePh₂P)₂]PF₆, avulla allyyliryhmä isomeroitiin vinyyliryhmäksi. Etyyliesteriryhmä poistettiin litiumhydroksilla (LiOH), minkä jälkeen vapaaseen karboksyylihappoon liitettiin haluttu peptidiketju. Vinyyli- ja bentsylideenisuojaryhmät poistettiin 20 %:lla TFA:lla ja bentsyylisuojaryhmä lisäämällä vetyä palladiumkatalyytin läsnä ollessa. Lopputuotteena saatiin disakkaridianalogi, jonka rakenne on esitetty kuvassa 33.⁴¹



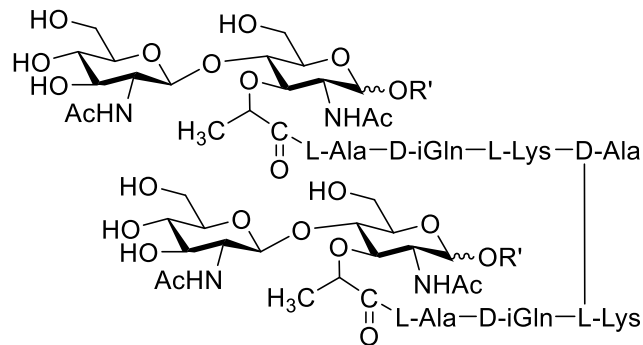
Kuva 33. Peptidoglykaanin disakkaridifargmentin analogi.

Tetrasakkaridianalogien valmistamiseksi toisen glukosamiinimuramiinihappodisakkaridimolekyylin (kuva 32) allyyliryhmän korvattiin triklooriasetoimidaattiryhmällä ja toisen bentsylideenisuojaryhmä poistettiin. Tämän jälkeen yhdisteiden annettiin reagoida keskenään, jolloin saatiin haluttu tetrasakkaridi. Toistamalla muokkaukset saatiin kaksi tetrasakkaridia liitettyä toisiinsa, jolloin muodostui oktasakkaridi. Tetra- ja oktasakkarideista poistettiin Troc-suojaryhmät. Ne asetyloitiin, etyyliesterit poistettiin ja niihin liitettiin haluttu peptidiketjut, minkä jälkeen poistettiin loput suojaryhmät, jolloin saatiin tetra- ja oktasakkaridisanalogit. Ketjujen pidentäminen tapahtuu pääosin samojen vaiheiden kautta kuin disakkaridifragmentin analogin valmistaminenkin.⁴¹ Kuvassa 34 on esitetty polysakkaridianalogin rakenne.



Kuva 34. Tetra- ja oktasakkaridien rakenne.

Fujimoto *et al.*⁴³ ovat valmistaneet synteettisesti *Streptococcus pneumoniae* -bakteerin soluseinän ristiinsitoutuneita peptidoglykaanifragmentteja. Ensin valmistettiin toisiinsa sitoutuneet peptidiketjut. Glykaaneina käytettiin mono- ja disakkarideja, jotka valmistettiin kuten Inamura *et al.*⁴⁵ oli aiemmin raportoinut. Synteessissä käytetty disakkaridi esitetään kuvassa 33. Valmiiksi toisiinsa kiinnittyneet peptidiketjut liitettiin glykaaneihin⁴³ ja lopputuotteena saatiin kuvassa 35 esitetty fragmentti.

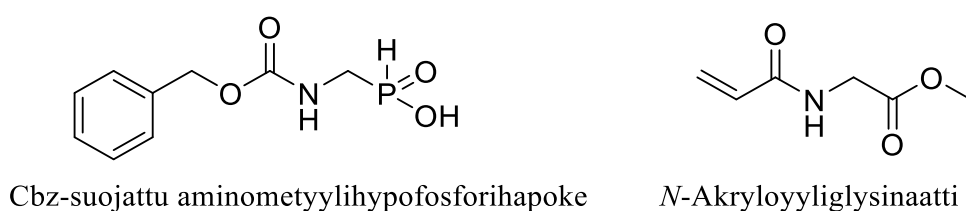


Kuva 35. Synteettisesti valmistettu ristiinsitoutunut peptidoglykaanifragmentti.

KOKEELLINEN OSA

4 TYÖN TARKOITUS

Tämän Pro Gradu -tutkielman kokeellisen osan tavoitteena oli valmistaa lysostafiinientsyymin siirtymätila-analogin, tetraglysiinihypofosforihapokkeen, valmistamiseen tarvittavia lähtöaineita, suojattua aminometyylihypofosforihapoketta ja *N*-akryloyylylglysinaattia. Aminometyylihypofosforihapokkeen aminoryhmän suojaamiseen käytettiin bentsyyliklooriformiaattia. Valmistettujen komponenttien rakenteet esitetään kuvassa 36.



Kuva 36. Suojatun aminohypofosforihapokkeen ja *N*-akryloyylylglysinaatin rakenteet.

Lysostafiinientsyymi on metalloendopeptidaasi, joka esiintyy bakteereissa ja bakteriofaageissa. Se hajottaa tiettyjen gram-positiivisten bakteerien soluseinän pentaglysiinisiltoja.²⁴ Metallopeptidaasit ovat entsyymejä, joiden katalyyttinen toiminta vaatii metallin, usein sinkin, läsnäolon.¹⁹ Endopeptidaasit puolestaan ovat entsyymejä, jotka pilkkovat peptidisidoksia ei-terminaalisten aminohappojen väliltä.⁴

Kaikki kemialliset reaktiot tapahtuvat siirtymätilojen kautta. Siirtymätila on tasapainossa substraatin ja tuotteen välillä. Siirtymätilojen elinikä on arviolta noin 10^{-3} sekuntia. Entsyymien siirtymätilojen rakenteiden suoraan havaitsemiseen ole fysikaalista tai spektroskooppista menetelmää, vaikka siirtymätilojen tutkiminen on tärkeää entsyymien katalyyttisten mekanismien selvittämiseksi.⁴⁶

Entsyymit vuorovaikuttavat substraatin kanssa venyttäen ja vääntäen sen sidoksia kohti korkeaenergistä siirtymätilaa. Siirtymätila-analogit yleisesti ovat molekyylejä, jotka mukailevat substraatin siirtymätilaa entsyymikatalysoiduissa reaktiossa. Ne jäljittelevät substraattia sen korkeaenergisessä tilassa, mutta niille ei tapahdu entsyymin katalysoimaa reaktiota, jolloin sitoutuminen entsyymiin on voimakkaampaa kuin substraatilla tai reaktiotuotteella.⁴⁷ Siirtymätila-analogien avulla pyritään selvittämään reaktioiden

mekanismeja ja sitä kautta valmistamaan parempia inhibiittoreita tai kehittämään vastaaville reaktioille uusia entsyymien kaltaisia molekyyliä, joiden avulla haluttuja reaktiota voidaan katalysoida.¹⁹

5 KÄYTETYT LAITTEET JA REAGENSIT

Synteesituotteista ja joistakin välituotteista mitattiin ^1H , ^{13}C ja ^{31}P NMR-spektrit Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Bruker AVIII 300 FT NMR-spektrometrillä. Joistakin tuotteista on lisäksi ajettu ^{13}C ja ^{31}P NMR-spektrit Bruker AVIII 500 FT NMR-spektrometrillä.

ppm-Asteikko kiinnitettiin liuottimina käytettyjen CDCl_3 :n ja MeOD :n jäännösprotoneiden signaaleihin $\delta(\text{CHCl}_3) = 7.26$ ppm, $(\text{CH}_3\text{OH}) = 4.71$ ppm ja CDCl_3 :n hiilisignaaliin $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.0$ ppm. Fosforimittauksissa ppm-asteikko kiinnitettiin käyttämällä H_3PO_4 :n vesiliuosta ulkoisena standardina, $\delta(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0.0$ ppm.

Massaspektrit on mitattu Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Micromass LCT ESI-TOF-massaspektrometrillä. IR-spektrien mittaukseen käytettiin laitoksen Bruker Tensor 27 FTIR-spekrometriä. Taulukossa 1 esitetään synteeseissä käytetyt reagenssit ja liuottimet.

Taulukko 1. Käytetyt reagenssit ja liuottimet sekä niiden valmistajat ja puhtausasteet.

Reagenssi	Valmistaja	Puhtausaste %
Akryylihapo	Sigma-Aldrich	99
Bentshydriyliamiini	TCI Chemicals	≥97
Bentsyliklooriformiaatti	Sigma-Aldrich	95
Dietylieetteri	VWR Chemicals	100
Etanoli	Altia	99,5
Etyyliasettaatti	VWR Chemicals	100
Formaldehydi, 38 %		
Hypofosforihapoke, 50 %	Sigma-Aldrich	
Isobutyliklooriformiaatti	Sigma-Aldrich	≥99
Kaliumkarbonaatti	VWR Chemicals	100
Kloroformi	VWR Chemicals	99,2
Metanoli	Honeywell	≥99,8
Metyyliglysiinaattihydrokloridi	Sigma-Aldrich	99
Trimetyyliortoformiaatti	Sigma-Aldrich	99
Natriumvetykarbonaatti	VWR Chemicals	100
<i>N</i> -metyylimorfoliini	Fluka Analytical	≥98
Tetrahydrofuraani	Sigma-Aldrich	≥99,9
Tolueeni	VWR Chemicals	100
Vetybromidihapko, 62 %	Riedel-de Haën	
Vetykloridihapko, 37 %	VWR Chemicals	

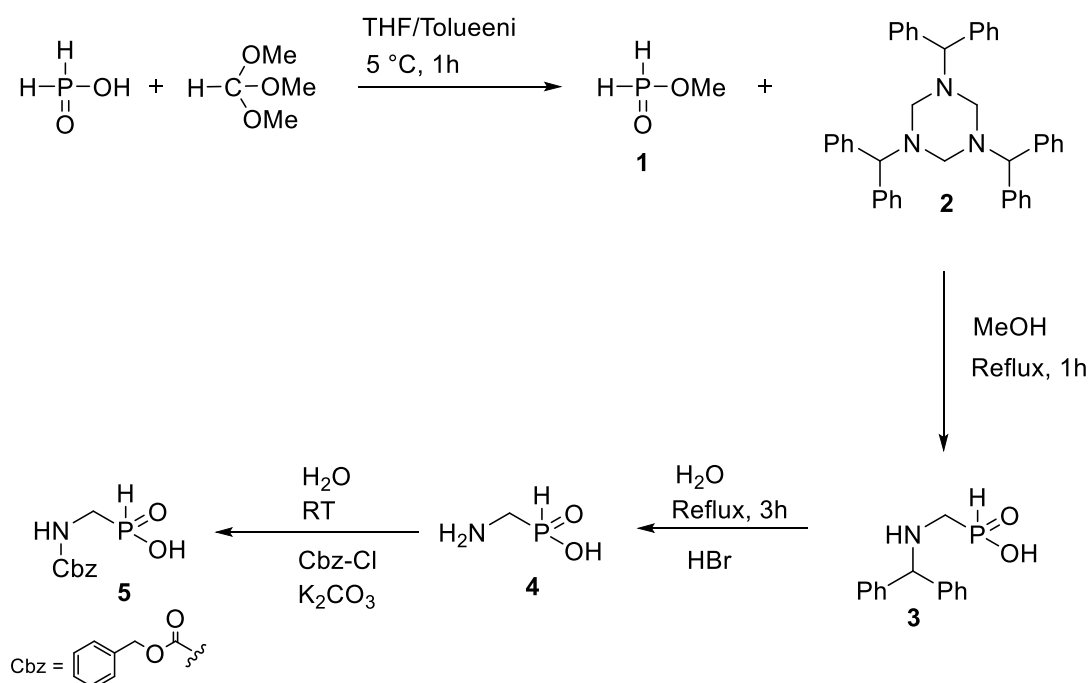
6 SIIRTYMÄTILA-ANALOGIN KOMPONENTTIEN VALMISTUS

Seuraavissa kappaleissa esitetään tutkielman kokeellisessa suoritetut synteesit pääpiirteittäin. Tarkemmat synteesiohjeet on esitetty luvussa yhdeksän.

6.1 Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus

Aminometyylihypofosforihapoketta valmistettiin kirjallisuudessa esitettyjä synteesejä mukaillen.^{24,48,49,50,51} Vedetön hypofosforihapoke aktivoitiin käyttämällä trimetyyliortoformiaattia.⁴⁸ Hypofosforihapokkeen metyyliesteri (1) liitettiin bentshydryyliamiinista ja formaldehydistä valmistettuun^{49,50} 1,3,5-tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaaniin (2), jolloin muodostui difenyylimetyyliaminometyylihypofosfinaatti (3).

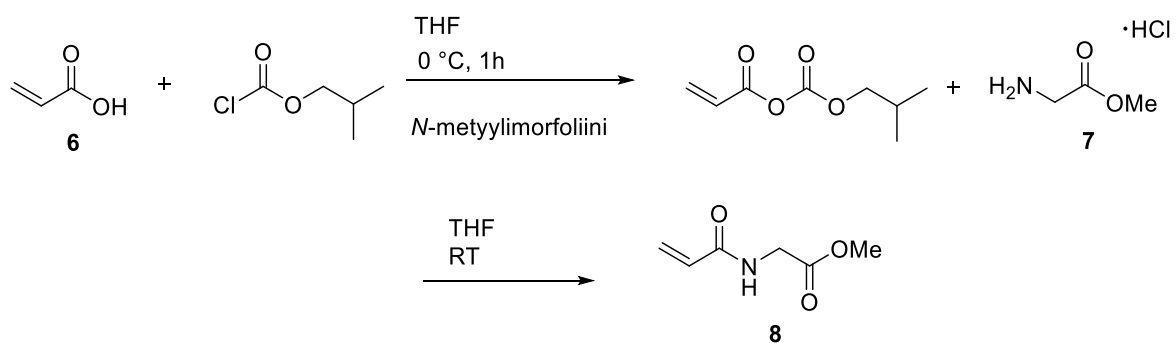
Aminoryhmää suojannut difenyylimetyyliryhmä poistettiin 62 %:lla vetybromidihapolla⁵⁰, jolloin saatiin suojaamatonta aminometyylihypofosforihapoketta (4). Cbz-suojattua aminometyylihypofosforihapoketta (5) valmistettiin suojaamalla aminoryhmä bentsyyliklooriformiaatilla (Cbz-Cl).⁵⁰ Synteesikaavio esitetään kuvassa 37.



Kuva 37. Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistaminen.

6.2 *N*-akryloyyliyglysinaatin valmistus

N-akryloyyliyglysinaattia valmistettiin seka-anhydridimentelmää käyttäen.²⁴ Akryylihapo (6) aktivoitiin isobutyryliklooriformiaatilla *N*-metyylimorfoliinin läsnä ollessa. Aktivoinnin jälkeen reaktioseokseen lisättiin metyyliyglysinaatin hydrokloridia (7), minkä jälkeen muodostui *N*-akryloyyliyglysinaatti (8). Synteesikaavio esitetään kuvassa 38.



Kuva 38. *N*-Akryloyyliyglysinaatin synteesi.

7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

Suojattua aminometyylihypofosforihapoketta ja *N*-akryloyylylglysiinaattia valmistettiin useita kertoja. Synteesireittien optimoinnilla pyrittiin parantamaan saantoprosenttia ja sujuvoittamaan synteesin suoritusta. Synteesien ongelmakohtiin perehtymällä ja niitä muokkaamalla synteesireittejä onnistuttiin hienosäätämään ja tuotteita valmistamaan. Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistamisen aikana kohdattiin useita ongelmakohtia, kun taas *N*-akryloyylylglysiinaatin synteesi onnistui suhteellisen vaivattomasti.

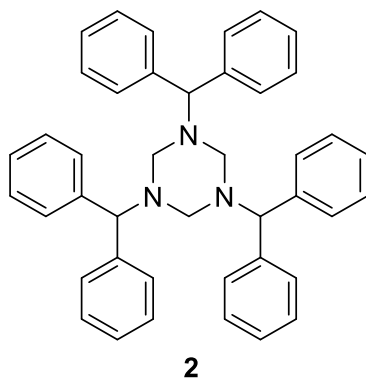
Reaktioiden etenemistä seurattiin ohutkerroskromatografialla (TLC, Thin Layer Chromatography). Kohdemolekyylien muodostuminen ja puhtaus varmistettiin NMR-spektroskopiolla. Yksi välituotteista ei liennut satavilla oleviin liuottimiin, minkä vuoksi siitä mitattiin IR-spektri.

Etenkin suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen synteesissä useat välituotteet olivat geelimäisiä eivätkä kirjallisuudessa kuvatusta poiketen kiteytyneet kunnolla. Näiden välituotteiden joukkoon oli suurella todennäköisyydellä jäänyt liuotinta, mikä teki niistä geelimäisiä ja minkä vuoksi saantoprosentteja ei pystytty luotettavasti määrittämään. Saantoprosentit laskettiin ainoastaan välituotteille, joiden kiteytyminen on täydellistä.

Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen saanto jäi vähäiseksi siitä huolimatta, että synteesin välituotteiden saantoja saatiin kasvatettua. Tuotteen muodostuminen pystyttiin kuitenkin todistamaan NMR-spektroskopiaa ja massaspektrometriaa käyttäen. *N*-akryloyylylglysiinaatin muodostuminen varmistettiin myös NMR-spektroskopiolla ja massaspektrometrialla. Synteesin saantoprosentti oli 49 %.

7.1 Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus

Ensimmäisessä vaiheessa valmistettiin 1,3,5-tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaania (**2**) antamalla formaldehydin ja bentshydryyliamiinin reagoida keskenään. Reaktiossa liuottimena oli tolueeni ja refluksoinnin aikana reaktiossa muodostuva vesi poistettiin atseotrooppisella tislauksella. 1,3,5-Tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaania (**2**, kuva 39) muodostui 33 %:n saannolla.

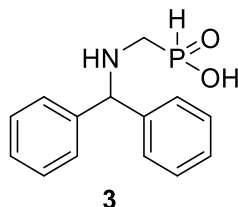


Kuva 39. 1,3,5-Tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaanin rakenne.

1,3,5-Tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaanin (**2**) ^1H NMR-spektrissä (liite 1) havaittiin kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 2.4$ ppm (singletti) resonanssisignaali, jonka aiheuttaa typpiatomien välinen CH_2 -ryhmä. Kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 4.7$ ppm (singletti) havaittiin fenyyliryhmien ja typpiatomien välisen CH -protonin signaali. Lisäksi havaittiin selkeät aromaattisten fenyyliryhmien protonien resonanssisignaalit kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta = 7.1$ ppm (multipletti) ja $\delta = 7.3$ ppm (multipletti). Kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 2.4$ ppm havaittavan signaalin integraalin suhde kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 4.7$ ppm esiintyvän signaalin integraaliin on 1:4, vaikka sen pitäisi olla 2:1. Syy integraalien suhteiden ristiriitaan lienee reagoimattoman lähtöaineen, bentshydryyliamiinin, läsnäolossa. Tätä tukevat myös aromaattisten alueen signaalien integraalit.

Reagensseista hypofosforihapoketta oli kaupallisesti saatavilla vain 50 % vesiliuoksena. Synteesiohjeessa^{48,49,51} oli käytetty 100 % hypofosforihapoketta, minkä vuoksi kaupallisesta vesiliuoksesta haihdutettiin vettä pois käyttämällä vakuunitislausta. Hypofosforihapokkeesta ei saatu täysin kuivaa, mutta veden määrä pystyttiin saamaan riittämän alhaiseksi reaktion onnistumiseksi. Kuivattu hypofosforihapoke reagoi trimetyyliortoformiaatin kanssa, jolloin muodostui hypofosforihapokkeen metyyliesteri (**1**). Muodostunutta hypofosforihapokkeen

metyyliesteriä (1) ei eristetty, vaan sen annettiin reagoida aiemmin valmistetun 1,3,5-tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaanin (2) kanssa. Näin muodostui difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapoketta (3) (kuva 40). Kiteiden sijaan saatiin geelimäistä ainetta, joka kiteytyi osittain ajan kuluessa

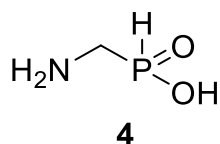


Kuva 40. Difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeen rakenne.

Difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeen (3) ^1H NMR-spektrissä (liite 2) havaittiin sekä halutun difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeen (3) että liuottimena käytetyn toluenin signaalit. Kemiällisen siirtymän arvolla $\delta = 3.4$ ppm (singletti) havaitaan difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeen (3) CH_2 -protonien signaali. Tämän perusteella välituotteen muodostuminen varmistettiin. Kemiällisen siirtymän arvolla $\delta = 4.9$ ppm (singletti) havaittiin fenyyliryhmien ja aminoryhmän välisen CH-protonien signaali. Fenyyliryhmien protonien signaalit havaittiin kemiällisen siirtymän arvolla $\delta = 7.4$ ppm (multipletti). Signaalien integraalien suhteet tukevat esitettyjä assignointeja.

Difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeen (3) ^{31}P NMR-spektrissä (liite 3) havaittiin signaalit kemiällisen siirtymän arvoilla $\delta = \text{n. } 7.1$ ppm (tripletti, $J = 536$ Hz) ja $\delta = 27$ ppm (dubletti, $J = 545$ Hz). Kemiällisen siirtymän arvolla $\delta = 7.1$ ppm resonoi todennäköisesti reagoimattoman metyylihypofosforihapokkeen fosfori. Sen signaali on jakautunut tripletiksi, koska fosforiin on sitoutunut kaksi protonia. Kemiällisen siirtymän arvolla $\delta = 27$ ppm puolestaan resonoi difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeen fosfori, joka on jakautunut dubletiksi siihen kytkeytyneen yhden protonin vaikutuksesta. Protoni- ja fosforispektrien perusteella pääteltiin, että geelimäinen aine sisälsi haluttua difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapoketta (3) ja epäpuhtautena jonkin verran lähtöainetta. Geelimäistä ainetta käytettiin sellaisenaan synteessin seuraavassa vaiheessa.

Seuraavassa vaiheessa difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeesta (3) lohkaistiin vetybromidihapolla aminoryhmää suojannut difenyylimetyyliryhmä, jolloin saatiin aminometyylihypofosforihapoke (4).^{49,50} Sen rakenne on esitetty kuvassa 41. Aminometyylihypofosforihapoketta (4) valmistettaessa saantoprosentti oli 53 %.

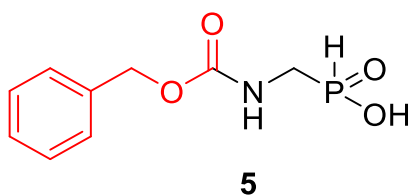


Kuva 41. Aminometyylihypofosforihapokkeen rakenne.

Aminometyylihypofosforihappo (**4**) kiteytyi heti etanolia lisättäessä, eikä muodostunut sakka liuennut etanoliin lämmittämisestä huolimatta poiketen kirjallisuudessa⁴⁹ kuvatusta. Aminometyylihypofosforihapoke (**4**) ei liuennut myöskään mihinkään käytettävissä olevaan NMR-liuottimeen, joten sen muodostuminen todettiin IR-spektroskopian avulla.

Aminometyylihypofosforihapokkeen (**4**) IR-spektrissä (liite 4) havaittiin primäärisen aminoryhmän N-H-venytysvärähdys aaltoluvulla 3000 cm⁻¹. Sen lisäksi spektrissä havaittiin alifaattisten C-H-sidosten venytysvärähdyksiä aaltoluvulla 2300 cm⁻¹. Näiden lisäksi sormenjälkialueella aaltoluvulla noin 1000 cm⁻¹ havaittiin P=O -sidoksen absorptio.

Aminometyylihypofosforihapokkeen aminoryhmä suojattiin bentsyyliklooriformiaatilla (CBz).⁵⁰ CBz-suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen (**5**) rakenne esitetään kuvassa 42. Bentsyyliklooriformiaatin lisäyksen jälkeen tuotteen oletettiin olevan suolamuodossaan liuenneena vesiliuokseen. Kun vesiliuos happamoitiin, olisi tuotteen pitänyt saostua, mutta niin ei tapahtunut. Niinpä orgaanisen faasin käsittelyä jatkettiin kirjallisuuden⁵⁰ mukaisesti liuottamalla se etyyliasetaatiiin ja haihduttamalla etyyliasetaatii pois. Tuotteen muodostuminen varmistettiin NMR-spektroskopiaa käyttäen. Tuotteen määrä oli kuitenkin niin vähäinen, ettei sitä voitu punnita.



Kuva 42. CBz-suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen rakenne. CBz-suojaryhmä esitetään kuvassa punaisella.

CBz-suojatusta aminometyylihypofosforihapokkeesta (**5**) mitattiin ¹H (liite 5) ja ¹³C NMR-spektrien lisäksi ¹H, ¹³C HSQC- ja ¹H, ¹³C HMBC-spektrit. ¹H NMR-spektrissä havaittiin runsaasti signaaleja. Spektrissä näkyviä mahdollisia epäpuhtauksia ovat muun muassa

reagoimattomat lähtöaineet, suojaamaton aminohypofosforihapoke ja isobutyliklooriformiaatti. Lisäksi spektrissä havaitaan liuottimien signaaleja. Runsaiden epäpuhtauksien vuoksi ^1H ja ^{13}C NMR-spektrien tulkitseminen oli haastavaa. Mitattuja korrelaatiosektrejä hyödyntämällä tuotteelle kuuluvat signaalit saatiin assignoitua.

Yhdisteen ^1H NMR-spektrissä havaitaan kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 3.9$ ppm (singletti) typen ja fosforin väliset CH_2 -protonit. Fenyyliryhmän ja hapen väliset CH_2 -protonit havaitaan kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 5.5$ ppm (singletti). Kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 7.5\text{--}8.0$ ppm (multipletti) havaitaan fenyyliryhmän protonit.

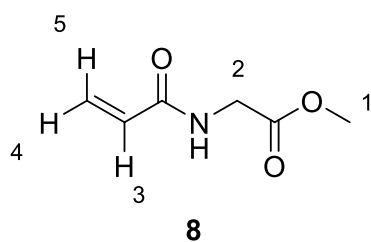
CBz-suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen (**5**) ^{13}C NMR-spektrissä kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 49.4$ ppm resonoi fosforin ja typen välinen hiili ja kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 67.8$ ppm hapen ja fenyyliryhmän välinen hiili. Aromaattisten hiilten signaalit resonivat kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta = 129\text{--}127$ ppm. Kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 156.4$ ppm resonoi amidiryhmän karbonyylihiili

CBz-suojatusta aminometyylihypofosforihapokkeesta (**5**) mitattiin myös profiilispektri massaspektrometrillä (liite 6). Se varmisti, että reaktiossa oli muodostunut haluttua tuotetta. Mittaus tehtiin positiivista ionisaatiota käyttäen. Liuottimena mittauksessa käytettiin asetoniiriiliä (ACN). Massaspekttrissä (liite 9) havaittiin ioni m/z -arvolla 292. Tämä vastaa CBz-suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen addukti-iona $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$.

7.2 *N*-akryloyylyglysinaatin valmistus

N-akryloyylyglysinaattia valmistettaessa akryylihapo aktivointiin ensin käyttäen seka-anhydridimenetelmää. Siinä aminoryhmä reagoi alkyliklooriformiaatin kanssa tertiäärisen amiiniemäksen läsnä ollessa muodostaen seka-anhydridin, joka sitten reagoi eteenpäin nukleofiilisen aminoryhmän kanssa.⁵²

Akryylihapo (**6**) aktivoitiin käyttäen isobutyliklooriformiaattia *N*-metyylimorfoliinin läsnä ollessa. Nukleofiilinä reaktiossa toimi metyylyglysinaattihydrokloridi (**7**).²⁴ *N*-akryloyylyglysinaatti (**8**) puhdistettiin pylväskromatografisesti käyttäen eluenttina etyyliasetaattia. Puhdistuksen jälkeen tuotetta saatiin 49 %. Kirjallisuudessa²⁴ kuvattua hidasta kiteytymistä ei havaittu. *N*-akryloyylyglysinaatin (**8**) rakenne on esitetty kuvassa 43.



Kuva 43. *N*-akryloyylylglysinaatin rakenne ja protonien numerointi.

N-akryloyylylglysinaatin (**8**) ^1H NMR-spektrissä (liite 7) havaittiin tuotteen signaalien lisäksi käytetystä liuottimesta aiheutuvia signaaleja. Kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 3.8$ ppm (singletti) havaitaan metoksyryhmän OCH_3 -1 protonien signaali. Typen viereiset CH_2 -2-protonit resonoivat kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 4.1$ ppm (singletti). CH -4 tai CH -5-protoni resonoi kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 5.8$ ppm (dubletin dubletti) ($J_1 = 9$ Hz, $J_2 = 2,7$ Hz). Kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 6.3$ – 6.4 ppm resonoivat protonit CH -3 ja CH -5 tai CH -4 (päällekk.). Liuottimena käytetyn etyyliasetaatin (EtOAc) resonanssisignaali havaitaan kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta = 1.4$ ppm (tripletti), $\delta = 2.1$ ppm (singletti) ja $\delta = 4.2$ ppm (kvartetti).

N-akryloyylylglysinaatin (**8**) ^{13}C NMR-spektrissä (liite 8) havaittiin tuotteen resonanssisignaalien lisäksi mahdollisesti epäpuhtauksista aiheutuvia signaaleja. Kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 42.3$ ppm havaitaan typen viereisen CH_2 -2 hiilen signaali. Metoksyryhmän OCH_3 -1 hiilen signaali resonoi kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = 52.9$ ppm. Kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta = 127.8$ ja 132.6 ppm resonoivat kaksoissidoshiilet $\text{CH}_2=$ ja $\text{CH}=\text{}$, siinä järjestyksessä. Kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta = 168.5$ ja 172.1 ppm resonoivat amidi- ja esteriryhmien karbonyylihiilet.

N-akryloyylylglysinaatista (**8**) mitattiin lisäksi $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (liite 9) ja $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC (liite 10) -spektrit joiden avulla assignoinnit varmistettiin. Yhdisteestä mitattiin myös $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC -spektri, jonka perusteella yhdisteen amidityypen kemiallinen siirtymä oli $\delta = -272.3$ ppm. ppm-Asteikko kalibroitettiin käyttäen ulkoisena standardina CH_3NO_2 :a, jonka kemiallinen siirtymä asetettiin vastaamaan arvoa $\delta = 0$ ppm.

N-akryloyylylglysinaatista (**8**) mitattiin myös profiilispektri massaspektrometrillä. Liuottimena mittauksessa käytettiin asetonitriiliä (ACN). Mittaus tehtiin negatiivista ionisaatiota käyttäen. Massaspektrissä (liite 11) havaittiin ioni m/z -arvolla 183. Se vastaa *N*-akryloyylylglysinaatin asetonitriiliadduktia $[\text{M}+\text{ACN}-\text{H}]^-$.

8 YHTEENVETO

Peptidoglykaani on rakenteeltaan toistuvarakenteinen, verkkomainen makromolekyyli, joka on tärkeä osa bakteerin soluseinää. Peptidoglykaania ja sen synteesiä solussa on tutkittu laajasti. Peptidoglykaani koostuu polysakkaridirungosta, kantapeptidistä ja peptidiristisilloista. Runko-osassa vuorottelevat sokerijohdannaiset *N*-asetyyli-glukosamiini ja *N*-asetyyli-muramiinihappo. Kantapeptidiketjut ovat kovalenttisesti kiinnittyneet MurNAc-yksikköön. Kantapeptidit liittävät polysakkaridirungot toisiinsa, joko suoraan tai peptideistä koostuvien ristisiltojen välityksellä.

Peptidoglykaanin biosynteesi on tarkoin säädelty ja siihen osallistuu useita entsyymejä. Se tapahtuu kolmessa vaiheessa ja sen reaktioita tapahtuu niin sytoplasmassa kuin solun sisä- ja ulkokalvollakin. Synteesin aikana olemassa olevaa peptidoglykaania joudutaan pilkkomaan ja samanaikaisesti uutta liitetään osaksi soluseinää. Solussa pilkkomisen hoitavat autolysiinientsyymit. Myös jotkut antibiootit hajottavat peptidoglykaania tai estävät sen biosynteesiä.

Usein peptidoglykaani eristetään ja hajotetaan liukeneviksi muropeptideiksi ennen sen tutkimista. HPLC- ja massaspektrometrisillä analyyseillä saadaan tietoa peptidoglykaanin rakenteesta. Tutkimuksilla voidaan selvittää muun muassa ristiinsitoutumisen aste tai keskimääräinen glykaaniketjun pituus. Kiinteän tilan NMR-spektroskopian avulla voidaan tutkia myös liukenematonta peptidoglykaania. Sen avulla voidaan saada tietoa muun muassa peptidoglykaanin kolmiulotteisesta rakenteesta. Eristämisen lisäksi peptidoglykaanifragmentteja on onnistuttu syntetisoimaan laboratoriossa.

Peptidoglykaanin tutkiminen ja sen biosynteesin ymmärtäminen on tärkeää pyrittäessä kehittämään uusia tehokkaampia antibiootteja. Bakteerien resistenttiys nykyisin käytössä oleville antibiooteille on kasvava ongelma. Peptidoglykaani ja sen biosynteesissä vaikuttavat entsyymit ovat hyviä antibioottien vaikutuskohteita, sillä niitä ei yleensä esiinny nisäkässoluissa. Siirtymätilojen tutkiminen auttaa ymmärtämään entsyymien reaktiomekanismeja. Niiden ymmärtäminen voi auttaa muun muassa uusien antibioottien kehittämisessä.

Kokeellisen osan tavoitteena oli valmistaa lysostafiinientsyymien transitiotila-analogin valmistamiseen tarvittavia lähtöaineita, suojattua aminometyylihypofosforihapoketta ja *N*-akryloyylylglyksinaattia. Molekyylejä valmistettiin useita kertoja. Synteesireittien optimoinnilla pyrittiin parantamaan saantoprosenttia ja sujuvoittamaan synteesin suoritusta. Synteesien

ongelmakohtiin perehtymällä ja niitä muokkaamalla synteesireittejä onnistuttiin hienosäätämään ja tuotteita saatiin valmistettua. Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistamisen aikana kohdattiin useita ongelmakohtia, kun taas *N*-akryloyylylglysinaatin synteesi onnistui suhteellisen vaivattomasti.

Väli- ja synteesituotteiden muodostuminen varmistettiin NMR-spektroskopiolla. Yhdestä välituotteesta mitattiin IR-spektri, sillä se ei liennut saatavilla oleviin liuottimiin. Lisäksi reaktioita seurattiin ohutkerroskromatografialla. Kaikista välituotteista ei pystytty laskemaan saantoprosentteja, sillä ne eivät kiteytyneet kunnolla. Saantoprosentit laskettiin vain tuotteista, joiden kiteytyminen oli täydellistä.

Sekä aminometyylihypofosforihapokkeen että *N*-akryloyylylglysinaatin synteesiä suoritettiin sekä kesällä että talvella. Kesän sää oli erittäin kuuma ja ilmankosteus oli korkea verrattuna talven lukemiin. Aminometyylihypofosforihapokkeen synteesissä on vaiheita, jotka ovat kosteudelle herkkiä, jolloin etenkin ilmankosteudella on voinut olla merkitystä synteesien saantoihin ja siihen, miten reaktiot onnistuivat eri synteesikerroilla.

Projekti osoittautui mielenkiintoiseksi ja haastavaksi. Työn tavoitteissa, suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja *N*-akryloyylylglysinaatin valmistamisessa, onnistuttiin. Synteesireittejä optimointiin ja sujuvoitettiin, joten niiden suorittaminen jatkossa onnistuu varmasti. Valmistettuja molekyyliä voidaan käyttää lysostafiinientsyymin siirtymätila-analogin, tetraglysiinihypofosforihapokkeen, valmistamiseen.

Jatkossa siirtymätila-analogin valmistamista voidaan jatkaa liittämällä yhteen aminometyylihypofosforihapoke ja *N*-akryloyylylglysinaatti. Jos transiitotila-analogia saadaan valmistettua, voidaan sitä käyttää lysostafiinientsyymin toiminnan tutkimiseen. Sen avulla voidaan muun muassa selvittää substraatin sitoutumista entsyymiin sekä entsyymin konformaation muutosta substraatin sitoutumisen aikana. Saadun tiedon avulla voidaan mahdollisesti kehittää lysostafiinin tavoin toimivia antibiootteja.

9 SYNTEESIOHJEET

Tässä luvussa esitetään valmistettujen molekyylien valmistus vaiheittain. Valmistetut molekyylit olivat CBz-suojattu aminometyylihypofosforihapoke ja *N*-akryloyyliyglysinaatti.

9.1 Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus

1,3,5-Tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaanin valmistamiseksi reaktiokolviin pipetoitiin bentshydriyliamiinia (80 mmol, 14,66 g, 13,79 ml) ja formaldehydiä (80 mmol, 2,40 g), joka liuotettiin tolueniin (64 ml). Refluksoinnin aikana reaktioseoksesta poistettiin vettä atseotrooppisella tislauksella. Refluksointia jatkettiin, kunnes veden tislautuminen loppui (n. 3 h). Kiteytynyt 1,3,5-tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaani suodatettiin, kuivattiin ja punnittiin. Saanto oli 15,34 g (26,1 mmol, 33 %). ¹H NMR (300 MHz in CDCl₃): 2.4 (2H, s), 4.7 (2H, s), 7.1 (C_{arom}, m) ja 7.3 (C_{arom}, m).

Vedetöntä hypofosforihapoketta valmistettiin vakuumitislamalla vettä pois kaupallisesti saatavilla olevasta hypofosforihapokkeen 50 % vesiliuoksesta. Hypofosforihapokkeesta ei saatu täysin kuivaa, mutta aikaisempien kokeilujen perusteella todettiin, että synteesi ei vaadi täysin kuivia olosuhteita onnistuakseen.

Tämän jälkeen hypofosforihapoke (0,14 mol) liuotettiin kuivaan tetrahydrofuraaniin (THF) (33 ml) ja kuivaan tolueniin (33 ml). Liuos jäädytettiin jäävesihauteella noin 5 °C:n lämpötilaan, minkä jälkeen reaktioseokseen lisättiin trimetyyliortoformiaattia (0,55 mol, 60 ml) tiputussuppilosta. Tämän jälkeen reaktioseosta sekoitettiin tunti jäävesihauteessa, ja sekoitusta jatkettiin yön yli huoneenlämmössä.

Seuraavaksi reaktiokolviin lisättiin vedetöntä metanolia (28 ml) ja aiemmin valmistettu 1,3,5-tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaani (0,053 ml, 10,26 g). Seosta refluksoitii noin kolme tuntia typen alla. Kiinteät lähtöaineet suodatettiin pois ja suodos haihdutettiin kuiviin. Kolviin jäänyt difenyylimetyyliaminometyylihypofosfinaatti oli keltaista ja öljymäistä. Saanto oli 25,90 g (99,1 mmol). ¹H NMR (300 MHz in CDCl₃): 3.4 (2H, s), 4.9 (2H, s), 7.4 (C_{arom}, m). ³¹P NMR (121.5 MHz in CDCl₃): 8.1 (t).

Edellisessä vaiheessa saatu difenyylimetyyliaminometyylihypofosfinaatti liuotettiin 20 ml:aan 62 % HBr:a. Kolviin lisättiin myös muutama millilitra vettä. Reaktioseosta refluksoitii noin kolme tuntia, kunnes kaksi faasia erottui. Suurin osa nesteestä haihdutettiin pois, minkä jälkeen

kolviin lisättiin vettä. Vesifaasia pestiin kolme kertaa eetterillä. Vesifaasi haihdutettiin kuiviin ja öljymäiseen jäännökseen lisättiin etanolia. Tämän seurauksena tuote alkoi kiteytyä. Tuotteen annettiin kiteytyä yön yli. Sakka suodatettiin ja pestiin etanolilla ja eetterillä. Aminometyylihypofosforihapokkeen saanto oli 4,85 g (53 %). Tuotteen puhtaus varmistettiin IR-spektroskopiolla.

Edellisessä vaiheessa valmistetun aminometyylihypofosforihapokkeen (0,041 mol, 3,72 g) joukkoon lisättiin 40 ml 0,86 M (2,34 ekv.) K_2CO_3 -liuosta. Seos jäähdytettiin 0 °C:een ja joukkoon lisättiin 7,67 ml bentsyyliklooriformiaattia (0,054 mol, 9,16 g) 0,2 ml:n erissä. Seoksen annettiin lämmitä huoneenlämpöön ja jätettiin sekoittumaan yön yli. Seuraavana päivänä kolviin lisättiin vielä kaksi kertaa 0,5 mooliekvivalenttia bentsyyliklooriformiaattia. Sekoitusta jatkettiin tämän jälkeen vielä tunti.

Kolviin lisättiin 35 ml vettä. Vesifaasia pestiin etyyliasetaatilla (3 x 30 ml) ja tolueenilla (1 x 30 ml), minkä jälkeen liuos kaadettiin jäiden (130 g) sekaan ja happamoitiin 1 M HCl:llä. Koska tuote ei kiteytynyt, pyrittiin se uuttamaan etyyliasetaattiin (3 x 100 ml). Yhdistetyt etyyliasetaattiliuokset kuivattiin $MgSO_4$:lla ja liuotin haihdutettiin pois. Tuotteen muodostuminen varmistettiin NMR-spektroskopian avulla. Saatu määrä oli niin pieni, ettei sitä pystytty punnitsemaan. 1H NMR (300 MHz in $CDCl_3$): 3.9 (2H, s), 5.5 (2H, s), 7.5–8.0 (5H, m). MS: m/z 292 [$M+ACN+Na$]⁺.

9.2 *N*-akryloyyliyglysinaatin valmistus

Akryylihappo (0,02 mol, 1,44g, 1,37 ml) liuotettiin 20 ml:aan kuivattua THF:a 3-kaulakolvissa. Seos jäähdytettiin jäävesisuolahauteella 0 °C:seen. Kolviin lisättiin *N*-metyylimorfoliini (0,21 mol, 2,12 g, 2,31 ml) ja isobutyliklooriformiaatti (0,21 mol, 2,87 g, 2,75 ml). Seosta sekoitettiin tunti 0 °C:ssa., minkä jälkeen lisättiin uudestaan *N*-metyylimorfoliini (0,21 mol, 2,12 g, 2,31 ml) ja metyyliyglysinaattihydrokloridi (0,02 mol, 2,51 g) sekoitettuna 10 ml:aan kuivaa THF:a. Seos jätettiin sekoittumaan yön yli.

Muodostunut sakka suodatettiin. Suodos haihdutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin pylväskromatografiolla (EtOAc). Kirkasta öljymäistä tuotetta saatiin 1,4 g (9,8 mmol, 49 %). NMR-spektrien perusteella tuotteen joukossa oli liuottimena käytettyä etyyliasetaattia. 1H NMR (300 MHz in MeOD): δ = 3.8 (3H, s), 4.1 (2H, s), 5.8 (1H, dd, J_1 = 9 Hz, J_2 = 2.7 Hz),

6.3–6.4 (2H, m) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz in MeOD): $\delta = 42.3, 52.6, 127.8, 132.6, 168.5, 172.1$ ppm. MS: m/z 183 $[\text{M}+\text{ACN}-\text{H}]^-$.

KIRJALLISUUSLUETTELO

1. Madingan, M. T.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Sattley, W. M. ja Stahl, D. A., *Brock Biology of Microorganisms*, 14. painos, Pearson, Lontoo, Yhdistynyt kuningaskunta, 2009.
2. Vollmer, W.; Blanot, D. ja De Pedro, M. A., Peptidoglycan structure and architecture, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 149–167.
3. Typas, A.; Banzhaf, M.; Gross, C. A. ja Vollmer, W., From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2012**, *10*, 123–136.
4. Vollmer, W.; Joris, B.; Charlier, P. ja Foster, S., Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 259–286.
5. Lovering, A. L.; Safadi, S. S. ja Strynadka, N. C. J., Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly, *Annu. Rev. Biochem.*, **2012**, *81*, 451–478.
6. Moynihan, P. J.; Sychantha, D. ja Clarke, A. J., Chemical biology of peptidoglycan acetylation and deacetylation, *Bioorg. Chem.*, **2014**, *54*, 44–50.
7. Vollmer, W., Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 287–306.
8. Singh, S. K.; Parveen, S.; SaiSree, L. ja Reddy, M., Regulated proteolysis of a cross-link-specific peptidoglycan hydrolase contributes to bacterial morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2015**, *112*, 10956–10961.
9. Barreteau, H.; Kovač, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S. ja Blanot, D., Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 168–207.
10. Hochuli, M.; Patzelt, H. ja Szyperski, T., Amino Acid Biosynthesis in the Halophilic Archaeon *Halorcula hispanica*, *J. Bacteriol.*, **1999**, *181*, 3226.
11. Velasco, A. M.; Leguina, J. I. ja Lazcano, A., Molecular evolution of the lysine biosynthetic pathways, *J. Mol. Evol.*, **2002**, *55*, 445–459.
12. Van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Kol, M.; Swiezewska, E.; De Kruijff, B. ja Breukink, E., Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes, *Mol. Microbiol.*, **2007**, *64*, 1105–1114.
13. Sham, L.; Butler, E.; Lebar, M. D.; Kahne, D.; Bernhardt, T. G. ja Ruiz, N., MurJ is the flippase of lipid-linked precursor for peptidoglycan biogenesis, *Science (80-.)*, **2014**, *345*, 220–222.
14. Perlstein, D. L.; Zhang, Y.; Wang, T. S.; Kahne, D. E. ja Walker, S., The direction of glycan chain elongation by peptidoglycan glycosyltransferases, *J. Am. Chem. Soc.*,

- 2007, 129, 12674–12675.
15. Garner, E. C.; Bernard, R.; Wang, W.; Zhuang, X.; Rudner, D. Z. ja Mitchison, T., Coupled, Circumferential Motions of the Cell Wall Synthesis Machinery and MreB Filaments in *B. subtilis*, **2011**, 333, 222–226.
 16. Alén, R., *Kokoelma orgaanisia yhdisteitä - Ominaisuudet ja käyttökohteet*, Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä, Suomi, 2009.
 17. Schaub, R. E. ja Dillard, J. P., Digestion of Peptidoglycan and Analysis of Soluble Fragments, *Bio-protocol*, **2017**, 7, 2438.
 18. Kühner, D.; Stahl, M.; Demircioglu, D. D. ja Bertsche, U., From cells to muropeptide structures in 24 h: Peptidoglycan mapping by UPLC-MS, *Sci. Rep.*, **2014**, 4, 1–7.
 19. Campbell, M. K. ja O. Farrell, S., *Biochemistry*. 8. painos, Cengage Learning, Boston, Yhdysvallat, 2014.
 20. Pronase from *Streptomyces griseus*,
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/pronro?lang=fi®ion=FI>, Merck (20.3.2019).
 21. Mutanolysin from *Streptomyces globisporus* ATCC 21553,
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m9901?lang=fi®ion=FI>, Merck (20.3.2019).
 22. Rau, A.; Hogg, T.; Marquardt, R. ja Hilgenfeld, R., A new lysozyme fold. Crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 Å resolution, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 31994–31999.
 23. Sabala, I.; Jagielska, E.; Bardelang, P. T.; Czapinska, H.; Dahms, S. O.; Sharpe, J. A.; James, R.; Than, M. E.; Thomas, N. R. ja Bochtler, M., Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*, *FEBS J.*, **2014**, 281, 4112–4122.
 24. Firczuk, M.; Mucha, A. ja Bochtler, M., Crystal structures of active LytM, *J. Mol. Biol.*, **2005**.
 25. Bastos, M. do C. de F.; Coutinho, B. G. ja Coelho, M. L. V., Lysostaphin: A staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications, *Pharmaceuticals*, **2010**, 3, 1139–1161.
 26. Khai, N.; Eberhardt, A.; Vollmer, D.; Kern, T.; Bougault, C.; Tomasz, A.; Simorre, J. ja Vollmer, W., Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*, *Anal. Biochem.*, **2012**, 421, 657–666.
 27. Yang, H.; Singh, M.; Kim, S. J. ja Schaefer, J., Characterization of the tertiary structure of the peptidoglycan of *Enterococcus faecalis*, *Biochim. Biophys. Acta* -

- Biomembr.*, **2017**, *1859*, 2171–2180.
28. Bougault, C.; Ayala, I.; Vollmer, W.; Simorre, J. P. ja Schanda, P., Studying intact bacterial peptidoglycan by proton-detected NMR spectroscopy at 100 kHz MAS frequency, *J. Struct. Biol.*, **2018**.
 29. Desmarais, S. M.; Pedro, M. A. De; Cava, F. ja Casey, K., Peptidoglycan as its peaks: how chromatographic analyses can reveal cell-wall structure and assembly, *Mol. microbiol.*, **2013**, *89*, 1–13.
 30. Desmarais, S. M.; Tropini, C.; Miguel, A.; Cava, F.; Monds, R. D.; De Pedro, M. A. ja Huang, K. C., High-throughput, highly sensitive analyses of bacterial morphogenesis using ultra performance liquid chromatography, *J. Biol. Chem.*, **2015**, *290*, 31090–31100.
 31. Zhang, Q.; Zhang, X.; Wang, P.; Li, D.; Chen, G.; Gao, P. ja Wang, L., Determination of the action modes of cellulases from hydrolytic profiles over a time course using fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis, *Electrophoresis*, **2015**, *36*, 910–917.
 32. Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*, 8. painos, W. H. Freeman and Company, New York, Yhdysvallat, 2010.
 33. Jaarinen, S. ja Niiranen, J., *Laboratorion analyysitekniikka*, Edita Prima Oy, Helsinki, Suomi, 2008.
 34. Raymond, J. B.; Price, N. P. ja Pavelka, M. S., A method for the enzymatic synthesis and HPLC purification of the peptidoglycan precursor UDP-N-acetylmuramic acid, *FEMS Microbiol. Lett.*, **2003**, *229*, 83–89.
 35. Nadler, W. M.; Waidelich, D.; Kerner, A.; Hanke, S.; Berg, R.; Trumpp, A. ja Rösli, C., MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification, *J. Proteome Res.*, **2017**, *16*, 1207–1215.
 36. Bern, M.; Beniston, R. ja Mesnage, S., Towards an automated analysis of bacterial peptidoglycan structure, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, *409*, 551–560.
 37. Simpson, J. H., *Organic Structure Determination using 2-D NMR Spectroscopy*, 1. painos, Elsevier Inc., London, 2008.
 38. Schmidt-Rohr, K. ja Spiess, H. W., *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Academic Press, London, 1994.
 39. Romaniuk, J. A. H. ja Cegelski, L., Bacterial cell wall composition and the influence of antibiotics by cell-wall and whole-cell NMR, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **2015**, *370*, 20150024.
 40. Kim, S. J.; Chang, J. ja Singh, M., Peptidoglycan Architecture of Gram-positive

- Bacteria by Solid-State NMR, *Biochim Biophys Acta*, **2015**, *1*, 350–362.
41. Inamura, S.; Fujimoto, Y.; Kawasaki, A.; Shiokawa, Z.; Woelk, E.; Heine, H.; Lindner, B.; Inohara, N.; Kusumoto, S. ja Fukase, K., Synthesis of peptidoglycan fragments and evaluation of their biological activity, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 232–242.
 42. Mesnage, S.; Dellarole, M.; Baxter, N. J.; Rouget, J. B.; Dimitrov, J. D.; Wang, N.; Fujimoto, Y.; Hounslow, A. M.; Lacroix-Desmazes, S.; Fukase, K.; Foster, S. J. ja Williamson, M. P., Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains, *Nat. Commun.*, **2014**, *5*, 4269.
 43. Fujimoto, Y.; Konishi, Y.; Kubo, O.; Hasegawa, M.; Inohara, N. ja Fukase, K., Synthesis of crosslinked peptidoglycan fragments for investigation of their immunobiological functions, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 3631–3634.
 44. Trost, B. M.; Kalnmals, C. A.; Tracy, J. S. ja Bai, W. J., Highly Chemoselective Deprotection of the 2,2,2-Trichloroethoxycarbonyl (Troc) Protecting Group, *Org. Lett.*, **2018**, *20*, 8043–8046.
 45. Inamura, S.; Fukase, K. ja Kusumoto, S., Synthetic study of peptidoglycan partial structures. Synthesis of tetrasaccharide and octasaccharide fragments, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 7613–7616.
 46. Schramm, V. L., Enzymatic Transition States and Transition State Analog Design, *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, *67*, 693–720.
 47. Silverman, R. B.; Holladay, M. W. ja Silverman, R. B., *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier, San Diego, Yhdysvallat, 2014.
 48. Cristau, H. J.; Coulombeau, A.; Genevois-Borella, A. ja Pirat, J. L., A convenient one-pot synthesis of phosphino-dipeptide analogs, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 4491–4494.
 49. Baylis, E. K.; Campbell, C. D. ja Dingwall, J. G., -Aminoalkylphosphonous Acids. Part 1. Isosteres of the Protein Amino Acids, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1984**, *1*, 2845–2853.
 50. Buchardt, J.; Ferreras, M.; Krog-Jensen, C.; Delaissé, J. M.; Foged, N. T. ja Meldal, M., Phosphinic peptide matrix metalloproteinase-9 inhibitors by solid-phase synthesis using a building block approach, *Chem. - A Eur. J.*, **1999**, *5*, 10, 2877–2884.
 51. Cristau, H. J.; Coulombeau, A.; Genevois-Borella, A.; Sanchez, F. ja Pirat, J. L., Preparation of phosphinodipeptide analogs as building blocks for pseudopeptides synthesis, *J. Organomet. Chem.*, **2002**, 643–644, 381–391 .
 52. Chen, F. M. F.; Lee, Y.; Steinauer, R. ja Benoiton, N. L., Mixed anhydrides in peptide synthesis. A study of urethane formation with a contribution on minimization of racemization, *Can. J. Chem.*, **1986**, *65*, 613–618.

LIITTEET

LIITE 1 1,3,5-Tris(difenyylimetyyli)-1,3,5-triatsinaanin ^1H NMR-spektri

LIITE 2 Difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeen ^1H NMR-spektri

LIITE 3 Difenyylimetyyliaminometyylihypofosforihapokkeen ^{31}P NMR-spektri

LIITE 4 Aminometyylihypofosforihapokkeen IR-spektri

LIITE 5 Cbz-suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ^1H NMR-spektri

LIITE 6 Cbz-suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen massaspektri

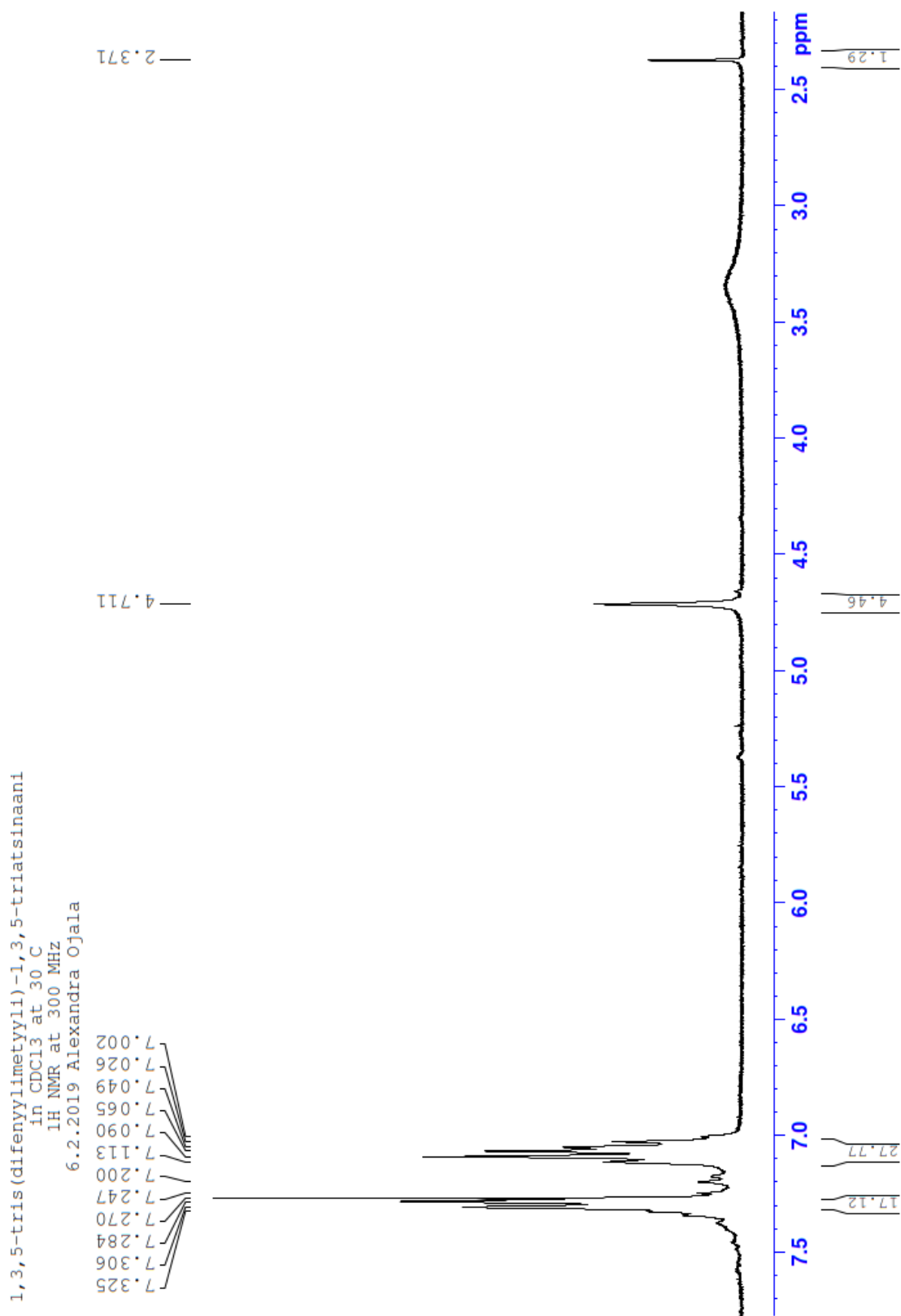
LIITE 7 *N*-akryloyylylglysinaatin ^1H NMR-spektri

LIITE 8 *N*-akryloyylylglysinaatin ^{13}C NMR-spektri

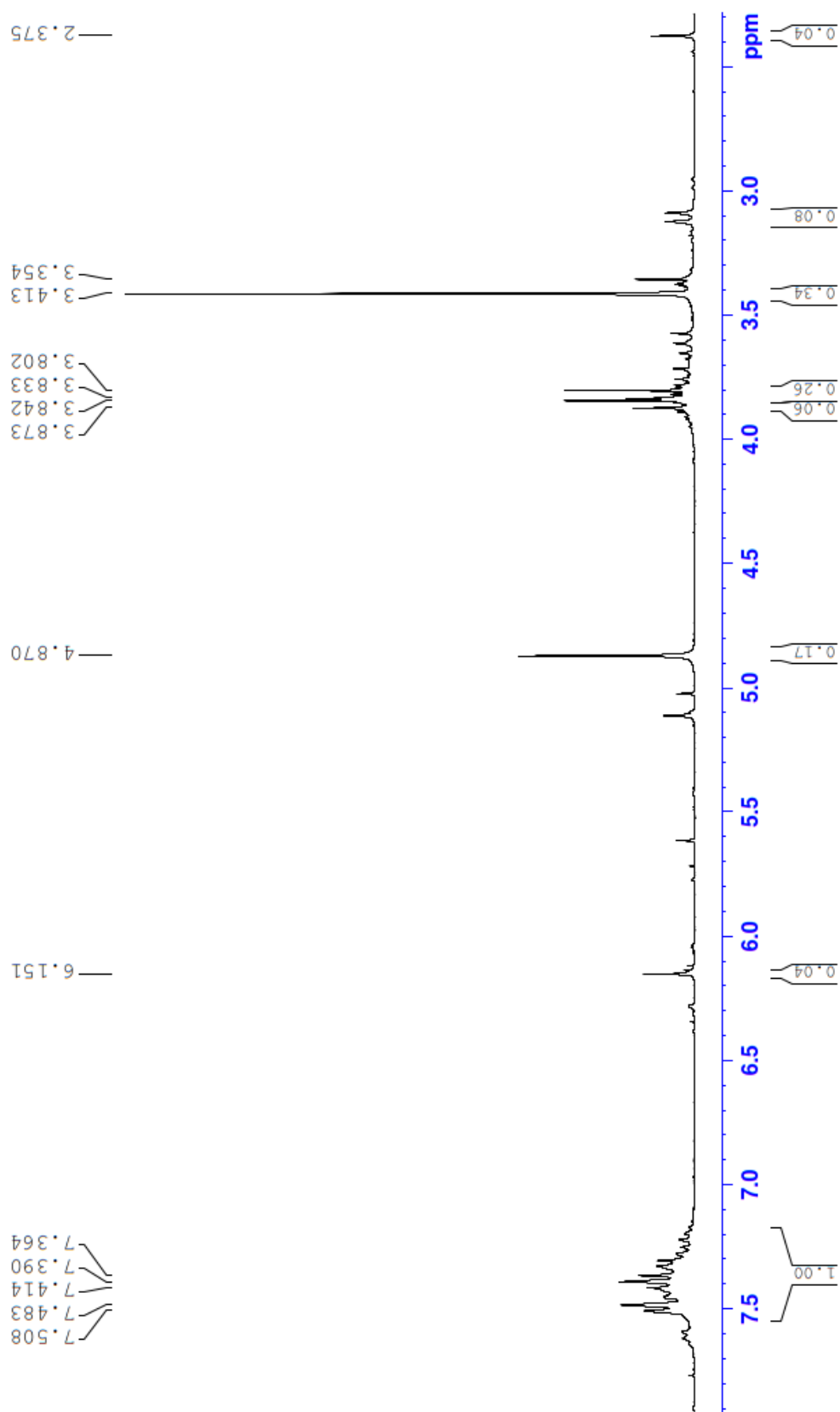
LIITE 9 *N*-akryloyylylglysinaatin ^1H , ^{13}C HSQC 2-D NMR-spektri

LIITE 10 *N*-akryloyylylglysinaatin ^1H , ^{13}C HMBC 2-D NMR-spektri

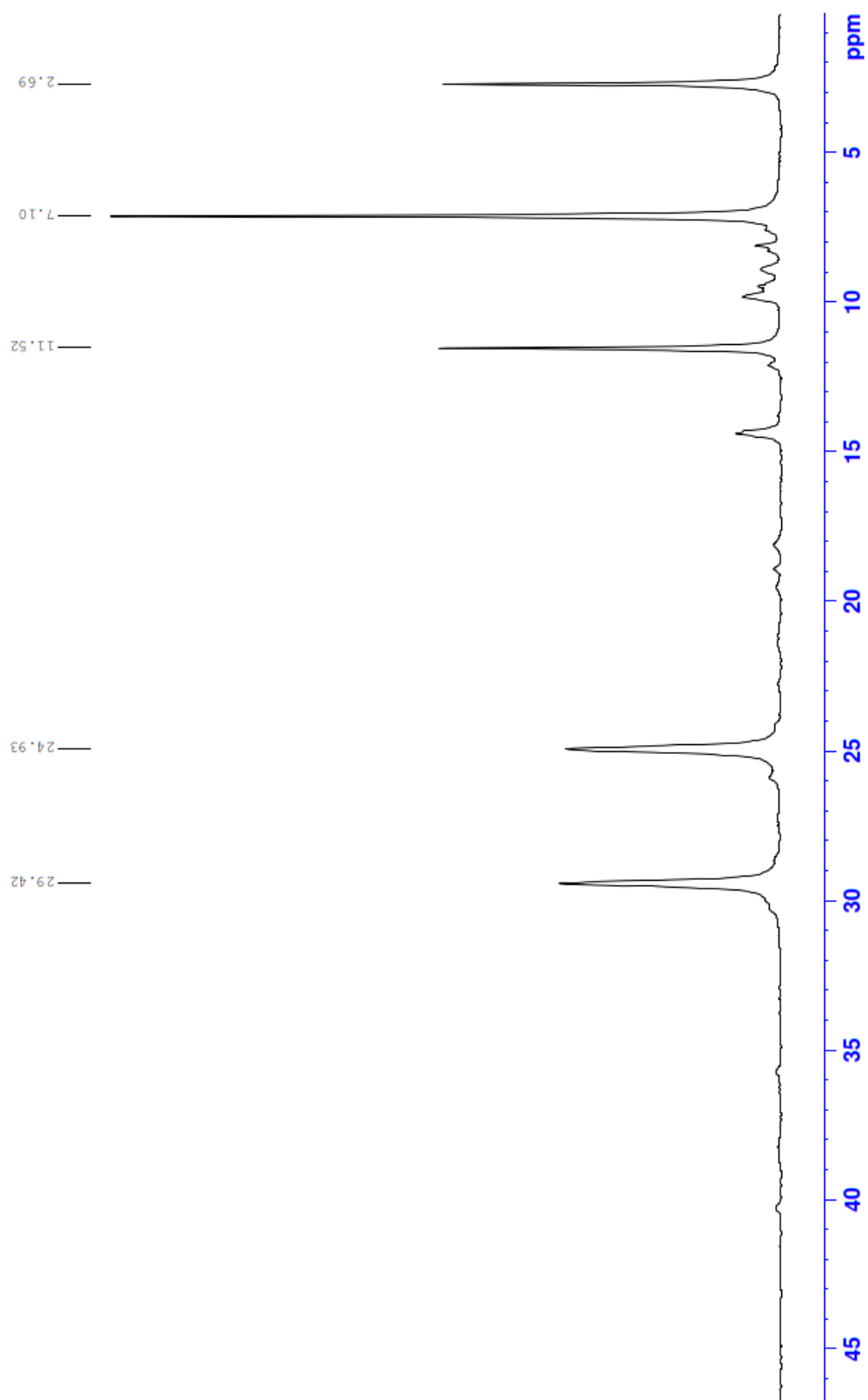
LIITE 11 *N*-akryloyylylglysinaatin massaspektri

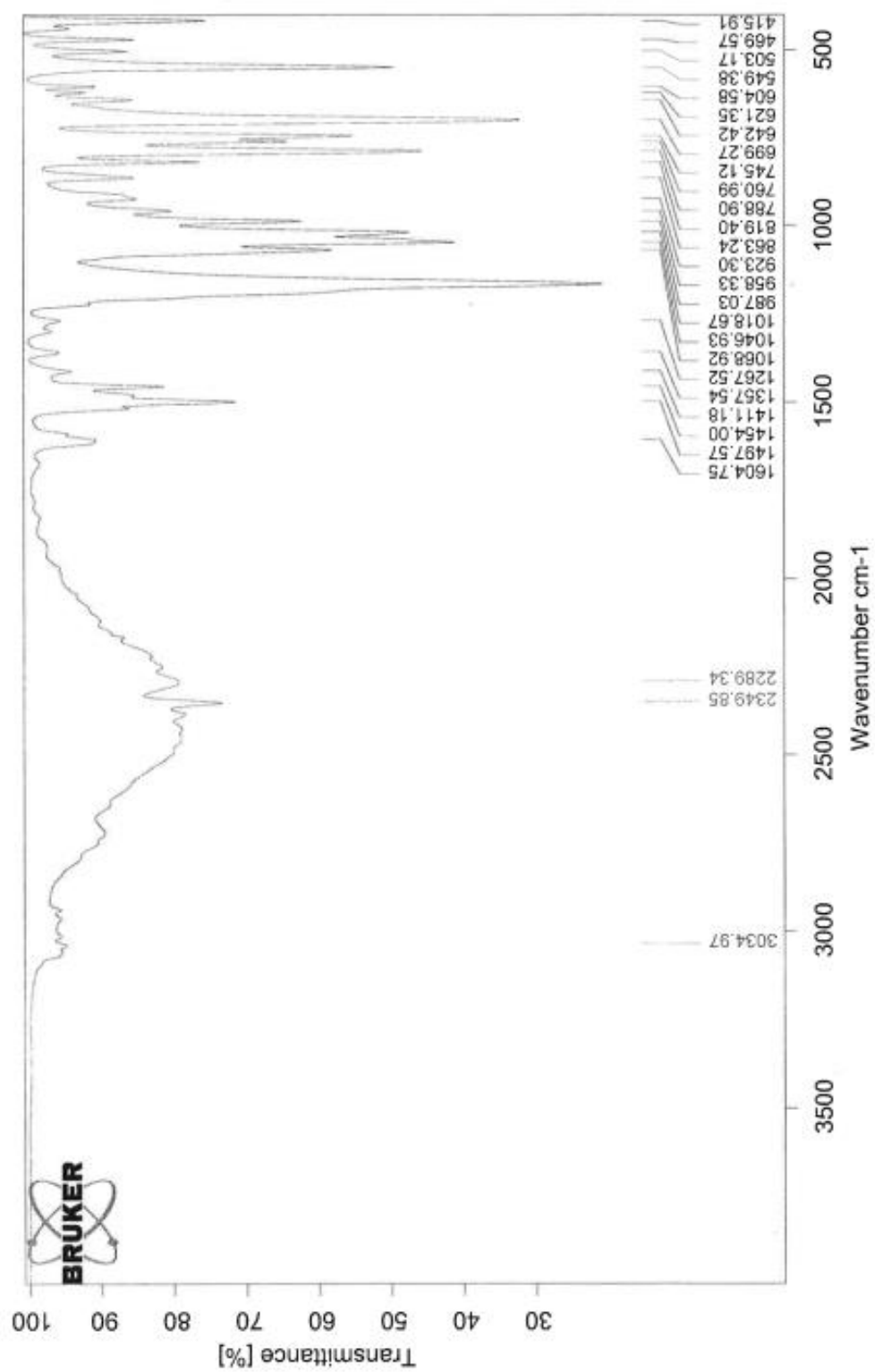


Aminodifenylimetyylihyppofosforihapoke
 in CDCl₃ at 30 C
¹H NMR at 300 MHz
 12.2.2019 Alexandra Ojala

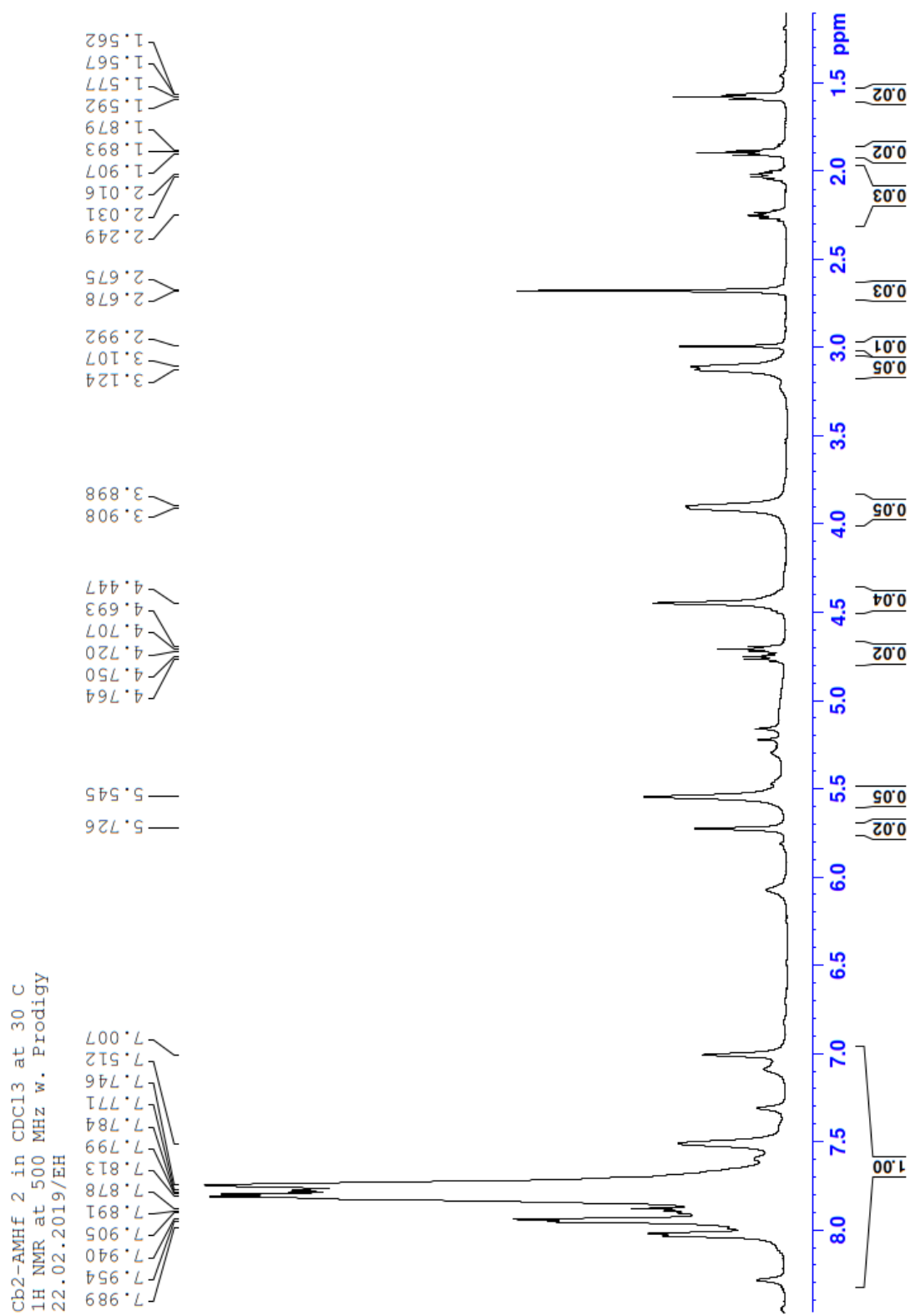


diphenylmethylaminophosphonousacid
in CDCl₃ at 30 C
31P NMR at 121.5 MHz
8.2.2018 Alexandra Ojala



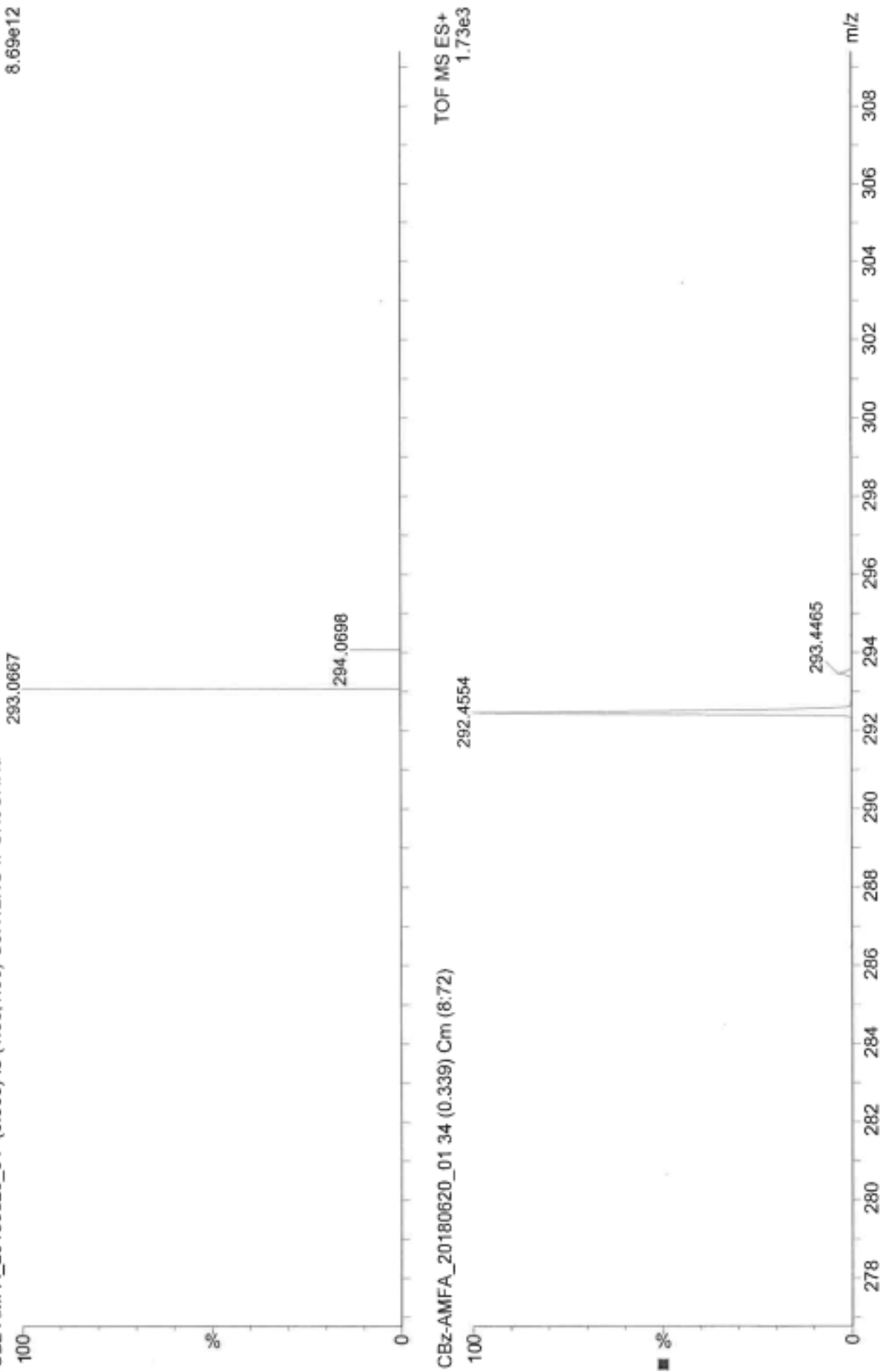


D:\Temp\Student_ATR\Kemia aineopinnot\1108.0 Aminometyylihypposforihapoke Alexandra Ojala 21/02/2019

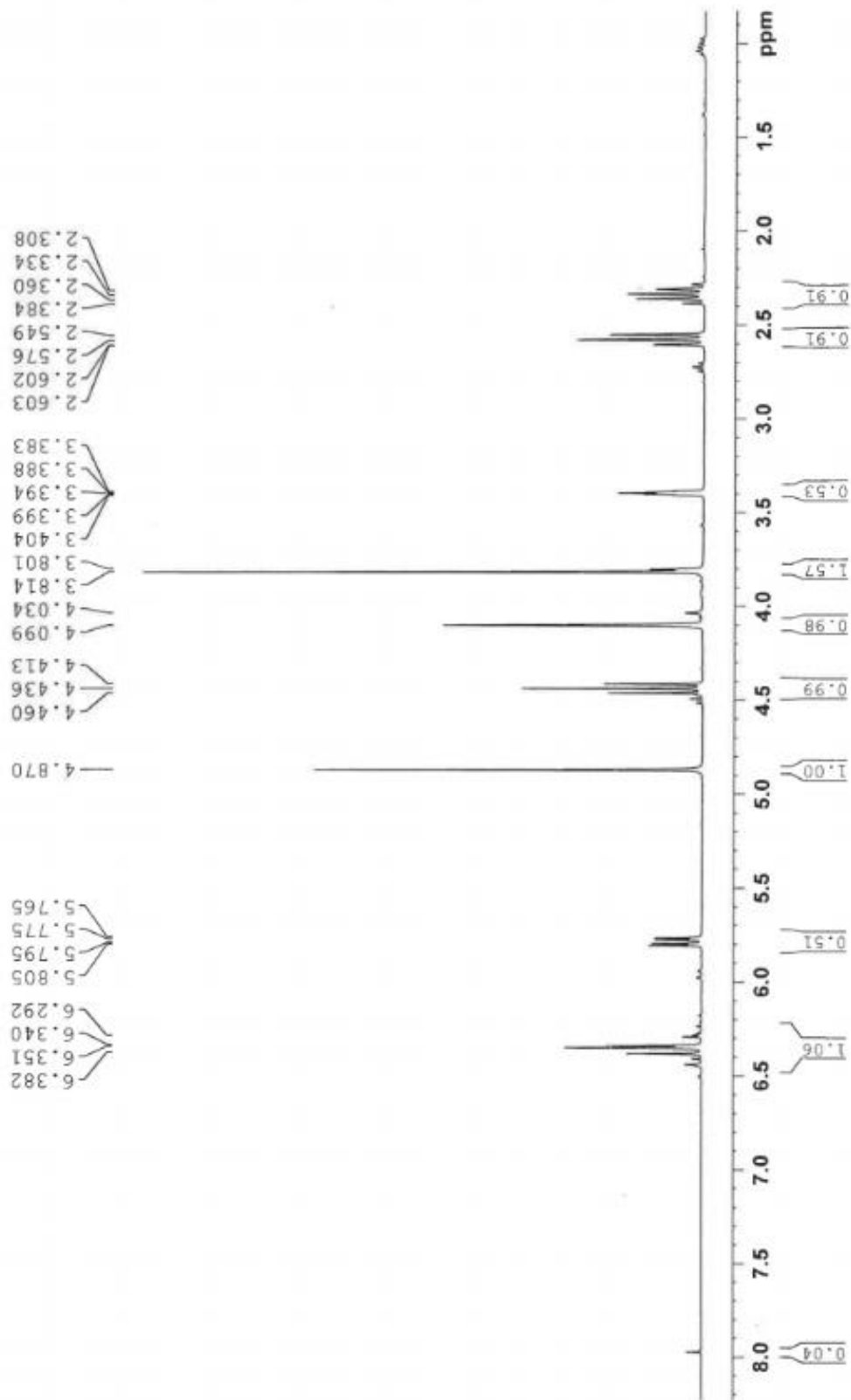


20-Jun-2018
TOF MS ES+
8.69e12

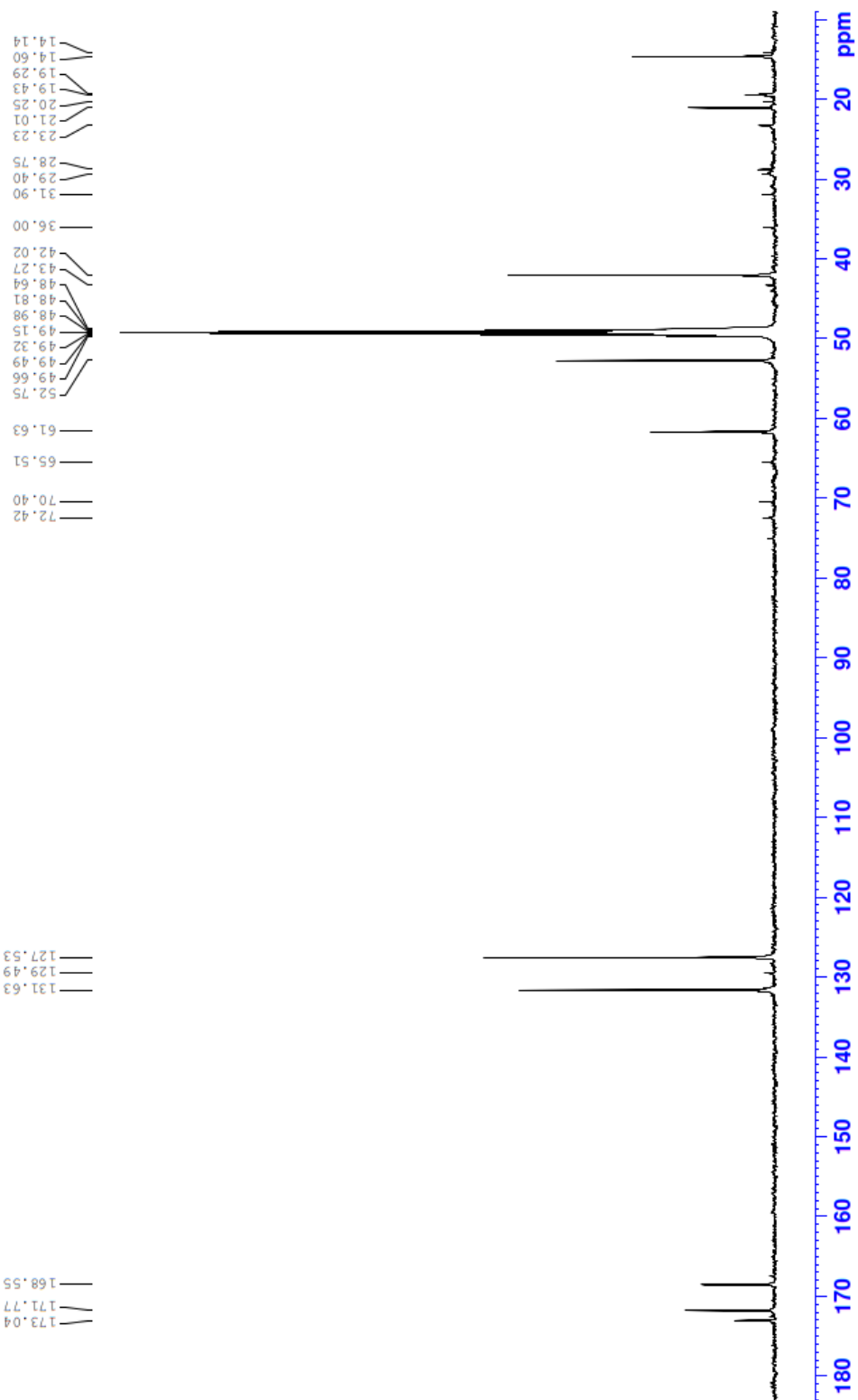
CBz-AMFA, 2nd dil. in MeCN, Pos. Mode, Stock in CDC13
CBz-AMFA_20180620_01 (0.009) Is (1.00,1.00) C9H12NO4PCH3CNNa



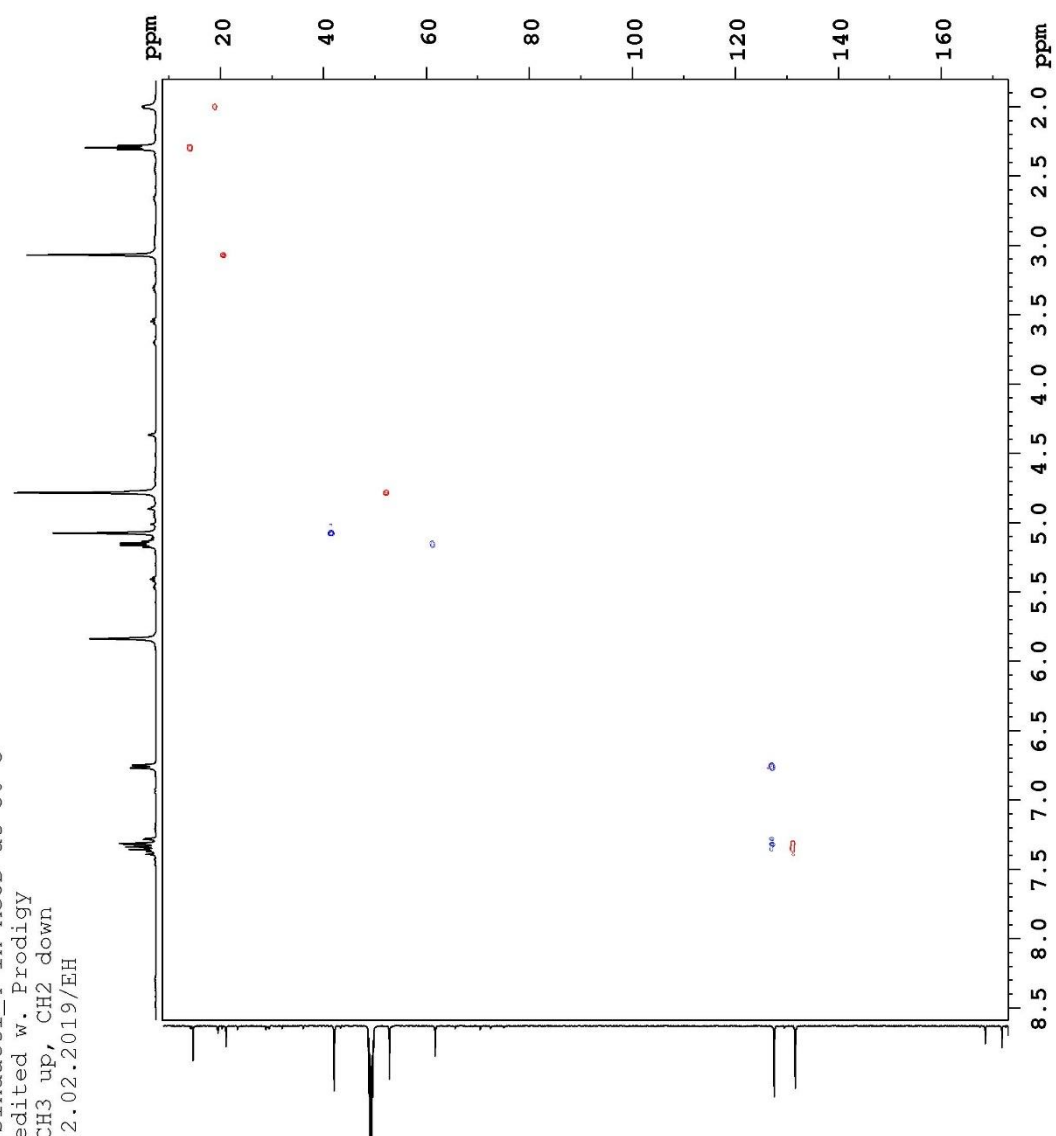
N-acryloyl glycinate 4
 in MEOD at 30 C
 1H NMR at 300 MHz
 30.5.2018 Alexandra Ojala



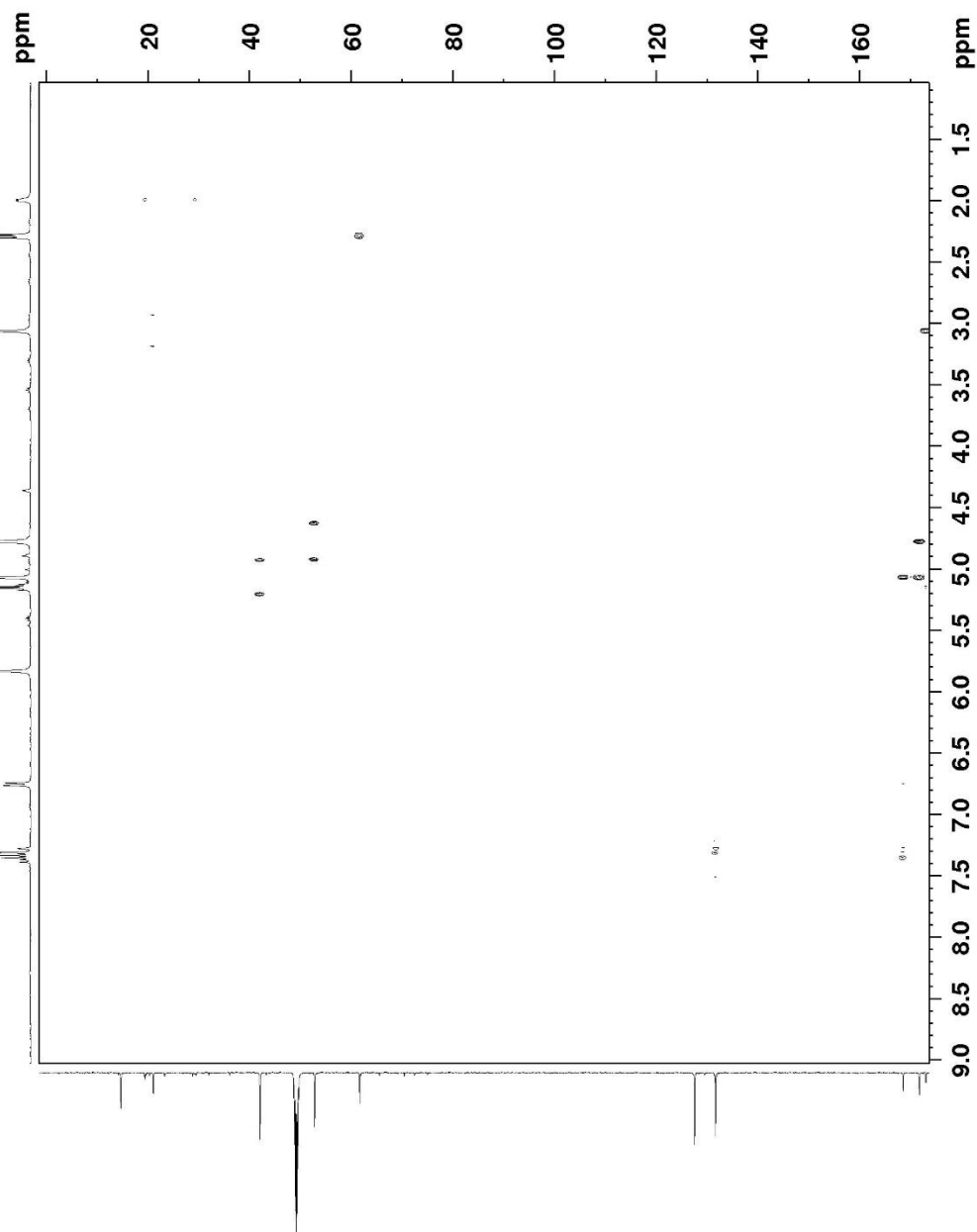
N-Akrylolylyllysinaatti_4 in MeOD at 30 C
 13C NMR at 126 MHz w. Prodigy
 S/N = 19
 22.02.2019/EH



N-Akrylolylyllysinaatti_4 in MeOD at 30 C
 HSQC edited w. Prodigy
 CH, CH3 up, CH2 down
 22.02.2019/EH



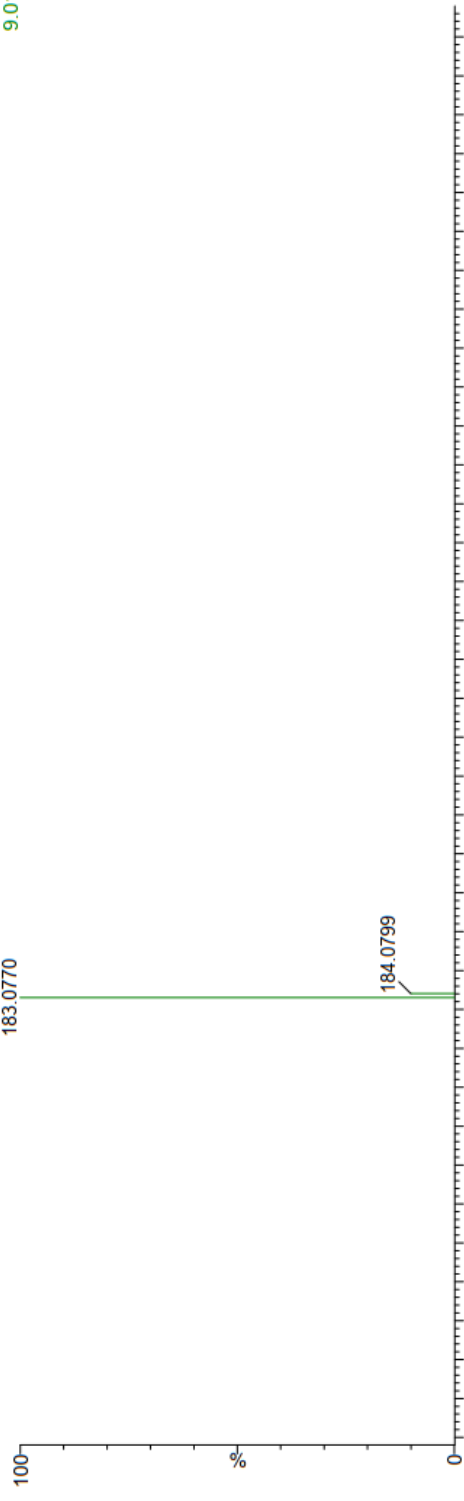
N-Akryloyllylilysinaatti_4 in MeOD at 30 C
 HMBC w. Prodigy
 22.02.2019/EH



29-Mar-2019
TOF MS ES-
9.01e12

Akryloylyglysinaatti, ACN

AcrGly_20190329_01 (0.009) is (1.00, 1.00) C6NO3H8CH3CN
183.0770



TOF MS ES-
2.05e3

AcrGly_20190329_01 66 (0.660) Cm (33.97)

