

# **Bifunktionaalisten reagenssien synteesi, ominaisuudet ja sovellukset**

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Orgaanisen kemian osasto

12.5.2006

Kaisa Helttunen

## TIIVISTELMÄ

Bifunktionaaliset reagenssit ovat yhdisteitä, jotka sisältävät kaksi funktionaalista ryhmää ja niitä yhdistävän käsivarren. Bifunktionaalisia reagensseja eli linkkereitä käytetään liittämään erilaisia rakenteita, kuten proteiineja, kovalenttisesti toisiinsa. Proteiinikemiassa käytettävissä yhdisteissä yleisiä funktionaalisia ryhmiä ovat *N*-hydroksisukkinimidiesterit (NHS-esterit), atsidit, imidoesterit eli imidaatit ja maleimidit. NHS-esterit syntetisoidaan reaktiolla *N*-hydroksisukkinimidin ja disykloheksyyli-karbodi-imidin kanssa, imidoesterit reaktiolla alkoholin ja HCl-kaasun kanssa, ja aryylatsidit diatsotointireaktiolla ja substituutiolla natriumatsidin kanssa. Bifunktionaalisten reagenssien käyttökohteita ovat erilaiset konjugaatit, molekyylien kovalenttinen kiinnittäminen pintoihin ja proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkiminen. Linkkerin ominaisuudet, kuten funktionaalisten ryhmien reaktiospesifisyys ja molekyylin vesi- tai rasvaliukoisuus, vaikuttavat sopivan reagenssin valintaan.

Kokeellisessa osassa syntetisoitiin käsivarrellista HABA:a eli 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappoa, joka konjugoitiin naudan seerumialbumiiniin. HABA-BSA-konjugaatin avulla tutkittiin avidiinin ja sen mutatoituneen muodon HABA-affiniteettiä, ja havaittiin HABA-BSA-konjugaatin sitoutuvan spesifisesti avidiiniin.

Erikoistyön toisessa osassa tutkittiin uutta kanan (*Gallus gallus*) biotiinia sitovaa proteiinia, BBP-A:ta ja verrattiin sen ominaisuuksia tunnettuun, hyvin vahvasti biotiinia sitovaan proteiiniin, avidiiniin. BBP-A:n havaittiin olevan tetrameerinen proteiini, jonka molekyylipaino oli 56 kDa eli samaa suuruusluokkaa kuin avidiinilla. Lisäksi hyönteissoluissa tuotettu BBP-A oli *N*-glykosyloitu kuten avidiinikin. BBP-A:n biotiiniaffiniteetti oli selvästi heikompi kuin avidiinilla, esimerkiksi 25 °C:ssa biotiinin dissosiaatio oli 30 kertaa nopeampaa kuin avidiinilla, eivätkä BBP-A:n sekvenssiin tehdyt pistemutaatit vaikuttaneet proteiinin biotiiniaffiniteettiin. Koska BBP-A:n ominaisuudet eivät vastaa aiemmin kananmunan keltuaisesta ja valkuaisesta eristettyjen biotiinia sitovien proteiinien ominaisuuksia, kyseessä on uusi jäsen biotiinia sitovien proteiinien ryhmään.

## ESIPUHE

Tämän nanotieteiden maisteriohjelman pro gradu -tutkielman kokeellinen osa tehtiin kevätlukukauden 2005 aikana Jyväskylän yliopiston orgaanisen kemian ja bio- ja ympäristötieteiden laitoksen molekyylibiologian osastoilla. Tutkielman kokeellinen osa liittyy professori Markku Kulomaan tutkimusryhmän tutkimusprojektiin.

Kirjallinen osa kirjoitettiin marraskuun 2005 ja toukokuun 2006 välisenä aikana. Kirjallisen osan aineisto koottiin Sci-Finder-ohjelman ja eri kustantajien internet-hakukoneiden avulla. Hakusanoina käytettiin mm. ”bifunctional reagents”, ”cross-linkers”, ”bifunctional reagents in bioconjugation” ja ”covalent linkage between label and protein”. Lisäksi lähteenä käytettiin kemikaalivalmistajien internet-sivustoilta löytyvää materiaalia bifunktionaalista reagensseista.

Suuret kiitokset kuuluvat työni ohjaajalle ja tarkastajalle professori Kari Rissaselle. Lisäksi haluan osoittaa kiitokseni FT Vesa Hytöselle työn biologisen osan ohjauksesta ja virkistävästä keskusteluista, sekä professori Jari Ylänteelle tutkielmani tarkastamisesta. Sain työn aikana hyviä neuvoja suurelta joukolta orgaanisen kemian osaston ja molekyylibiologian osaston henkilökuntaa, mikä teki työstä erittäin antoisaa. Erikseen haluan kiittää FM Juha Määttä ja FT Juhani Huuskosta orgaanisen kemian neuvoista, Mirja Lahtiperää MS-mittauksiin ja Reijo Kauppista NMR-mittauksiin liittyvästä avusta, sekä FM Einari Niskasta, Irene Helkalaa ja Eila Korhosta molekyylibiologian osastolla työhön saamastani tärkeästä tuesta.

Lämpimät kiitokset miehelleni, perheelle ja ystäville tuesta ja kannustuksesta koko opiskelujeni ajan.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>TIIVISTELMÄ</b> .....	<b>ii</b>
<b>ESIPUHE</b> .....	<b>iii</b>
<b>SISÄLLYSLUETTELO</b> .....	<b>iv</b>
<b>LYHENTEET</b> .....	<b>vi</b>
<u>KIRJALLISUUSKATSAUS</u>	
<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>2</b>
<b>2 LINKKERIEN JAOTTELU</b> .....	<b>3</b>
<b>3 ATSIDILINKKERIT</b> .....	<b>4</b>
3.1 Aryyliatsidien synteesi .....	4
3.2 Asyyliatsidien synteesi .....	7
<b>4 IMIDAATTI- TAI IMIDOESTERILINKKERIT</b> .....	<b>10</b>
4.1 Lohkeamattomat imidaattilinkkerit .....	11
4.2 Lohkeavat imidaattilinkkerit .....	12
<b>5 NHS-ESTERILINKKERIT</b> .....	<b>16</b>
5.1 Homobifunktionaaliset NHS-esterilinkkerit .....	17
5.2 Sulfonyloidut NHS-esterilinkkerit .....	19
5.3 Erikoistapaukset .....	21
5.3.1 UV-säteilyllä lohkeava SSTN .....	21
5.3.2 NHS-esteröinti 1,3-di-isopropyylikarbodi-imidin avulla .....	23
5.3.3 N-sukkinimidyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaatti .....	24
<b>6 MALEIMIDILINKKERIT</b> .....	<b>26</b>
6.1 Biologisesti hajoava maleimidilinkkeri MESS .....	26
6.2 N-Maleoyyliamiinohappojen synteesi .....	28
6.3 Pitkaketjuinen maleimidilinkkeri .....	30
6.4 Maleimidi-atsidi-linkkerit TFPAM-3 ja TFPAM-6 .....	32
<b>7 ATSIDI-IMIDAATTI-LINKKERIT</b> .....	<b>34</b>
7.1 Lohkeamattomat linkkerit .....	35
7.2 Lohkeavat linkkerit .....	36
7.3 Nitrosubstituoitu atsidi-imidaatti-linkkeri ANB-AI .....	37
<b>8 ATSIDI-NHS-ESTERI-LINKKERIT</b> .....	<b>39</b>
8.1 Nitro- ja hydroksyyli-substituoidut aryyliatsidit .....	41
8.2 Lohkeavat linkkerit .....	43
8.2.1 Disulfidisilta .....	43
8.2.2 Atsobentseeniyhdisteet .....	45
<b>9 ESIMERKKEJÄ LINKKERIEN KÄYTÖSTÄ</b> .....	<b>48</b>
9.1 Reagenssin valinta .....	48
9.2 Konjugointireaktion olosuhteet .....	51
9.3 Proteiini-interaktioiden tutkiminen .....	52
9.4 Molekyylien immobilisointi .....	54
9.5 Proteiinkonjugaatit .....	57
<b>10 YHTEENVETO</b> .....	<b>62</b>
<u>KOKEELLINEN OSA</u>	
<b>11 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET</b> .....	<b>66</b>
<b>12 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b> .....	<b>67</b>
12.1 Käsivarrellisen HABA:n synteesi .....	67
12.1.1 Reagensseja .....	67
12.1.2 Käsivarsi .....	68
12.1.3 Diatsotointi .....	69
12.1.4 <i>tert</i> -Butoksykarbonyylisuojauksen purkaminen .....	70

12.1.5	<i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteröinti.....	71
12.1.6	Tuotteiden karakterisointi .....	72
12.2	Käsivarrellisen HABA:n liittäminen proteiiniin .....	73
12.3	ELISA .....	74
12.4	Uusi biotiinia sitova proteiini BBP-A .....	76
12.4.1	BBP-A:n tuottaminen hyönteissoluissa .....	76
12.4.1.1	Hyönteissolujen transfektio.....	76
12.4.1.2	Virusten monistaminen ja proteiinin tuottaminen.....	77
12.4.1.3	Proteiinin eristäminen .....	78
12.4.2	Bakteerisoluisissa tuotettu BBP-A ja mutantit .....	79
12.4.3	SDS-PAGE.....	79
12.4.4	Proteiinien siirto nitroselluloosakalvolle.....	80
12.4.5	Immunovärjäys.....	81
12.4.6	Deglykosylaatio .....	82
12.4.7	Massaspektrometria .....	82
12.4.8	Geelisuodatus .....	83
12.4.9	Lämpöstabiilisuuskokeet.....	84
12.4.10	Dissosiaationopeusvakioiden määrittäminen.....	85
12.4.10.1	Fluoresenssispektrofotometrinen määrittäminen.....	86
12.4.10.2	Radiobiotiinin määrittäminen.....	86
<b>13</b>	<b>TULOKSET.....</b>	<b>88</b>
13.1	Käsivarrellisen HABA:n synteesi .....	88
13.1.1	Tuote 5 .....	88
13.1.2	Tuote 8 .....	89
13.1.3	Tuote 9 .....	91
13.2	ELISA .....	91
13.3	BBP-A .....	92
13.3.1	Immunovärjäys.....	93
13.3.2	Deglykosylaatio .....	94
13.3.3	Massaspektrometria .....	95
13.3.4	Geelisuodatus .....	96
13.3.5	Lämpöstabiilisuus .....	98
13.3.6	Dissosiaationopeusvakio .....	101
<b>14</b>	<b>YHTEENVETO .....</b>	<b>103</b>
14.1	Käsivarrellinen HABA.....	103
14.2	Uusi biotiinia sitova proteiini BBP-A .....	104
<b>15</b>	<b>KIRJALLISUUSLUETTELO .....</b>	<b>108</b>
	<b>LIITTEET.....</b>	<b>116</b>

## LYHENTEET

A	absorbanssi
AFM	atomivoimamikroskopia
ATPaasi	entsyymi, joka hydrolysoi adensiinitrifosfaattia
BBP	biotinia sitova proteiini
BOC	<i>tert</i> -butoksykarbonyyli
BSA	naudan seerumialbumiini
cDNA	komplementaarinen DNA
Da	Dalton (g/mol)
DCC	<i>N,N'</i> -disykloheksyylikarbodi-imidi
DFO	deferoksamiini
DMAP	dimetyyliaminopyridiini
DSC	disukkinimidylikarbonaatti
DTT	ditiotreitoli
$\epsilon$	molaarinen absorptiokerroin
ELISA	entsyymi-immunoanalyysi
ESI-MS	sähkösumutusmassaspektrometria
Fab'	vasta-aineen osa, joka sisältää antigeenin sitomiskohdan
FTICR-MS	Fourier-muunnos-ionisyklotroniresonanssimassaspektrometria
g	sentrifugaalikentän suuruus verrattuna maan painovoimakenttään
HABA	4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo
IgG	immunoglobuliini G, vasta-aine
$k_{\text{diss}}$	dissosiaationopeusvakio
MEIA	mikropartikkelientsyymi-immunoanalyysi
NHS	<i>N</i> -hydroksisukkinimidi
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
pI	isoelektrinen piste, pH-arvo jossa proteiinin nettovaraus on nolla
rpm	kierrosta minuutissa
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
TEA	trietyyliamiini

Kirjallisuuskatsauksessa esiteltyjen bifunktionaalisten reagenssien lyhenteet on koottu taulukkoon (liitteet 1–2).

**Kirjallisuuskatsaus**

## 1 JOHDANTO

Bifunktionaaliset reagenssit ovat tärkeitä proteiinikemian ja biologisten sovellusten kemiallisia työkaluja. Bifunktionaalisella reagenssilla tarkoitetaan yhdistettä, joka sisältää kaksi reaktiivista ryhmää ja joka muodostaa kovalenttisen sillan kahden rakenteen, esimerkiksi vasta-aineen ja entsyymin<sup>1,2</sup> välille. Laajemman määritelmän mukaan muodostuvan sidoksen ei tarvitse olla kovalenttinen, vaan myös heikoilla vuorovaikutuksilla sitoutuvat affiniteettireagenssit luetaan bifunktionaalisiin reagensseihin. Tässä katsauksessa käsitellään kuitenkin vain kovalenttisen sidoksen muodostavia bifunktionaalisia reagensseja. Bifunktionaaliset reagenssit eli linkkerit koostuvat kahdesta funktionaalisesta ryhmästä ja niitä yhdistävästä rakenteesta, käsivarresta. Jos bifunktionaalisen reagenssin funktionaaliset ryhmät ovat samanlaiset, puhutaan homobifunktionaalista reagenssista, ja jos ne ovat erilaiset, käytetään termiä heterobifunktionaalinen reagenssi.<sup>3,4</sup>

Bifunktionaalisia reagensseja käytetään kiinnittämään kaksi molekyyliä kovalenttisesti toisiinsa. Syntynyttä rakennetta kutsutaan konjugaatiksi. Yhdistettäviä rakenteita voivat olla esimerkiksi proteiinit, ligandit, vasta-aineet, entsyymit, erilaiset leimamolekyylit, DNA- ja RNA-molekyylit tai lääkeaineet.<sup>4-7</sup> Lisäksi bifunktionaalisia reagensseja käytetään kiinnittämään molekyyliä erilaisiin pintoihin, esimerkiksi affiniteettimatriisien valmistamisessa.<sup>3</sup> Kiinnittämistä kutsutaan molekyylin immobilisoimiseksi.<sup>4</sup>

Tässä katsauksessa käsitellään bifunktionaalisten reagenssien synteesimenetelmiä. Katsauksessa esitellyt reagenssit ovat proteiinikemiassa käytettyjä linkkereitä, joiden funktionaaliset ryhmät reagoivat aminohappojen sivuketjuista löytyvien funktionaalisten ryhmien, esimerkiksi amino- tai sulfhydryyliryhmien kanssa. Reagenssit on valittu niin, että tavallisimmat funktionaaliset ryhmät<sup>3,8,9</sup> ovat katsauksessa edustettuina. Sellaiset bifunktionaaliset reagenssit, jotka saavat aikaan sidoksen suoraan olemassa olevien funktionaalisten ryhmien välille, esimerkiksi amidisidoksen muodostumisessa käytetty karbodi-imidi<sup>3,4</sup>, on jätetty tarkastelun ulkopuolelle. Katsauksen lopussa esitellään myös linkkerien käyttöä erilaisissa sovelluksissa esimerkkien avulla. Esiteltyjen linkkerien nimet, lyhenteet ja ominaisuudet on koottu yhteenvetotaulukkoon (liitteet 1–2).



## 2 LINKKERIEN JAOTTELU

Linkkereitä voidaan jaotella useiden ominaisuuksien mukaan.<sup>4</sup> Jaottelu voidaan tehdä esimerkiksi linkkerin funktionaalisten ryhmien, reaktiospesifisyyden, hydrofobisuuden tai hydrofiilisyyden, hetero- tai homobifunktionaalisuuden tai käsivarren pituuden mukaan, tai sen perusteella, onko linkkerin käsivarsi helposti lohkaistava tai ovatko funktionaaliset ryhmät lipidikalvoa läpäiseviä tai läpäisemättömiä.

Tässä katsauksessa on käytetty jaottelua linkkerien funktionaalisten ryhmien tyyppin mukaan, koska synteisien tapauksessa on johdonmukaista käsitellä kutakin funktionaalista ryhmää omana kokonaisuutenaan. Funktionaalisista ryhmistä esitellään atsidit, imidoesterit, *N*-hydroksisukkinimidiesterit eli NHS-esterit ja maleimidit. Reagenssit on jaoteltu atsidilinkkereihin, imidoesterilinkkereihin, NHS-esterilinkkereihin, maleimidilinkkereihin, atsidi-imidaatti-linkkereihin ja atsidi-NHS-esteri-linkkereihin. Alaluvuissa on funktionaalisten ryhmien lisäksi käytetty myös muita linkkereiden jaotteluperiaatteita, kuten lohkeavuus tai heterobifunktionaalisuus.

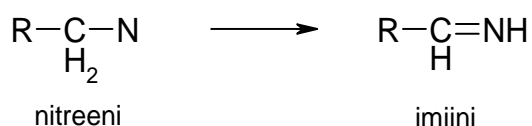
NHS-esterit ja imidoesterit ovat aminospesifisiä eli ne reagoivat ensisijaisesti aminoryhmien kanssa. Proteiineissa vapaita aminoryhmiä löytyy polypeptidiketjun *N*-terminaaliosasta päästä ja lysiinitähteiden sivuketjuista. Maleimidit reagoivat parhaiten tiolien kanssa, joita proteiineissa on ainoastaan kysteiinitähteiden sivuketjuissa. Atsidit luetaan valoaktiivisiin linkkereihin, sillä ne muuttuvat valon vaikutuksesta reaktiivisiksi nitreeneiksi, jotka reagoivat nopeasti läheisten N–H-, O–H-, C–H- tai C=C-sidosten kanssa.<sup>3,6</sup>

Linkkerien käsivarret vaihtelevat rakenteeltaan ja pituudeltaan huomattavasti. Yksi yleinen luokitteluperuste on jakaa linkkerit lohkeaviin ja lohkeamattomiin reagensseihin. Lohkeavat linkkerit voidaan katkaista miedolla hapettavalla tai pelkistävällä käsitteillä.<sup>10</sup> Lohkeava käsivarsi on alun perin suunniteltu proteiini-proteiini-konjugaattien karakterisointiin kaksikulotteisen elektroforeesin avulla.<sup>11,12</sup> Se mahdollistaa linkkerillä yhdistettyjen molekyylien irrottamisen toisistaan. Tavallisia lohkeavia ryhmiä ovat disulfidi-, esteri- ja atsosidokset, sulfoniryhmät, sekä visinaaliset hydroksyyliiryhmät eli glykoliryhmät.<sup>3</sup>

### 3 ATSIDILINKKERIT

Atsidit ( $-N_3$ ) kuuluvat valoaktiivisiin reagensseihin, ja niiden käyttö eroaa tavallisista kemiallisista reagensseista. Valoaktiiviset ryhmät ovat täysin reagoimattomia pimeässä, mutta ne muuttuvat reaktiivisiksi absorboidessaan sopivan energian omaavan fotonin.<sup>3,13</sup> Atsidit voidaan muuttaa erittäin reaktiivisiksi nitreeneiksi fotolysoimalla ne ultraviolettisäteilyllä.<sup>6</sup> Nitreenit reagoivat nopeasti ja epäspesifisesti OH-, NH-, CH- tai C=C-ryhmien kanssa. Koska nitreenien puoliintumisaika on noin  $10^{-2}$ – $10^{-4}$  s, ja ne reagoivat myös liuotinmolekyylien kanssa, sidoksia syntyy vain lähellä oleviin ryhmiin.<sup>3,4</sup> Biokemiassa yleinen pelkistävä reagenssi, ditiotreitoli, pelkistää myös atsidiryhmän, joten reagenssia voi käyttää atsidien konjugointireaktioissa vasta valoaktivoinnin jälkeen.<sup>14</sup>

Aryyliatsidien lisäksi tunnetaan alkyyli- ja asyyliatsideja, jotka eivät kuitenkaan ole hyviä valoaktiivisia reagensseja.<sup>3</sup> Alkyyliatsidit muodostavat fotolyysituotteina alkyylinitreenejä, jotka toisiintuvat helposti inaktiivisiksi imiineiksi (kuva 1). Asyyliatsidit reagoivat nukleofiilien kanssa jopa ilman fotolyysiä, joten valoaktivoinnin sijaan niitä käytetään aminospesifisinä reagensseina. Tällöin nukleofiilinen amiini reagoi emäksisissä olosuhteissa karbonyylihiilen kanssa muodostaen amidisidoksen.



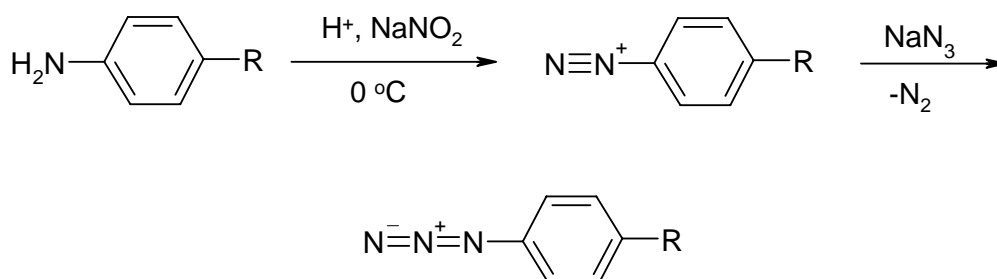
Kuva 1. Alkyylinitreenin toisiintuminen imiiniksi.

#### 3.1 Aryyliatsidien synteesi

Aryyliatsidit syntetisoidaan aromaattisista amiineista diatsotointireaktiolla ja substituutiolla natriumatsidin ( $\text{NaN}_3$ ) kanssa. Diatsotoinnissa käytetään suolahappoa tai rikkihappoa ja natriumnitriittiä. Amiini liuotetaan happoliuokseen ja jäähdytetään, ja seokseen lisätään veteen liuotettua natriumnitriittiä.<sup>15-17</sup> Reaktiossa syntyvä diatsoniumsuola on erittäin reaktiivinen, joten diatsotointireaktio täytyy tehdä kylmähauteessa (viite 18 s. 521). Synteesin toisessa vaiheessa diatsoniumsuola reagoi

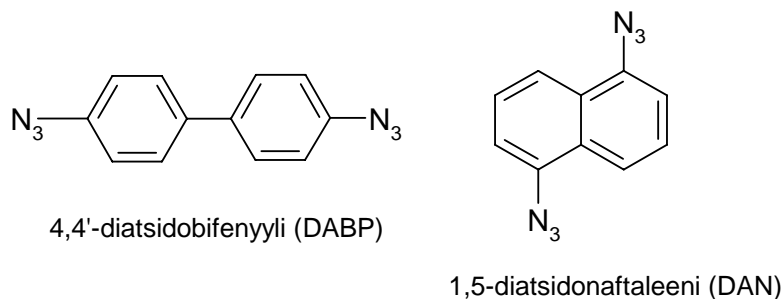
natriumatsidin kanssa muodostaen aryyliaatsidin. Myös synteesin toinen vaihe tehdään kylmähauteessa.<sup>15</sup> Aryyliatsidien yleinen synteesikaavio on esitetty kuvassa 2.

Smith ja Brown<sup>15</sup> ovat aryyliaatsideja valmistaessaan käyttäneet hieman ylimäärin natriumnitriittiä ja natriumatsidia verrattuna amiinin määrään. Diatsotoinnin jälkeen ylimääräinen typpihapoke ( $\text{HNO}_2$ ) poistetaan urealla ja seos käsitellään aktiivihieillä ennen natriumatsidin lisäystä. Koska aatsidit ovat valoreaktiivisia, niiden synteesit tehdään usein valolta suojattuna.<sup>11,14,19-21</sup>



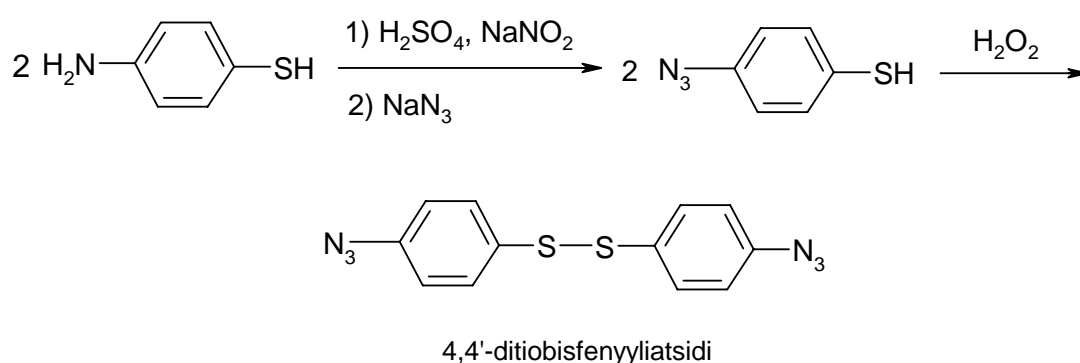
Kuva 2. Aryyliatsidien synteesi.<sup>16</sup>

Smithin ja Brownin menetelmää<sup>15</sup> on käytetty 4,4'-diatsidobifenyylin (DABP) ja 1,5-diatsidonafhtaleenin (DAN) syntetisoimiseen.<sup>22</sup> DABP ja DAN ovat rasvaliukoisia molekyyliä, joita on käytetty punasolujen kalvoproteiinien tutkimisessa. Synteesin lähtöaineina käytetään 4,4'-diaminobifenyylä ja 1,5-diaminonafhtaleenia. Lähtöaineet sisältävät kaksi aminoryhmää, joten natriumnitriittiä ja natriumatsidia käytetään vähintään kaksi ekvivalenttia diaminiin verrattuna. Linkkerien rakenteet ovat kuvassa 3.



Kuva 3. Diatsidilinkkerit DABP ja DAN.

4,4'-Diatsidobifenyylin lohkeava analogi, 4,4'-ditiobisfenyyliatsidi<sup>22</sup>, sisältää bentseenirenkaiden välissä disulfidisillan, joka voidaan katkaista ditiotreitolilla. Synteesin lähtöaineena käytetään 4-aminotiofenolia, jonka aminoryhmä muutetaan atsidiksi Smithin ja Brownin menetelmällä<sup>15</sup>, mutta ilman aktiivihiilikäsittelyä. Synteesin toisessa vaiheessa sulfhydryyliryhmät hapetetaan vetyperoksidilla (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>23</sup>, jolloin bentseenirenkaiden välille muodostuu disulfidisilta, ja tuotteeksi saadaan 4,4'-ditiobisfenyyliatsidia (kuva 4). Linkkeri voidaan syntetisoida myös suoraan 4,4'-ditiobisfenyyliamiinista, jonka aminoryhmät muutetaan atsidiryhmiksi kuvan 2 menetelmällä.<sup>17,20</sup>



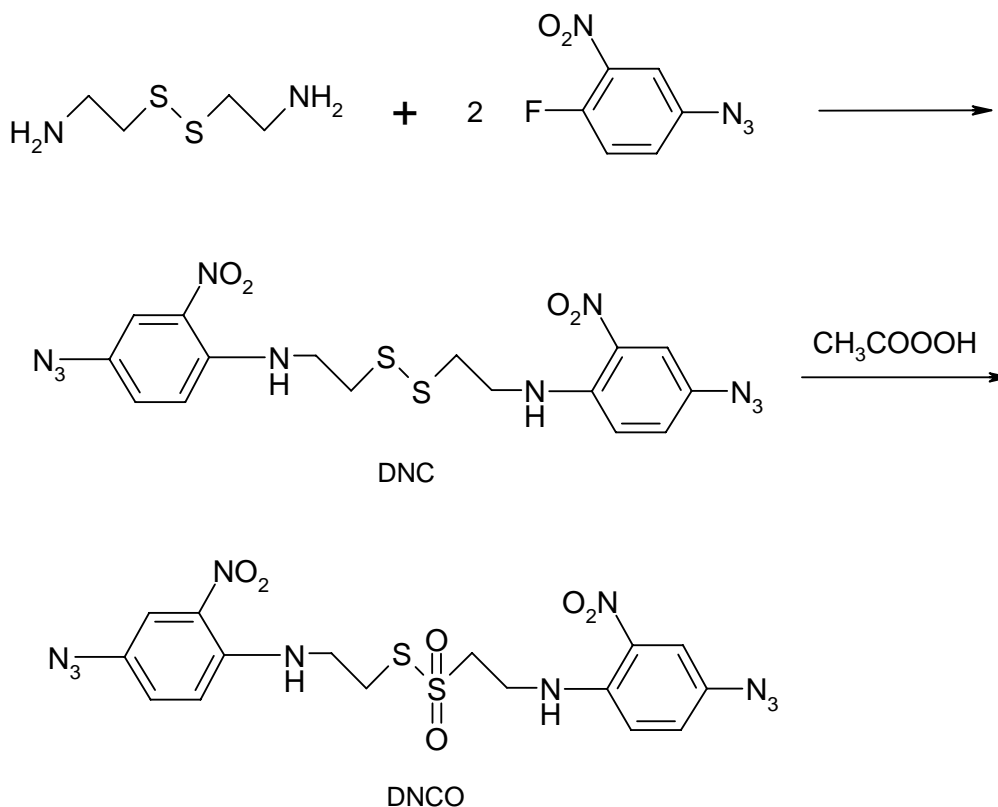
Kuva 4. 4,4'-Ditiobisfenyyliatsidin synteesi 4-aminotiofenolista.<sup>22,23</sup>

Bentseenirenkaan elektroneja vetävät substituentit, kuten nitro- ja hydroksyyliiryhmät, lisäävät fotolyysissä syntyvän nitreenin reaktiivisuutta. Nitreenin reaktiivisuuden kasvu ei kuitenkaan välttämättä lisää konjugoinnin tehokkuutta, sillä myös reaktio liuottimen kanssa tehostuu. Lisäksi nitro- ja hydroksyyliiryhmät siirtävät aryyliatsidien absorptiomaksimia pidemmälle aallonpituudelle, ja merkittävää absorptiota tapahtuu vielä yli 305 nm aallonpituuksilla.<sup>3,24</sup> Substituomattomien aryyliatsidien aktivoinnissa käytetään 250–290 nm aallonpituutta, joka saattaa aiheuttaa myös tyrosiini-, tryptofaani- ja kysteiniitähteiden fotolyysiä proteiineissa.<sup>21</sup>

Di-*N*-(2-nitro-4-atsidofenyyli)kystamiini-*S,S*-dioksidi eli DNCO<sup>19</sup> on nitrosubstituoitu, lohkeava aryyliatsidilinkkeri. DNCO liukenee paremmin orgaanisiin faaseihin kuin vesiliuoksiin, ja sitä on käytetty punasolujen kalvoproteiinien konjugointiin, kuten edellä mainittuja 4,4'-diatsidobifenyylä, 1,5-diatsidonafaleenia ja 4,4'-ditiobisfenyyliatsidia. DNCO on kuitenkin heterobifunktionaalinen reagenssi, jonka konjugointi-reaktiot tehdään kahdessa vaiheessa. Ensin rikkidioksidiryhmä reagoi pimeässä

proteiinien kysteiinitähteiden tioliryhmien kanssa. Reaktiossa muodostuva disulfidisiilta ei muuta proteiinin varausta tai polaarisuutta, ja se voidaan myöhemmin katkaista pelkistävällä ditiotreitolilla. Toisessa vaiheessa aryyliaatsidi aktivoidaan valolla.

Linkkeri syntetisoidaan kahdesta lähtöaineesta, kystamiinista ja 4-fluori-3-nitrofenyyliatsidista (kuva 5).<sup>19</sup> Kystamiinin hydrokloridia on kaupallisesti saatavilla mutta 4-fluori-3-nitrofenyyliatsidi syntetisoidaan 4-fluori-3-nitroaniliinista diatsotoimalla kuten muutkin aryyliaatsidit. Reaktio tehdään kylmähauteessa  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  lämpötilassa<sup>25</sup>. DNCO:n synteesissä kystamiinin dihydrokloridi ja 4-fluori-3-nitrofenyyliatsidi reagoivat pimeässä muodostaen di-*N*-(2-nitro-4-atsidofenyyli)kystamiinia (DNC). DNC:n sulfidiryhmä hapetetaan peretikkahapolla DNCO:ksi.



Kuva 5. Di-*N*-(2-nitro-4-atsidofenyyli)kystamiini-*S,S*-dioksidin (DNCO) synteesi kystamiinista ja 4-fluori-3-nitrofenyyliatsidista.<sup>19</sup>

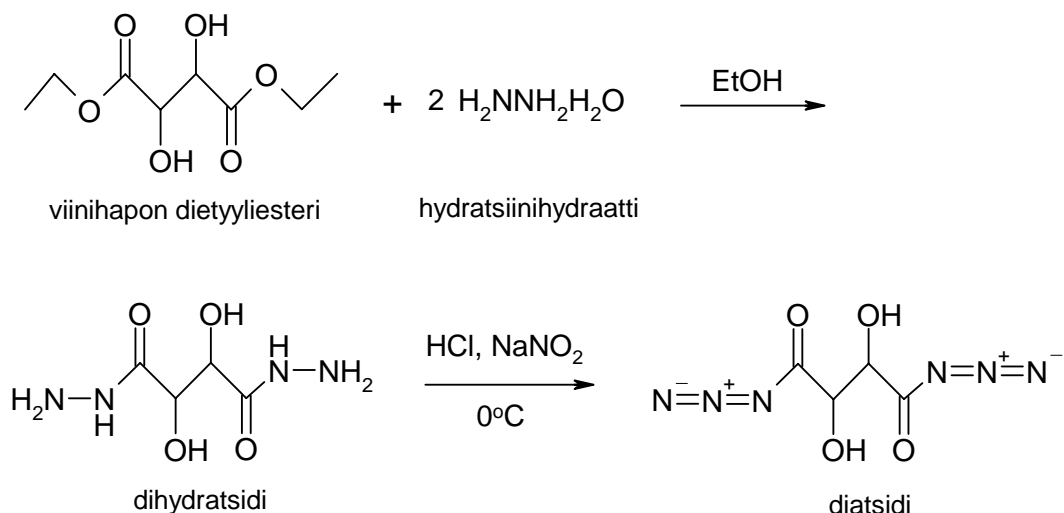
### 3.2 Asyyliatsidien synteesi

Asyyliatsideissa karbonyyliryhmä on aktivoitu atsidiryhmällä. Asyyliatsideja voidaan valmistaa hapoista tai estereistä. Aktivoitu karbonyyliryhmä reagoi aminoryhmän

kanssa emäksisissä olosuhteissa muodostaen amidisidoksen. Samalla proteiinin positiivinen nettovaraus vähenee yhdellä yksiköllä. Asyyliatsidit valmistetaan juuri ennen käyttöä diatsotoimalla stabiilemmista dihydratsideista.<sup>3,26</sup>

Lutter *et al.*<sup>26</sup> ovat syntetisoineet vesiliukoisia, viinihappoon perustuvia diatsidi-linkkereitä, jotka voidaan katkaista perjodaattikäsittelyllä visinaalisten hydroksyyli-ryhmien ansiosta. Glykoliryhmällä on useita etuja proteiinikemiassa verrattuna toiseen yleiseen lohkeavaan ryhmään, disulfidiryhmään. Glykoliryhmä kestää pelkistävät olosuhteet, joten proteiineja analysoitaessa voidaan käyttää 2-merkaptetaanolia ennen natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesia (SDS-PAGE), eikä glykoliryhmällä tapahdu disulfidivaihtoa proteiinin rikkisiltojen kanssa.<sup>12</sup>

Viinihapon diatsidi (tartryylidiatsidi, TDA) syntetisoidaan viinihapon dietyyliesteristä ja hydratsiinihydraatista refluksoimalla etanolissa, ja tuotteeksi saadaan viinihapon dihydratsidia.<sup>26</sup> Dihydratsidi muutetaan diatsotointireaktiolla diatsidiksi natriumnitriitin ja vetykloridihapon avulla kylmähauteessa. Ylimääräinen typpihapoke poistetaan lisäämällä ureaa. Kuvassa 6 on esitetty tartryylidiatsidin reaktiokaavio. TDA voi konjugoida enimmillään 6 Å:n päässä toisistaan olevat aminoryhmät.

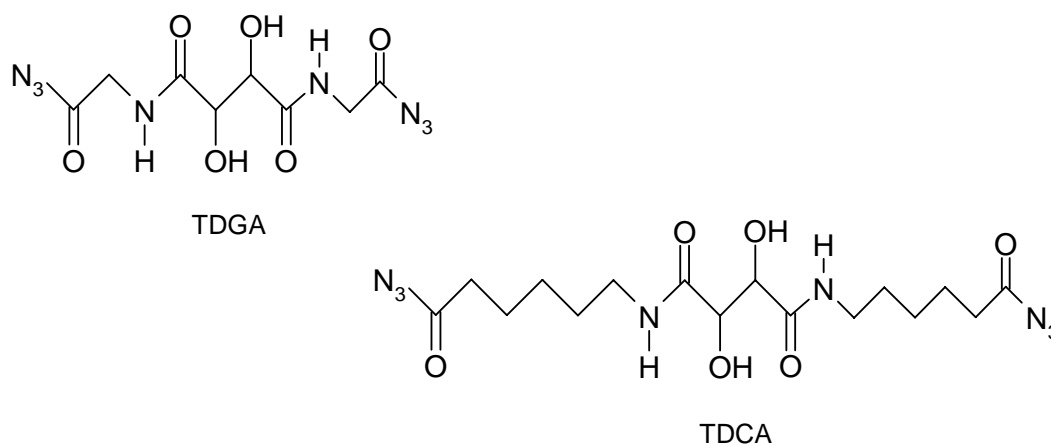


Kuva 6. Asyyliatsidin (TDA) synteysi viinihapon dietyyliesteristä.<sup>26</sup>

Tartryylidiatsidia voidaan käyttää linkkerinä tai sen avulla voidaan valmistaa pidemmän alkyyliketjun omaavia linkkereitä.<sup>26</sup> Reaktiossa glysiinietyyliesterin hydrokloridin kanssa asyyliatsidin karboksyyli-ryhmä muodostaa amidisidoksen glysiinin amino-

ryhmän kanssa. Reaktio tehdään jäähauteella natriumvetykarbonaatin vesiliuoksessa. Reaktiossa käytetään kolme ekvivalenttia glysiinietyyliesterin hydrokloridia ja yksi ekvivalentti tartryylidiatsidia. Reaktion toisessa vaiheessa esteriryhmät reagoivat hydratsiinihydraatin kanssa, jolloin syntyy tartryylidi(glysyylihydratsidia). Hydratsiinihydraatti lisätään välituotteen etanoliliuokseen, ja reaktioseos jätetään huoneenlämpöön usean tunnin ajaksi. Tuotteeksi saadaan tartryylidi(glysyylihydratsidia), joka muutetaan juuri ennen käyttöä diatsotointireaktiolla tartryylidi(glysyyliatsidiksi) eli TDGA:ksi.

Tartryylidi( $\epsilon$ -aminokaproyyliatsidi) eli TDCA syntetisoidaan kuten edellä mainittu TDGA.<sup>26</sup> Lähtöaineena käytetään kuusi ekvivalenttia  $\epsilon$ -aminokaproylihapon etyyliesterin hydrokloridia ja yksi ekvivalentti tartryylidiatsidia. Kuvassa 7 on esitetty TDGA:n ja TDCA:n rakenteet. TDGA:n käsivarren pituus on enintään 13 Å ja TDCA:n 23 Å.



Kuva 7. Tartryylidi(glysyyliatsidi) eli TDGA ja tartryylidi( $\epsilon$ -aminokaproyyliatsidi) eli TDCA.<sup>26</sup>

## 4 IMIDAATTI- TAI IMIDOESTERILINKKERIT

Imidaatit eli imidoesterit ovat vesiliukoisia yhdisteitä, jotka reagoivat spesifisesti aminoryhmien kanssa muodostaen amidiinin. Reaktio tapahtuu pH-alueella 7–10, mutta imidoesterit hydrolysoituvat nopeammin neutraalissa kuin emäksisessä pH:ssa, joten emäksiset olosuhteet parantavat saantoa. Hydrolyysiä voi ehkäistä myös lisäämällä reagensseja pienissä erissä.<sup>3,27-29</sup>

Fysiologisessa pH:ssa amidiinit ovat positiivisesti varautuneita, joten imidoesterin reaktio proteiinin lysiinitähteiden kanssa ei muuta proteiinin varausta happamissa tai neutraaleissa olosuhteissa. Siksi proteiinin kolmiulotteinen rakenne säilyy ennallaan amidiinisidoksista huolimatta.<sup>28,30</sup> Amidiinit voidaan lohkaista ammoniakilla tai hydratsidilla ilman että proteiinin peptidisidokset katkeavat. Reaktio tapahtuu tehokkaammin aminohappojen tai pienten peptidien kuin proteiinien kanssa.<sup>3,27,28</sup>

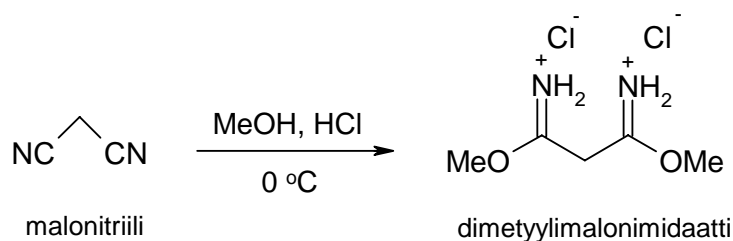
Imidoesterit valmistetaan helposti vastaavista nitrileistä alkoholin ja HCl:n kanssa vedettömissä olosuhteissa.<sup>3,27,29</sup> Nitrilejä voidaan tarvittaessa valmistaa halideista syanidikäsittelyllä.<sup>27,31</sup> Imidoesterien synteesi tehdään yleensä jäähauteessa liuottamalla niriili johonkin liuottimen ja alkoholin seokseen, ja johtamalla HCl-kaasua seokseen.<sup>3</sup> Tavallisia liuottimia ovat eetteri, dioksaani, kloroformi ja näiden seokset.<sup>29,32,33</sup> Reaktio voidaan tehdä myös pelkässä alkoholiliuoksessa, jolloin reaktion jälkeen seokseen lisätään eetteriä tuotteen saostamiseksi.<sup>12,21</sup> Di-imidoestereiden synteessissä käytetään vähintään kaksi ekvivalenttia alkoholia ja HCl:a yhtä dinitriiliekvivalenttia kohden.<sup>33,34</sup> Usein reaktioseos kyllästetään HCl-kaasulla.<sup>12,28,32</sup>

Imidoesterit ovat erittäin hygroskooppisia, ja siksi niitä täytyy säilyttää kosteudelta suojattuna esimerkiksi vakuuissa<sup>21</sup> tai kalsiumsulfaatin (CaSO<sub>4</sub>) kanssa<sup>35</sup>. Reaktiossa käytettävät liuottimet ja HCl-kaasu kuivataan huolellisesti, ja reaktioseos suojataan ilmankosteudelta.<sup>3,32</sup> Joissakin tapauksissa myös tuotteen suodattaminen reaktioseoksesta tehdään typpikaasulla suojattuna.<sup>34</sup>



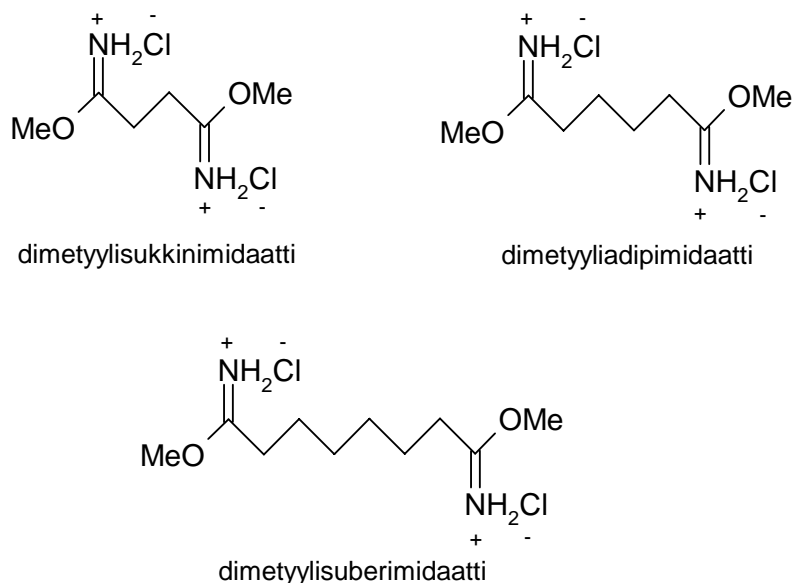
## 4.1 Lohkeamattomat imidaattilinkkerit

Ji<sup>36</sup> on syntetisoinut rakenteeltaan yksinkertaisia imidaatti-linkkereitä, ja käyttänyt niitä punasolujen glykoproteiinien ja glykolipidien konjugoimiseen. Imidaattiryhmien välissä on yhdestä kuuteen hiiliatomin pituinen alkyyliketju, jolloin linkkerin käsivarren pituus vaihtelee 4,9–11 Å:iin. Kuvassa 8 on esitetty yksinkertaisimman imidaattilinkkerin, dimetyylimalonimidaatin, synteesikaavio. Malonimidaatin lisäksi Ji<sup>36</sup> on syntetisoinut dimetyylisukkinimidaattia, dimetyyliadipimidaattia ja dimetyylisuberimidaattia (kuva 9). Lähtöaineina käytetään vastaavia nitrilejä: sukkinonitriiliä, adiponitriiliä ja suberonitriiliä.



Kuva 8. Dimetyylimalonimidaatin (DMM) synteesi malonitriilistä. Tuote saadaan dihydrokloridisuolana.<sup>32,36</sup>

Lohkeamattomien imidoesterilinkkereiden synteesi tehdään liuottamalla nitriliä ja metanolia kuivaan dioksaaniin. Seos jäädytetään jää-vesihauteessa, ja seokseen johdetaan kuivattua HCl-kaasua reilusti ylimäärin. Kun seos on kyllästetty HCl:lla, astia suljetaan ja jätetään jäähauteelle 12–48 tunniksi. Reaktion onnistumisen kannalta on tärkeää, että reagenssit ovat kuivia ja että reaktioseos suojataan ilmankosteudelta reaktion aikana. Liuottimena käytetään dioksaania tai dimetyylimalonimidaatin tapauksessa kloroformi-dioksaaniseosta. Syntynyt tuote on di-imidoesterin dihydrokloridisuola, ja sen saostumista voidaan nopeuttaa lisäämällä seokseen eetteriä.<sup>28,29,32</sup>

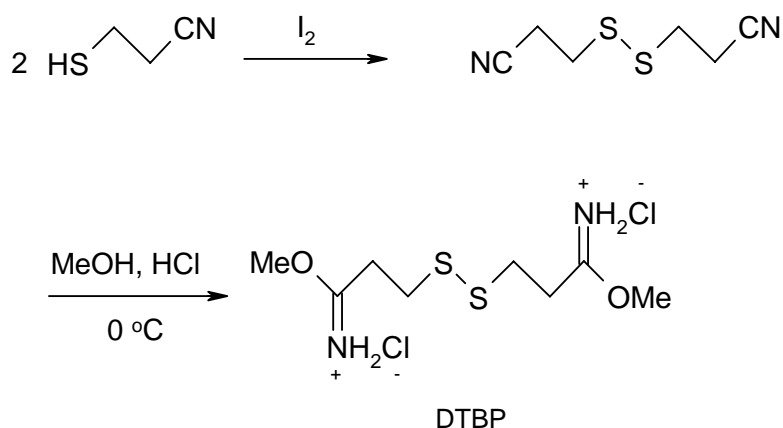


Kuva 9. Dimetyylisukkinimidaatti (DMSC), dimetyyliadipimidaatti (DMA) ja dimetyylisuberimidaatti (DMS).<sup>36</sup>

## 4.2 Lohkeavat imidaattilinkkerit

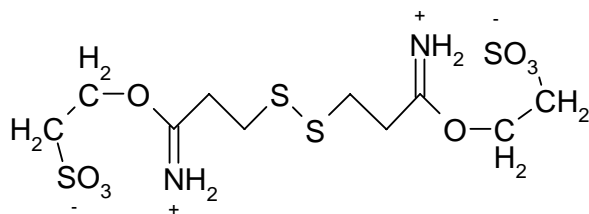
Lohkeavista imidoesterilinkkereistä dimetyyli-3,3'-ditiobispropionimidaatti (DTBP) ja di-isetionyyli-3,3'-ditiobispropionimidaatti (DIDIT) sisältävät ditiotreitolilla lohkeavan disulfidisillan. *N,N'*-Bis(2-karboksi-imidoetyyli)tartarimididimetyyliesteri (CMDT) perustuu rakenteeltaan viinihappoon ja sisältää glykoliryhmän.<sup>12,33,35</sup>

Dimetyyli-3,3'-ditiobispropionimidaatti<sup>33</sup> syntetisoidaan 3-merkaptopropionitriilistä hapettamalla sulfhydryyliryhmät jodilla (I<sub>2</sub>), jolloin muodostuu disulfidi, 3,3'-ditiobispropionitriili. Yhdiste on myös kaupallisesti saatavilla (esimerkiksi Sigma-Aldrich #484717). 3-Merkaptopropionitriililiuosta titrataan jodi-kaliumjodidiliuoksella, kunnes jodin ruskea väri säilyy liuoksessa. Sen jälkeen liuosta titrataan natriumtiosulfaatilla, kunnes väri häviää. Toisessa vaiheessa jääkylmään kloroformin ja metanolin seokseen liuotettua nitriiliä käsitellään kuivalla HCl-kaasulla. Reaktiossa käytetään yksi ekvivalentti nitriiliä, ja hieman yli kaksi ekvivalenttia metanolia ja HCl:a. Seoksen annetaan reagoida tiiviisti suljetussa astiassa 24 tuntia 0 °C lämpötilassa. DTBP:n synteesikaavio on kuvassa 10.



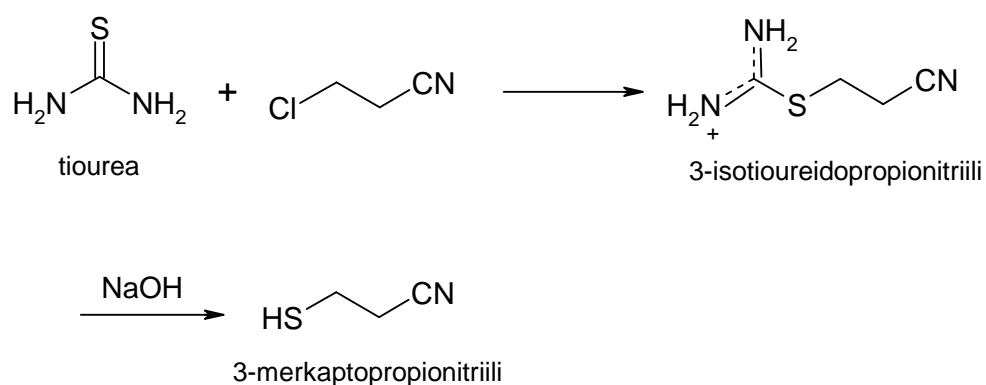
Kuva 10. Dimetyyli-3,3'-ditiobispropionimidaatin (DTBP) synteesi.<sup>33</sup>

Di-isetionyyli-3,3'-ditiobispropionimidaatti, DIDIT<sup>35</sup>, on hydrofiilinen reagenssi, jonka rakenne on analoginen DTBP:n kanssa (kuva 11). DIDIT sisältää kuitenkin metyyliryhmän sijaan isetionyyli-ryhmän, mikä tekee linkkeristä lipidikalvoa läpäisemättömän, ja mahdollistaa proteiinikompleksien tutkimisen vain yhdellä puolella kalvoa. Synteesin ensimmäisessä vaiheessa 3-merkaptopropionitriili hapetetaan 3,3'-ditiobispropionitriiliksi samalla tavalla kuin DTBP:n synteesissä. Imidoesterin synteesissä käytetään alkoholin sijaan natriumisetionaattia. Tuote liuotetaan natriumilla kuivattuun 1,2-dimetoksietaaniin ja liuokseen lisätään hieman yli kaksi ekvivalenttia natriumisetionaattia eli 2-hydroksietaanisulfonihapon natriumsuolaa. Reaktioastia huuhdotaan kuivalla typpikaasulla ja jäädytetään 0 °C:een jää-vesihauteella. Kuivattua HCl-kaasua johdetaan seokseen, kunnes sen pitoisuus on 20–30 painoprosenttia, ja reaktioastia suljetaan. Sekoitusta jatketaan kolme päivää 4 °C:ssa, jonka aikana tuote saostuu seoksesta.



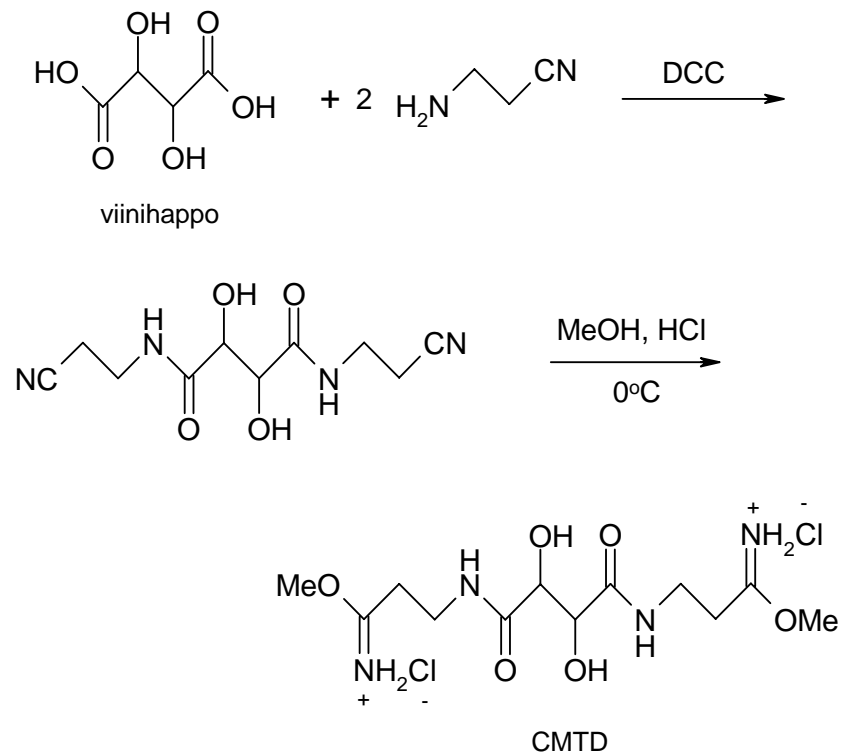
Kuva 11. DIDIT eli di-isetionyyli-3,3'-ditiobispropionimidaatti.<sup>35</sup>

DTBP:n ja DIDIT:n synteeseissä tarvittava 3-merkaptopropionitriili voidaan valmistaa 3-klooripropionitriilistä ja tioureaa (kuva 12). Tiourea ja 3-klooripropionitriilin vesiliuosta refluksoidaan kaksi tuntia 120 °C:ssa. Kun seos on jäähtynyt, 3-isotioureidopropionitriili saostetaan kaatamalla seos kylmään asetoniin. Toisessa vaiheessa 3-isotioureidopropionitriili hajotetaan natriumhydroksidilla 3-merkaptopropionitriiliksi. Reaktiossa käytetään suojakaasuna typpeä, jolla estetään sulfhydryyliryhmien hapettuminen reaktion aikana.<sup>20,23</sup>



Kuva 12. 3-Merkaptopropionitriilin synteesi.<sup>23</sup>

Kolmas lohkeava imidaattilinkkeri, *N,N'*-Bis(2-karboksi-imidoetyyli)tartarimididimetyyliesterin dihydrokloridi (CMDT), sisältää kaksi visinaalista hydroksyyli ryhmää, ja se voidaan katkaista natriumperjodaatilla.<sup>12</sup> Linkkeri syntetisoidaan viinihaposta, joka reagoi 2-aminopropionitriilin kanssa disykloheksyylikarbodiimidin (DCC) läsnä ollessa muodostaen amidin (kuva 13). Reaktio tehdään sekoittaen lähtöaineita huoneenlämpötilassa 16 tunnin ajan. Puhdistettua *N,N*-bis(2-syanoetyyli)tartaramidia sekoitetaan kuivaan metanoliin ja jäähdytetään 0 °C:een. Seos kyllästetään kuivatulla HCl-kaasulla, ja tunnin seisottamisen jälkeen tuote saostetaan lisäämällä seokseen kuivaa eetteriä. Kiinteä tuote voidaan erottaa seoksesta dekantoinnalla.



Kuva 13. *N,N'*-Bis(2-karboksi-imidoetyyli)tartarimididimetyyliesterin dihydrokloridi (CMTD) ja synteesikaavio (DCC = *N,N'*-disykloheksyylikarbodi-imidi).<sup>12</sup>

## 5 NHS-ESTERILINKKERIT

*N*-hydroksisukkinimidiesterit (NHS-esterit) ovat aminospesifisiä reagensseja. Ne reagoivat pääasiassa alifaattisten aminoryhmien kanssa, joita on proteiineissa lysiinin sivuketjussa ja proteiinin N-terminaaliossa. Lisäksi NHS-esterit reagoivat jossain määrin aromaattisten amiinien, alkoholien, fenolien (proteiineissa tyrosiini) ja histidiinin kanssa. Reaktiossa syntyy amidisidos, ja lähtevä ryhmä *N*-hydroksisukkinimidi irtoaa.<sup>3,6</sup> NHS-estereitä käytetään paljon biokemiassa, koska niitä on hyvin saatavilla ja ne ovat helppoja valmistaa.<sup>3,6,8,9</sup> Lähes mikä tahansa karboksyylihappon ryhmän sisältävä yhdiste voidaan esteröidä *N*-hydroksisukkinimidin kanssa.<sup>6</sup>

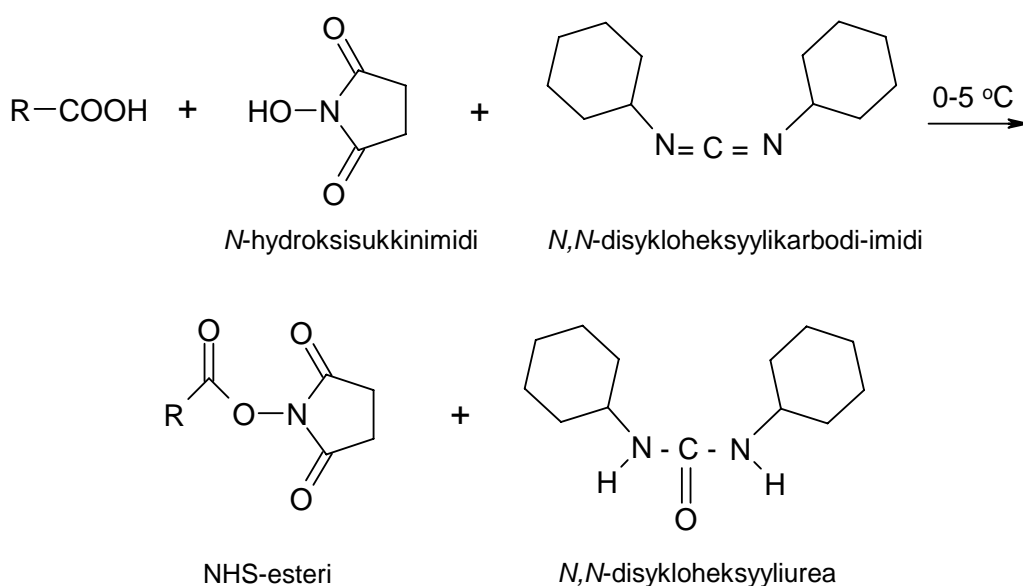
Toisin kuin imidoestereillä, NHS-estereiden hydrolyysi ei juuri vaikuta konjugointireaktion saantoon.<sup>11,30</sup> Tästä huolimatta NHS-esterit täytyy suojata huolellisesti kosteudelta säilytyksen aikana, esimerkiksi silikan avulla.<sup>3,6,37</sup> Konjugointireaktio proteiinien kanssa onnistuu vesiliuoksessa pH-alueella 5–9<sup>37</sup>, vaikka optimaaliset olosuhteet ovat pH:ssa 8–9<sup>6</sup>. Fysiologisessa pH:ssa lysiinin ε-aminoryhmät ovat positiivisesti varautuneita, ja reaktio NHS-esterin kanssa pienentää proteiinin positiivista varausta.<sup>21</sup>

NHS-esterit liukenevat huonosti vesiliuoksiin, vain 1 mM pitoisuuksiin asti.<sup>3</sup> Koska kytkentäreaktiot proteiinien kanssa tehdään yleensä vesiliuoksissa, NHS-esterit täytyy ensin liuottaa veteen sekoittuvaan orgaaniseen liuottimeen, kuten asetoniin tai dimetyylisulfoksidiin.<sup>3,30</sup> Vesiliukoisuutta voidaan parantaa käyttämällä *N*-hydroksisukkinimidin sulfonoitua muotoa, *N*-hydroksisulfosukkinimidiä.<sup>4,5,30</sup> Esimerkiksi heterobifunktionaalinen SAED (sulfosukkinimidyli-2-[7-atsido-4-metyylikumariini-3-asetamido]-etyyli-1,3'-ditiopropionaatti) liukenee veteen noin 5 mM liuokseksi.<sup>11</sup> Toisaalta NHS-estereiden kytkentäreaktio lyhyiden peptidien ja muiden pienten biomolekyylien kanssa voidaan tehdä orgaanisissa liuotimissa.<sup>6</sup>

Tavallisesti NHS-esterit syntetisoidaan Andersonin *et al.*<sup>38</sup> kehittämällä disykloheksyylikarbodi-imidi- eli DCC-menetelmällä. Lähtöaineina käytetään karboksyylihappoa, *N*-hydroksisukkinimidiä ja disykloheksyylikarbodi-imidiä. Kuvassa 14 on esitetty NHS-estereiden synteesi DCC-menetelmällä. Yksinkertaisten happojen tapauksessa käytetään yhtä suuri ainemäärä happoa, *N*-hydroksisukkinimidiä ja disykloheksyylikarbodi-imidiä. Happo ja *N*-hydroksisukkinimidi liuotetaan dioksaaniin

ja jäädytettyyn (0 °C) seokseen lisätään disykloheksyylikarbodi-imidiä. Reaktioseosta pidetään jääkaapissa yön yli (0–5 °C). Sivutuotteena syntyvä disykloheksyyliurea suodatetaan ja tuote kiteytetään suodoksesta.

Liuottimena voidaan dioksaanin sijaan käyttää myös muita poolittomia liuottimia, kuten vedetöntä dimetoksietaania<sup>38</sup>, dimetyyliformamidia<sup>30,38</sup>, tetrahydrofuraania<sup>39</sup> tai dikloorimetaania<sup>37,40</sup>. Tavallisesti *N*-hydroksisukkinimidiä tai disykloheksyylikarbodi-imidiä käytetään hieman ylimäärin, esimerkiksi 1,1–1,5 ekvivalenttia hapon ainemäärään verrattuna.<sup>30,39-41</sup>



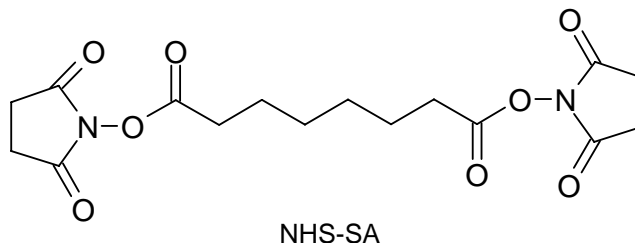
Kuva 14. *N*-hydroksisukkinimidiesterin synteisi DCC-menetelmällä.<sup>38</sup>

Inman *et al.*<sup>42</sup> ovat kehittäneet hieman erilaisen *NHS*-estereiden synteesimenetelmän, jossa käytetään polarisempaa liuotinta ja DCC:n tilalla 1,3-di-isopropyylkarbodi-imidiä. Tällöin tuote saostuu reaktioseoksesta ureajohdannaisen sijaan.

## 5.1 Homobifunktionaaliset *NHS*-esterilinkkerit

Homobifunktionaaliset *NHS*-esterilinkkerit valmistetaan esteröimällä dihapo *N*-hydroksisukkinimidillä. Esimerkiksi lohkeamaton reagenssi, suberihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteri, *NHS*-SA<sup>43</sup> syntetisoidaan suberihaposta eli oktaanidihaposta DCC-menetelmällä. Reaktiossa käytetään kaksinkertainen ainemäärä *N*-hydroksisukkinimidiä

ja disykloheksyylikarbodi-imidiä suberihappoon verrattuna. Liuottimena käytetään dioksaania. Kuvassa 15 on esitetty NHS-SA:n rakenne. NHS-SA:ta on käytetty adiposyyttien glukoositransportterin toiminnan tutkimiseen.

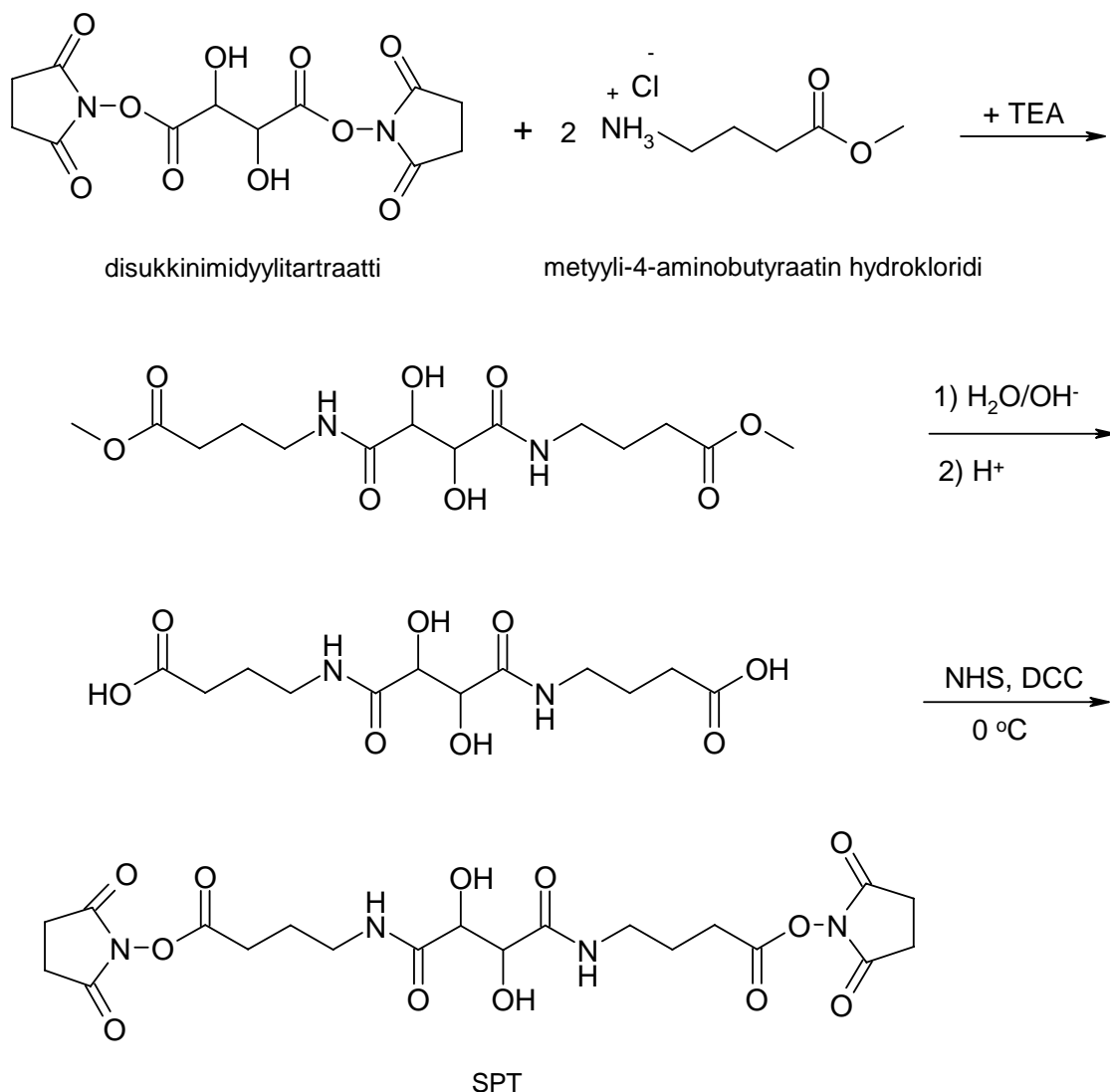


Kuva 15. Suberihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteri, NHS-SA.<sup>43</sup>

Smith *et al.*<sup>39</sup> ovat esteröineet viinihappoa *N*-hydroksisukkinimidillä, ja saaneet tuotteeksi disukkinimidyylitartraattia (DST). Linkkeri liukenee huonosti veteen, joten se täytyy liuottaa ensin DMSO:iin konjugointireaktiota varten. DST:n funktionaalisten ryhmien välinen etäisyys on noin 6 Å, ja käsivarsi voidaan katkaista perjodaattikäsittelyllä. Disukkinimidyylitartraatti syntetisoidaan viinihaposta DCC-menetelmällä. Reaktiossa käytetään yksi ekvivalentti kuivaa viinihappoa, 2,1 ekvivalenttia *N*-hydroksisukkinimidiä, ja kaksi ekvivalenttia disykloheksyylikarbodi-imidiä. Liuottimena käytetään tetrahydrofuraania. Sekoitusta jatketaan 16 tunnin ajan, jonka jälkeen disykloheksyyliurea suodatetaan, ja tuotteeksi saadaan disukkinimidyylitartraattia. DST:n rakenne on näytetty kuvassa 16.

Disukkinimidyylitartraatin reaktiota aminoryhmien kanssa käytetään hyväksi pitkäketjuisen *N,N'*-bis(3-sukkinimidylioksikarbonyylipropyli)tartaramidin (SPT) synteesissä (kuva 16).<sup>39</sup> SPT:n käsivarren pituus on noin 18 Å, ja sen vesiliukoisuus on huono kuten DST:lläkin. Disukkinimidyylitartraattia ja kaksi ekvivalenttia metyyli-4-aminobutyyraatin hydrokloridia liuotetaan tetrahydrofuraaniin ja seokseen lisätään ylimäärin emästä, trietyyliamiinia. 2–5 tunnin sekoittamisen jälkeen reaktioseos suodatetaan ja suodos konsentroidaan vakuumissa. Reaktiossa syntynyt esteri hydrolysoidaan emäksisissä olosuhteissa, jonka jälkeen liuos tehdään happamaksi ja lyofilisoidaan. Dihappo esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä kuten DST, mutta liuottimena käytetään dimetyyliformamidia.



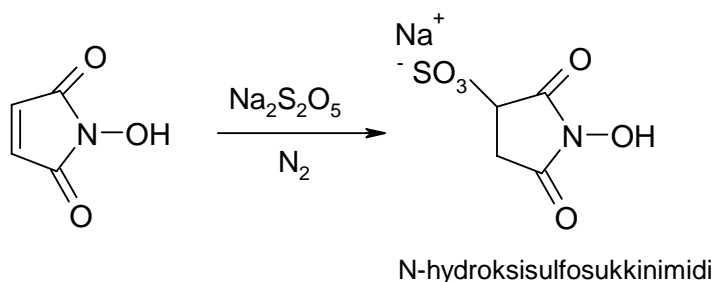


Kuva 16. Disukkinimidyylitartraatti (DST) ja *N,N'*-bis(3-sukkinimidylioksikarbonyylipropyli)tartaramidin (SPT) synteesi.<sup>39</sup>

## 5.2 Sulfonoidut NHS-esterilinkkerit

Sulfonoidut NHS-esterit liukenevat vesiliuoksiin paremmin kuin tavalliset NHS-esterit.<sup>4,5,30</sup> Niiden synteesissä käytetään *N*-hydroksisukkinimidin sijaan *N*-hydroksisulfosukkinimidin natriumsuolaa. *N*-hydroksisulfosukkinimidi eli 1-hydroksi-3-sulfo-2,5-pyrrolidiinidioni syntetisoidaan *N*-hydroksimaleimidistä ja natriummetabisulfiitista (kuva 17). Kaksi ekvivalenttia *N*-hydroksimaleimidiä liuotetaan absoluutoituun etanoliin ja sekaan lisätään yksi ekvivalentti natriummetabisulfiitin vesiliuosta. Reaktioseos suojataan typpikaasulla koko synteesin ajan. Sekoitusta

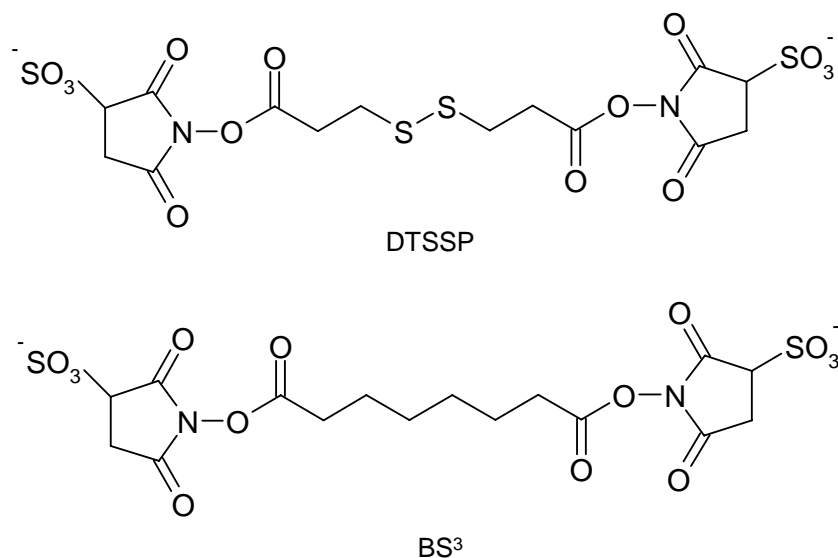
jatketaan kaksi tuntia huoneen lämpötilassa, jonka jälkeen typpi-atmosfääri poistetaan ja tuote eristetään seoksesta.<sup>30</sup>



Kuva 17. *N*-hydroksimaleimidin sulfiittolyysi *N*-hydroksisulfosukkinimidiksi. Tuote saadaan natriumsuolana.<sup>30</sup>

Esteröintireaktio *N*-hydroksisulfosukkinimidillä tehdään DCC-menetelmällä samaan tapaan kuin tavallisen *N*-hydroksisukkinimidin tapauksessa. Merkittävin ero synteesimenetelmissä on reaktiolämpötila: sulfosukkinimidillä reaktio tehdään huoneenlämpötilassa<sup>30</sup> jäähauteen sijaan<sup>38</sup>.

Esimerkiksi 3,3'-ditiobispropionihappoa ja suberihappoa on esteröity *N*-hydroksisulfosukkinimidillä (kuva 18). Reaktiossa yksi ekvivalentti happoa, kaksi ekvivalenttia *N*-hydroksisulfosukkinimidin natriumsuolaa ja 2,2 ekvivalenttia DCC:tä liuotetaan kuivaan dimetyyliformamidiin, ja reaktioseosta sekoitetaan yön yli. Seos jäähdytetään 3 °C:een ja sitä sekoitetaan vielä muutama tunti, jonka jälkeen saostunut disykloheksyyliurea suodatetaan. 3,3'-Ditiobis(sulfosukkinimidyylipropionaatti) (DTSSP) tai bis(sulfosukkinimidyylisuberaatti) (BS<sup>3</sup>) saostetaan lisäämällä etyyliasetaattia ja suodatetaan. DTSSP on ditiotreitolilla lohkeava, kalvoa läpäisemätön linkkeri. Myös BS<sup>3</sup> on kalvoa läpäisemätön, NHS-SA:n sulfonoitu analogi.<sup>30</sup>



Kuva 18. 3,3'-Ditiobis(sulfosukkinimidyylipropionaatti) DTSSP ja bis(sulfosukkinimidyylisuberaatti) BS<sup>3</sup>.<sup>30</sup>

### 5.3 Erikoistapaukset

Tässä kappaleessa esitellään kolme heterobifunktionaalista NHS-esterilinkkeriä, jotka eivät sovi edellä käytettyihin luokitteluihin. SSTN:n (meripihkahapon 3-nitro-5-(5-[1,2]ditiolan-3-yyli-pentanoyylioksi)bentsyyliesteri 2,5-diokso-pyrrolidin-1-yyli-esteri) monimutkainen rakenne sisältää erikoisen, UV-säteilyllä lohkeavan käsivarren. SSTN:llä pintaan kiinnitetyt proteiinit voidaan irrottaa fotofragmentaation avulla hyvin pieneltä, halkaisijaltaan 100–400 nm kokoiselta alueelta.<sup>40</sup> Sukkinimidyylisuberaatin (bromiasetamido)propionaatin synteesissä<sup>42</sup> on käytetty vaihtoehtoista menetelmää perinteiselle DCC-menetelmälle, ja *N*-sukkinimidyylisuberaatin<sup>37</sup> sisältää alifaattisten tiolien kanssa reagoivan pyridyyliditioryhmän.

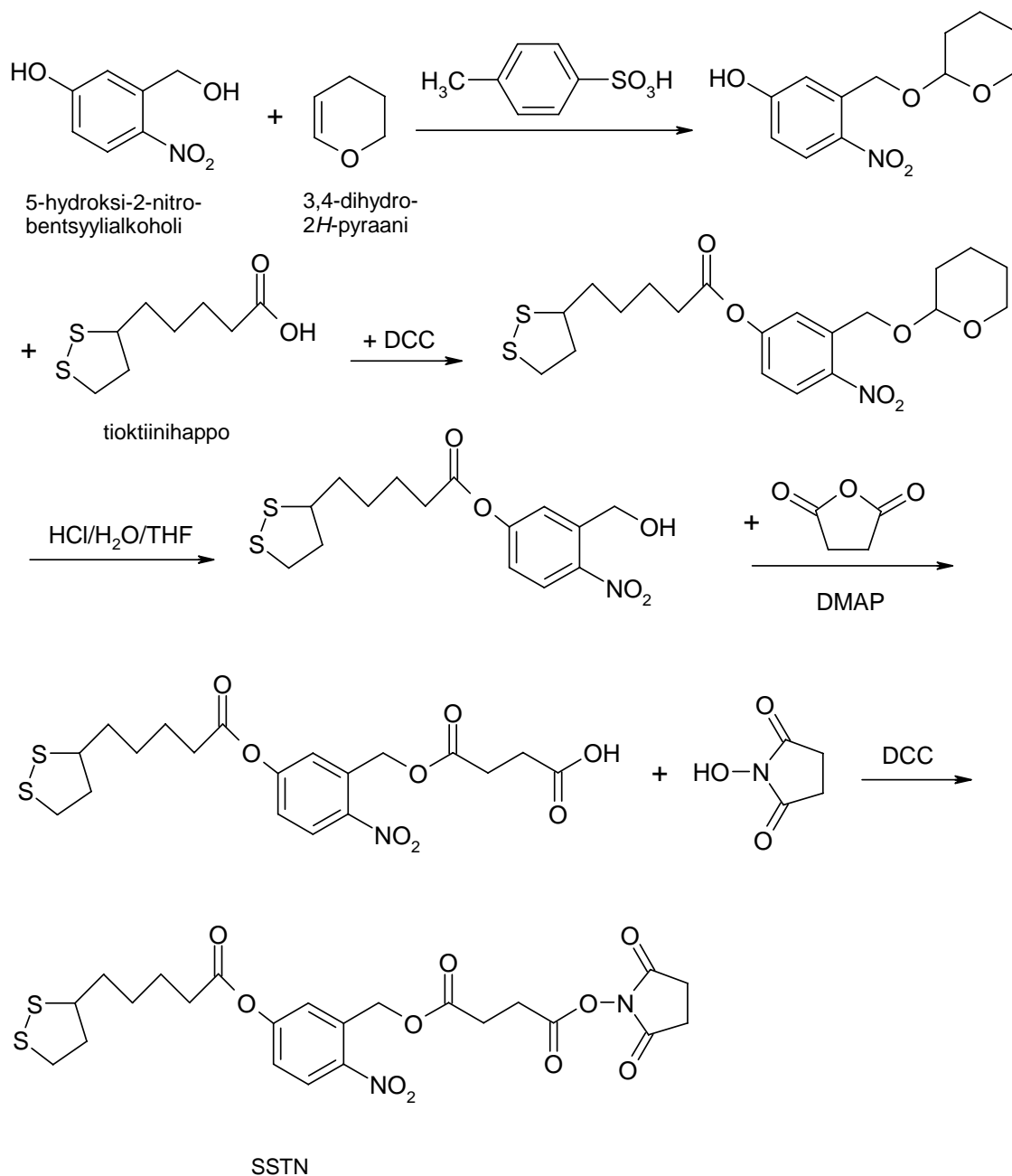
#### 5.3.1 UV-säteilyllä lohkeava SSTN

Yleensä lohkeavat linkkerit voidaan katkaista jollakin pelkistävällä tai hapettavalla reagenssilla. Kemiallisen katkaisun lisäksi on mahdollista suunnitella linkkereitä, jotka lohkeavat UV-säteilyn avulla. Esimerkiksi *o*-nitrobentsyyli-ryhmä lohkeaa nopeasti UV-säteilyn aiheuttaman fotoeksitaation seurauksena. *o*-Nitrobentsyyli-esteri muodostaa heterobifunktionaalisen reagenssin, SSTN:n, fotoaktiivisen rakenteen. SSTN:n toisessa

päässä on NHS-esteri ja toisessa disulfidiryhmä, jonka avulla linkkeri voidaan kiinnittää esimerkiksi kultapintaan.<sup>40</sup>

SSTN:n rakenteessa on kolme esterisidosta (kuva 19).<sup>40</sup> Synteesin lähtöaineena käytetään 5-hydroksi-2-nitrobentsyylialkoholia, jonka fenolinen OH-ryhmä esteröidään tioktiinihapolla eli 1,2-ditiolaani-3-pentaanikapolla ja bentsyylinen OH-ryhmä meripihkahappoanhydridillä. Jotta tioktiinihappo reagoisi selektiivisesti fenolisen OH-ryhmän kanssa, bentsyylinen OH-ryhmä suojataan 3,4-dihydro-2*H*-pyraanilla. Suojausreaktiossa käytetään katalyyttinä *p*-tolueenisulfonihappoa. Ensimmäisessä esteröintireaktiossa käytetään yksi ekvivalentti suojattua 5-hydroksi-2-nitrobentsyylialkoholia ja kaksi ekvivalenttia tioktiinihappoa ja disykloheksyylikarbodiimidiä. Reaktiot tehdään kuivassa tetrahydrofuraanissa ja reaktioastia suojataan typpikaasulla.

Bentsyylinen OH-ryhmän suojaus puretaan laimealla HCl-liuoksella, ja OH-ryhmä esteröidään meripihkahappoanhydridillä.<sup>40</sup> Reaktio tehdään dikloorimetaanissa ja lähtöaineina käytetään yksi ekvivalentti nitrobentsyyliitioktaattia, kaksi ekvivalenttia meripihkahappoanhydridiä ja puoli ekvivalenttia 4-dimetyyliaminopyridiiniä. Viimeisessä vaiheessa SSTN:n happoesiaste esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä. Reaktio tehdään DCC-menetelmällä dikloorimetaanissa. Yleisestä käytännöstä poiketen reaktiossa ei käytetä jäähaudetta, vaan seosta refluksoidaan typpiatmosfäärissä.



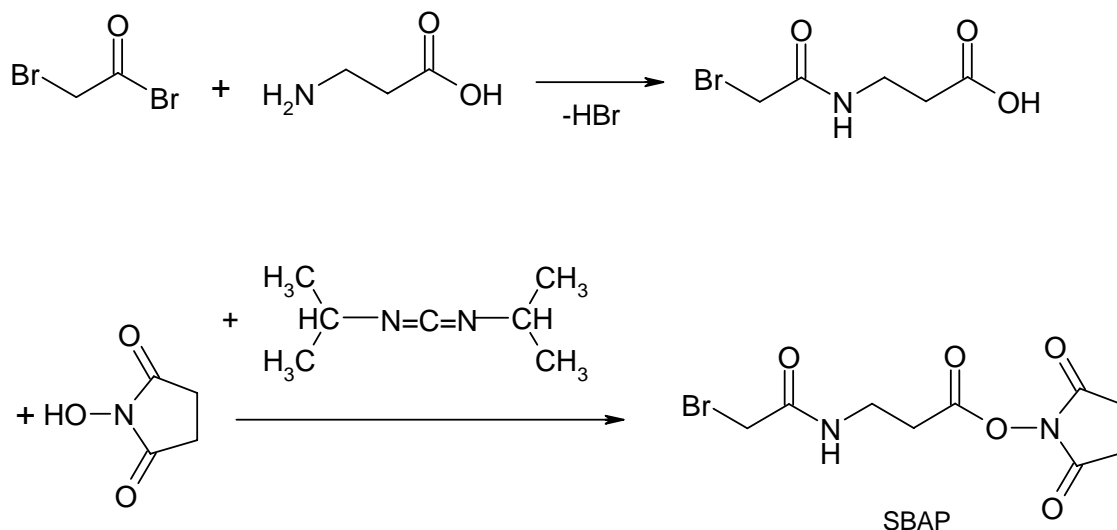
Kuva 19. SSTN:n synteisi (DMAP = dimetyyliaminopyridiini).<sup>40</sup>

### 5.3.2 NHS-esteröinti 1,3-di-isopropyylikarbodi-imidin avulla

DCC-menetelmän lisäksi NHS-esteröinti voidaan tehdä 1,3-di-isopropyylikarbodi-imidin avulla. Inman *et al.*<sup>42</sup> ovat kehittäneet menetelmän ja käyttäneet sitä sukkinimidyili-3-(bromiasetamido)propionaatin (SBAP) synteessissä. SBAP on heterobifunktionaalinen reagenssi, jonka funktionaaliset ryhmät ovat NHS-esteri ja  $\alpha$ -halokarbonyyli, joka reagoi tiolien, amino- ja karboksyyli-ryhmien kanssa<sup>5</sup>. Neutraalissa

tai heikosti emäksisessä liuoksessa  $\alpha$ -halokarbonyylit reagoivat selektiivisesti tiolien kanssa.<sup>27,42</sup> SBAP:lla on valmistettu lysiini johdannaista, jonka avulla saadaan lisättyä tiolireaktiivinen ryhmä synteettisen peptidin sekvenssiin. Reaktiivisen ryhmän avulla peptidi voidaan kiinnittää esimerkiksi proteiiniin.<sup>42</sup>

Synteesin ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan 3-(bromiasetamido)propionihappo, joka toisessa vaiheessa esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä.<sup>42</sup> SBAP:n synteesikaavio on esitetty kuvassa 20. Lähtöaineina käytetään 3-aminopropionihappo ja bromiasetyyli bromidia, jotka reagoivat vesiliuoksessa. Bromiasetyyli bromidi on hyvin myrkyllinen ja ärsyttävä kemikaali, joten synteesi tehdään vetokaapissa. Lämpötila pidetään reaktion aikana 12 °C:een alapuolella ja reaktion edetessä seokseen lisätään natriumhydroksidia neutraloimaan vapautuvaa vetybromidihappo. Toisessa vaiheessa (bromiasetamido)propionihappo liuotetaan 2-propanoliin. Huoneenlämpöiseen liuokseen lisätään 1,1 ekvivalenttia *N*-hydroksisukkinimidiä ja yksi ekvivalentti 1,3-diisopropyylikarbodi-imidiä. Noin 10 minuutin kuluttua sukkinimidyli-3-(bromiasetamido)propionaatti alkaa kiteytyä liuoksesta.



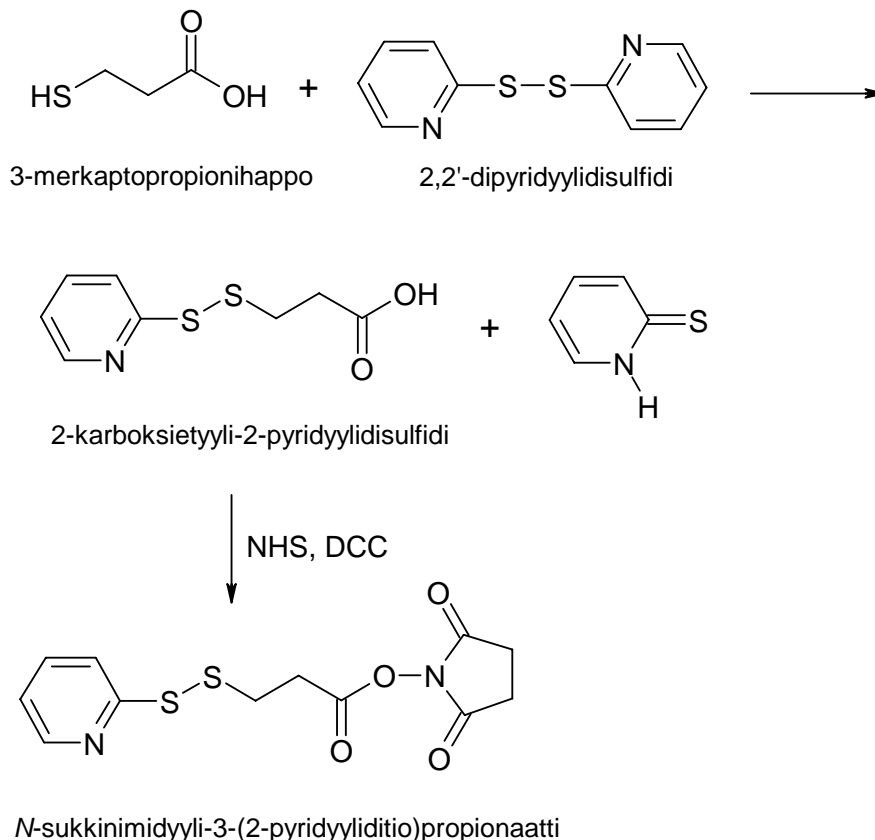
Kuva 20. Sukkinimidyli-3-(bromiasetamido)propionaatin synteesi.<sup>42</sup>

### 5.3.3 *N*-sukkinimidyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaatti

*N*-sukkinimidyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaatti eli SPDP<sup>37</sup> reagoi esteripäästään aminoryhmien ja pyridyyliditio-rakenteestaan alifaattisten tiolien kanssa. Linkkeri

syntetisoidaan kahdessa vaiheessa (kuva 21). Ensimmäisessä vaiheessa 2,2'-dipyridyylidisulfidi reagoi 3-merkaptopropionihapon kanssa tioli-disulfidivaihtoreaktiolla. 2,2'-Dipyridyylidisulfidi liuotetaan etanoliin ja liuos tehdään happamaksi jääetikalla. Liuokseen lisätään 3-merkaptopropionihappoa, ja reaktioseoksen annetaan seistä huoneenlämmössä 20 tuntia. Reaktiotuote, 2-karboksietyyli-2-pyridyylidisulfidi, esteröidään *N*-hydroksisukkinimidin ja disykloheksyylikarbodi-imidin kanssa. Reaktio tehdään alkuperäisestä DCC-menetelmästä poiketen huoneenlämmössä, ja liuottimena käytetään dikloorimetaania. Tuotteeksi saadaan *N*-sukkinimidyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaattia, jota voidaan käyttää proteiinikonjugaattien valmistamisessa tai tioliryhmien lisäämisessä proteiineihin.

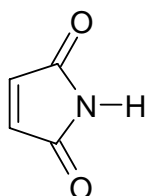
Synteesin ensimmäisen vaiheen tuote, 2-karboksietyyli-2-pyridyylisulfidi, voi myös reagoida 3-merkaptopropionihapon kanssa, jolloin syntyy 2,2'-dikarboksietyylidisulfidia. Tämä reaktio voidaan pääosin estää käyttämällä kaksinkertainen ainemäärä 2,2'-dipyridyylidisulfidia 3-merkaptopropionihappoon nähden ja lisäämällä 3-merkaptopropionihappo liuokseen pienissä erissä.<sup>37</sup>



Kuva 21. *N*-sukkinimidyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaatin eli SPDP:n synteesi.<sup>37</sup>

## 6 MALEIMIDILINKKERIT

Maleimidilinkkerit sisältävät vähintään yhden maleimidiryhmän. Kuvassa 22 on maleimidin rakennekaava. Maleimidiit reagoivat spesifisesti tiolien kanssa muodostaen tioetterisidoksen.<sup>3,6,27</sup> Maleimidiit voidaan kytkeä spesifisesti tiolien kanssa myös amiinien läsnä ollessa, koska tiolit ovat reaktiivisia neutraalissa pH:ssa toisin kuin useimmat amiinit, esimerkiksi lysiinin vapaat aminoryhmät. Ihanteellinen pH reaktiolle on 7, sillä pH:n noustessa yli 8 maleimidiit alkavat hydrolysoitua maleaamihapoiksi.<sup>6</sup> Yleensä konjugointiin käytetyissä olosuhteissa maleimidiit ovat kestävämpiä hydrolyysin suhteen kuin aminospesifiset reagenssit, kuten NHS-esterit ja imidoesterit.<sup>4</sup>



Kuva 22. Maleimidin rakenne.

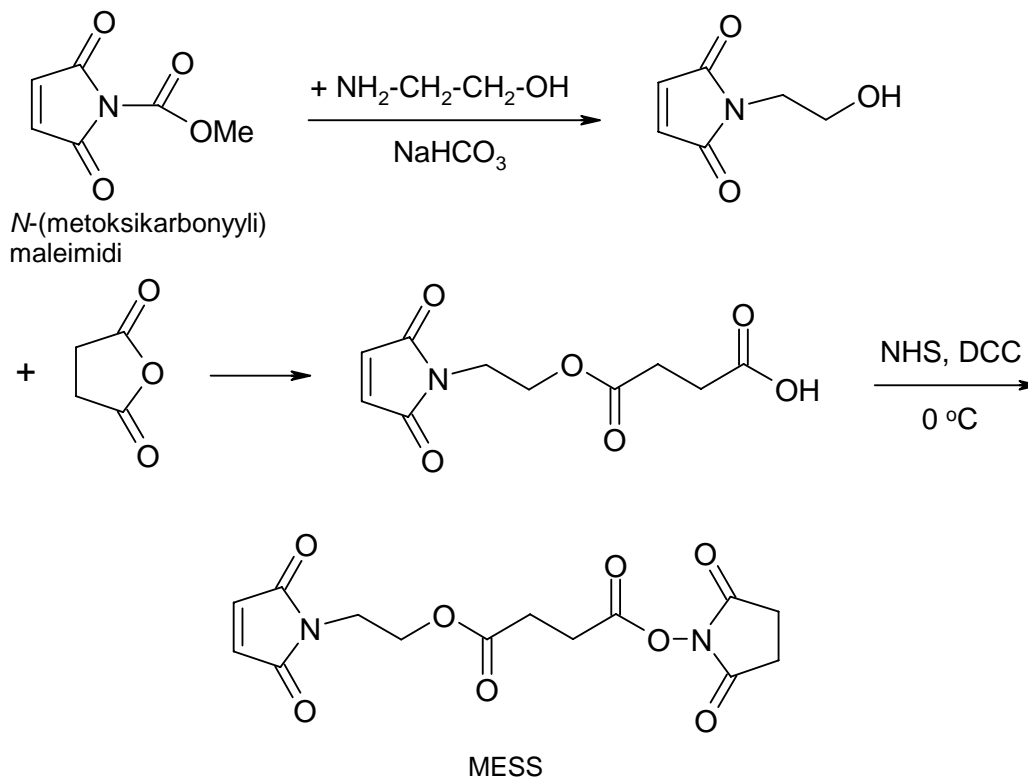
Monissa heterobifunktionaalisissa reagensseissa maleimidien tiolispesifisyys yhdistyy johonkin aminospesifiseen ryhmään, kuten NHS-esteriin.<sup>4</sup> Maleimidilinkkerit valmistetaan esimerkiksi jostakin *N*-substituoidusta maleimidijohdannaisesta, johon liitetään linkkerin käsivarsi.<sup>41</sup> Toinen tapa maleimidilinkkereiden valmistamiseksi on syntetisoida sopiva maleaamihappo, jonka rengas sulkeutuu emäskäsittelyllä muodostaen maleimidiryhmän.<sup>44</sup> Jos linkkerin toisessa päässä on vapaa happoryhmä, se voidaan esteröidä *N*-hydroksisukkinimidillä, jolloin saadaan maleimidi-NHS-esteri-linkkeri.<sup>41</sup>

### 6.1 Biologisesti hajoava maleimidilinkkeri MESS

*N*-[[4-(2-maleimidoetoksi)sukkinyyli]-oksi]sukkinimidi eli MESS on maleimidi-NHS-esteri-linkkeri, jonka käsivarressa on esterisidos.<sup>41</sup> Esteraasientsyymi pystyy pilkkomaan MESS:n rakenteen, mikä tekee linkkeristä biologisesti hajoavan. MESS:n käyttöä vasta-aine-lääkeaine-konjugaattien valmistamisessa on käsitelty luvussa 9.5. MESS valmistetaan *N*-(metoksikarbonyyli)maleimidistä, jonka metoksikarbonyyli-



ryhmä korvataan hydroksietyyliryhmällä (kuva 23). Käsivartta pidennetään esteröintireaktiolla meripihkahappoanhydridin kanssa, ja lopuksi vapaa happoryhmä esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä.

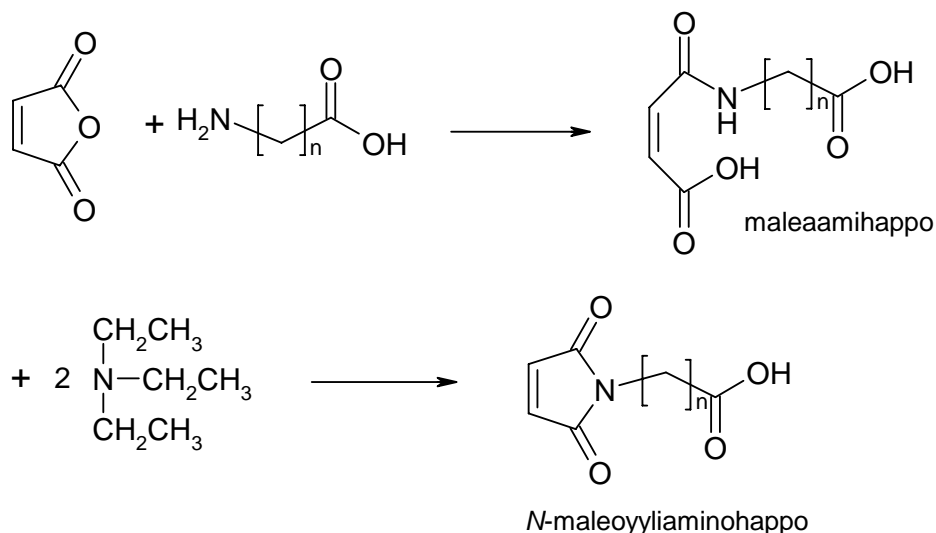


Kuva 23. *N*-[[4-(2-maleimidoetoksi)sukkinyyli]-oksi]sukkinimidin eli MESS:n synteesi.<sup>41</sup>

Synteesin ensimmäisessä vaiheessa etanoliamiinia liuotetaan  $\text{NaHCO}_3$ :lla kyllästettyyn liuokseen, ja jäädytettyyn liuokseen ( $0\text{ }^\circ\text{C}$ ) lisätään *N*-(metoksykarbonyyli)maleimidiä. Tuoteeksi saadaan *N*-(2-hydroksietyyli)maleimidiä. Toisessa vaiheessa yksi ekvivalentti *N*-(2-hydroksietyyli)maleimidiä ja neljä ekvivalenttia meripihkahappoanhydridiä liuotetaan tolueniiniin ja seosta kuumennetaan  $100\text{ }^\circ\text{C}$ :ssa neljä tuntia. Kolmannessa vaiheessa yksi ekvivalentti tuotetta ja 1,1 ekvivalenttia *N*-hydroksisukkinimidiä ja disykloheksyylikarbodi-imidiä liuotetaan kuivaan tetrahydrofuraaniin kylmähauteessa. Kahden tunnin sekoittamisen jälkeen reaktio pysäytetään lisäämällä etikkahappoa.<sup>41</sup>

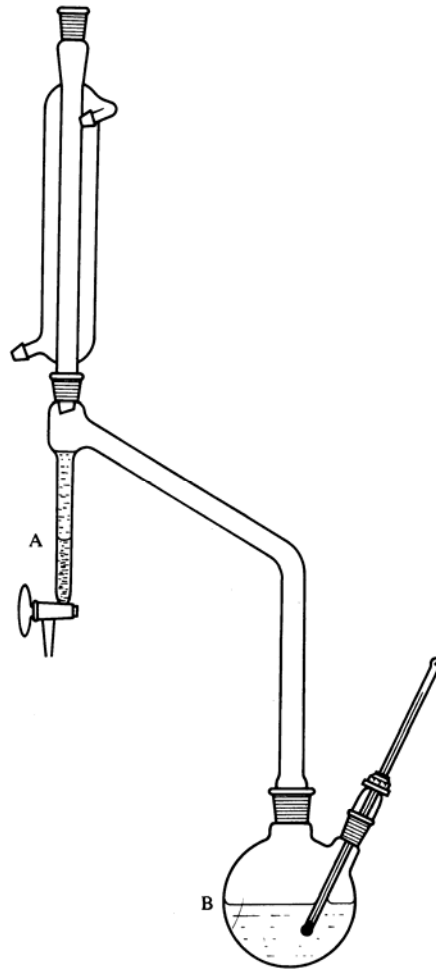
## 6.2 *N*-Maleoyyliaminohappojen synteesi

Maleimidi-ryhmä voidaan syntetisoida myös maleiinihappoanhydridistä, jonka annetaan reagoida aminohapon kanssa. Reaktiossa maleiinihappoanhydridin rengas aukeaa ja syntyy maleaamihappo. Kun maleaamihappo reagoi emäksen kanssa, rengas sulkeutuu ja tuotteeksi saadaan *N*-maleoyyliaminohappo (kuva 24).<sup>44</sup>



Kuva 24. *N*-Maleoyyliaminohappojen yleinen synteesikaavio,  $n = 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11$ .<sup>44</sup>

Rich *et al.*<sup>44</sup> ovat syntetisoineet tällä menetelmällä useita eri *N*-maleoyyliaminohappoja. Esimerkiksi *N*-maleimidoetikkahappo valmistetaan maleiinihappoanhydridistä ja glysiinistä. Lähtöaineet liuotetaan etikkahappoon, ja sekoitusta jatketaan kolme tuntia huoneenlämmössä. Reaktiossa syntyvä maleaamihappo sekoitetaan kuivaan tolueeniin ja sekaan lisätään kaksi ekvivalenttia trietyyliamiinia. Seosta refluksoidaan ja reaktiossa syntyvä vesi poistetaan Dean-Starkin-laitteella (kuva 25). Tuote vapautetaan trietyyliammoniumsuolasta suolahapolla.



Kuva 25. Kaaviokuva Dean-Starkin-laitteesta (viite 45 s. 411). Pystyjäähdyttimessä tiivistynyt veden ja liuottimen seos valuu erotusputkeen (A): orgaanista liuotinta painavampana vesi laskeutuu pohjalle putken pohjalle, ja liuotin valuu takaisin reaktiokolviin (B).

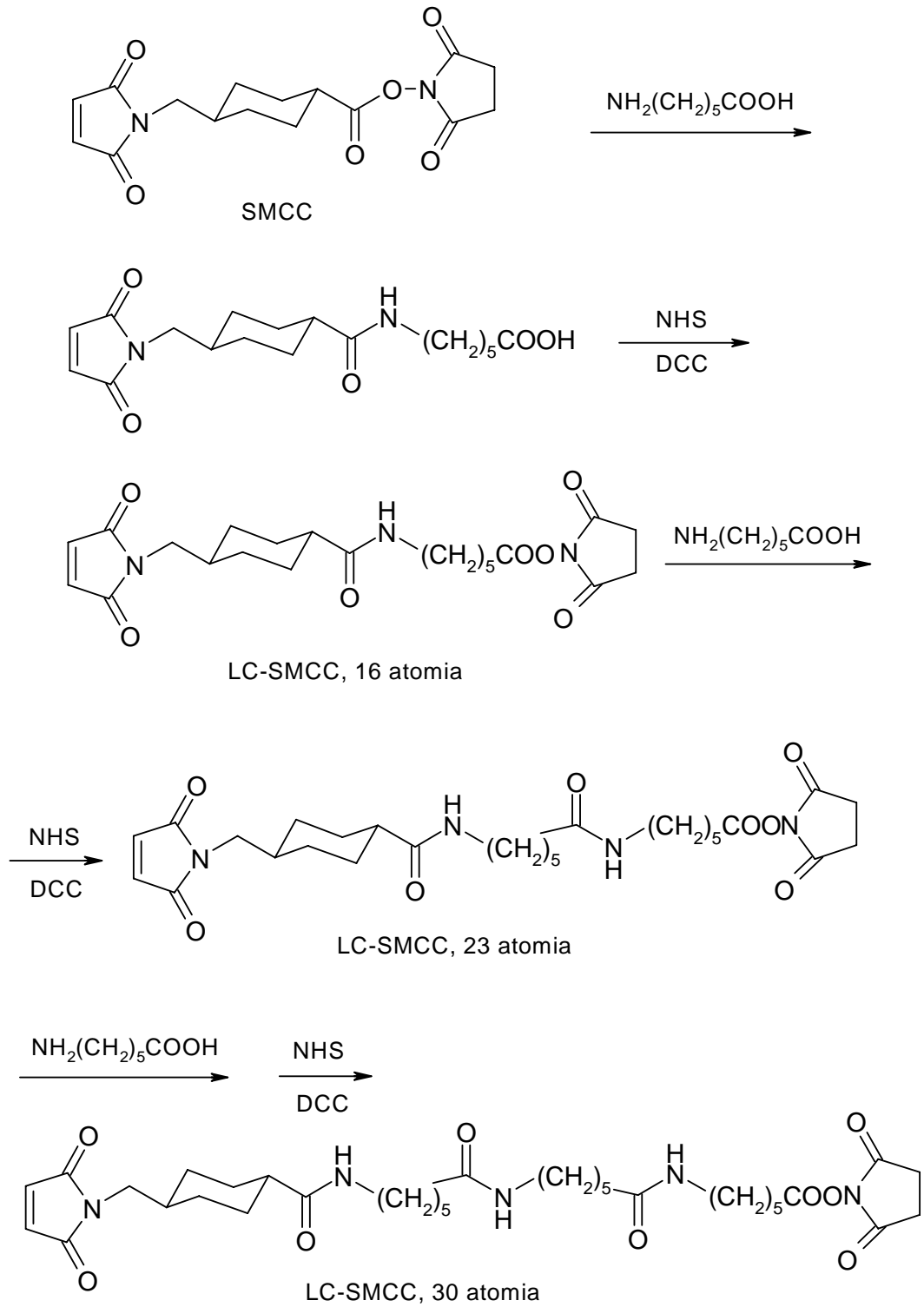
*N*-Maleoyyliamino happojen happoryhmä voidaan tarvittaessa esteröidä *N*-hydroksisukkinimidillä, jolloin saadaan maleimidi-NHS-esteri-linkkereitä, sillä esteröintimenetelmä soveltuu käytännöllisesti katsoen mille tahansa molekyylille, joka sisältää happoryhmän.<sup>6</sup> Maleimidi-NHS-esteri-linkkereitä on käytetty muun muassa DNA-koettimien ja vasta-aine-entsyymi-konjugaattien valmistamiseen, sekä proteiinien kovalenttiseen kiinnittämiseen pii-pinnalle.<sup>2,7,46</sup>

### 6.3 Pitkäketjuinen maleimidilinkkeri

Heterobifunktionaalista maleimidi-NHS-esteri-linkkeriä, sukkinimidyyli-4-(*N*-maleimidometyyli)sykloheksaani-1-karboksylaattia eli SMCC:tä, on käytetty entsyymi-vasta-ainekonjugaattien valmistamisessa. Tyypillisiä vasta-aineisiin kiinnitettäviä entsyymejä ovat piparjuuriperoksidaasi<sup>2</sup> ja alkalinen fosfataasi<sup>1</sup>. Linkkerin käsivarren pituus vaikuttaa konjugaatin biologiseen aktiivisuuteen. Bieniarz *et al.*<sup>1</sup> ovat havainneet, että kun linkkeriä pidennetään 9 atomista 30 atomiin, konjugoidun vasta-aineen sitoutuminen antigeeniin paranee merkittävästi, koska konjugoinnin aiheuttamat steriset esteet antigeenin tunnistamisalueella vähenevät.

SMCC:n NHS-esteripää reagoi 6-aminoheksaanihapon kanssa muodostaen amidisidoksen. Kun vapaa happoryhmä esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä, saadaan seitsemällä atomilla pidennetty heterobifunktionaalinen linkkeri.<sup>1</sup> Synteesin kaksi vaihetta tehdään yhdessä astiassa välituotetta eristämättä (kuva 26). Yksi ekvivalentti SMCC:tä liuotetaan kuivaan dimetyyliformamidiin ja liuokseen lisätään yksi ekvivalentti 6-aminoheksaanihappoa. Reaktioseos suojataan typpikaasulla, ja sekoitusta jatketaan huoneenlämpötilassa 12 tuntia. Toisessa vaiheessa seokseen lisätään yksi ekvivalentti disykloheksyylikarbodi-imidiä ja *N*-hydroksisukkinimidiä. Sekoitusta jatketaan kuusi tuntia huoneenlämpötilassa. Saostuva disykloheksyyliurea suodatetaan ja suodoksesta eristetään pitkäketjuinen SMCC eli LC-SMCC.

Reaktiosykli toistetaan kaksi kertaa käyttäen lähtöaineena edellisen syklin tuotetta.<sup>1</sup> Jokaisella kierroksella linkkeri pitenee seitsemällä atomilla. Ensimmäisen syklin tuote on 16-atominen, toisen syklin tuote 23-atominen ja kolmannen syklin tuote 30-atominen LC-SMCC (kuva 26).

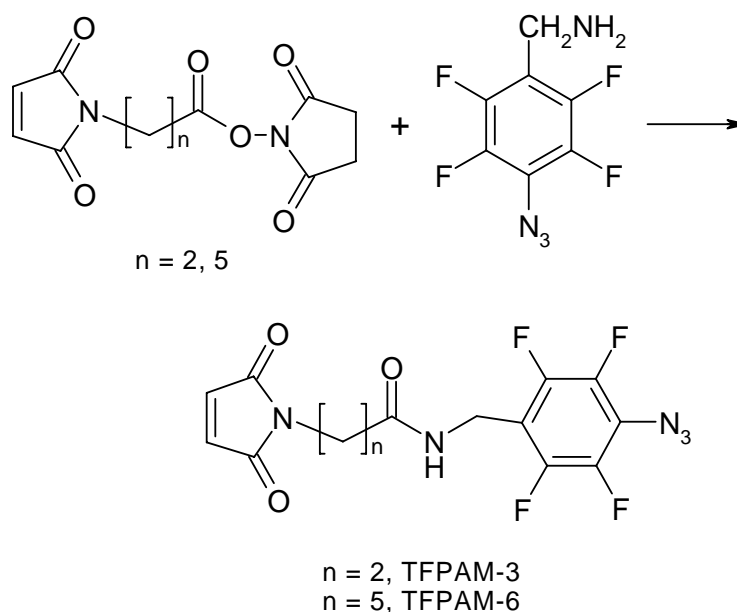


Kuva 26. Pitkätetjuisen LC-SMCC:n synteesi sukkinimidyyli-4-(*N*-maleimidometyyli)sykloheksaani-1-karboksylaattista (SMCC).<sup>1</sup>

## 6.4 Maleimidi-atsidi-linkkerit TFPAM-3 ja TFPAM-6

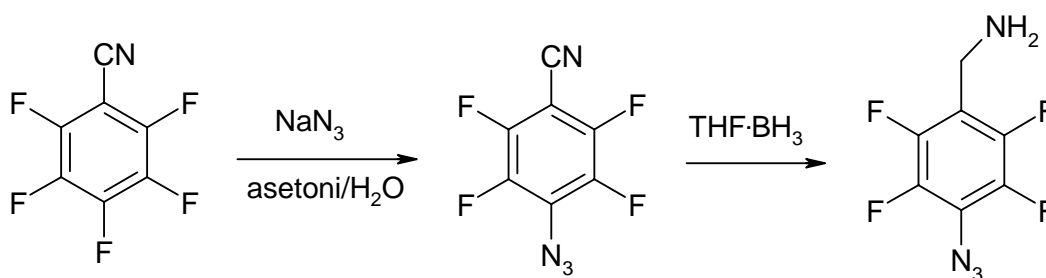
Maleimidi-atsidi-linkkeri TFPAM-3 eli *N*-(4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyli)-3-maleimidopropionamidi valmistetaan *N*-sukkinimidyli-3-maleimidopropionaatista, jonka aktivoitu esteriryhmä vaihdetaan fluoratuksi aryyliatsidiksi.<sup>47</sup> Perfluorofenyliatsidit reagoivat C–H- ja N–H-sidosten kanssa tavallisia aryyliatsideja ja nitroaryyliatsideja tehokkaammin. Syitä tähän ovat todennäköisesti nitreenin reaktiivisuuden kasvu ja molekyylin sisäisen renkaanlaajenemisen väheneminen.<sup>47,48</sup> TFPAM-3:a on käytetty DNA:ta monistavan polymeraasientsyymin ja sen toimintaan liittyvien multiproteiinikompleksien kolmiulotteisen rakenteen tutkimiseen (luku 9.3). Linkkerin maleimidipää reagoi tutkittavan proteiinin kysteinitähteen kanssa, ja fotolyysin jälkeen atsidiryhmä reagoi lähistöllä olevan kovalenttisen sidoksen kanssa.<sup>49</sup>

TFPAM-3 valmistetaan liuottamalla kloroformiin *N*-sukkinimidyli-3-maleimidopropionaatia, 1,1 ekvivalenttia 4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyliamiinin hydrokloridia ja kaksi ekvivalenttia trietyyliamiinia.<sup>47</sup> Sekoitusta jatketaan huoneenlämmössä 16 tunnin ajan. Samalla menetelmällä voidaan syntetisoida *N*-(4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyli)-3-maleimidoheksanamidi (TFPAM-6), kun lähtöaineina käytetään *N*-sukkinimidyli-6-maleimidoheksanoaattia ja 4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyliamiinin vapaata emästä. Reaktiokaavio on kuvassa 27.



Kuva 27. *N*-(4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyli)-3-maleimidopropionamidin (TFPAM-3) ja *N*-(4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyli)-3-maleimidoheksanamidin (TFPAM-6) synteisi.<sup>47</sup>

Kuvassa 27 esitetyssä reaktiossa toisena lähtöaineena käytettävä 4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyliamiini valmistetaan pentafluorobentsonitriilistä, jonka annetaan reagoida natriumatsidin kanssa asetoni-vesiliuoksessa.<sup>48</sup> Reaktiokaavio on esitetty kuvassa 28. Reaktiossa syntyvä 4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsonitriili pelkistetään boraani-tetrahydrofuraanilla (THF·BH<sub>3</sub>) 4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyliamiiniksi. Pelkistysreaktion aikana reaktioastiaa suojataan valolta alumiinifoliolla.

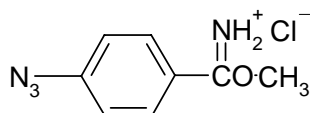


Kuva 28. 4-Atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyliamiinin synteesi.<sup>48</sup>

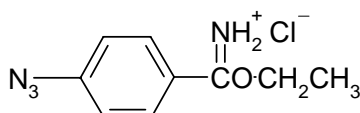
## 7 ATSIDI-IMIDAATTI-LINKKERIT

Heterobifunktionaaliset reagenssit, joissa toinen ryhmä on valoaktivoituvaa, muodostavat suuren ja käyttökelpoisen linkkeriryhmän erityisesti proteiinien vuorovaikutusten tutkimiseen. Linkkerin toinen pää, esimerkiksi aminospesifinen imidoesteri, reagoi ensin pimeässä ja sen jälkeen linkkerin toinen pää, yleensä aryyliaatsidi, aktivoidaan sopivalla valolla.<sup>3,4</sup>

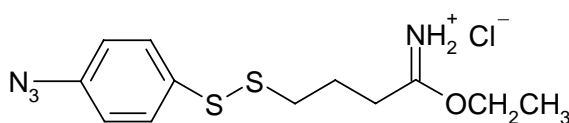
Atsidi-imidaatti-linkkerit valmistetaan lähtöaineista, jotka sisältävät aromaattisen amiiniryhmän ja nitriliryhmän. Funktionaaliset ryhmät voivat olla samassa molekyyllisessä tai kahdessa eri molekyyllisessä, jotka liitetään toisiinsa. Atsidi-ryhmä syntetisoidaan ensin aniliinista diatsotointireaktiolla ja substituutiolla natriumatsidin kanssa aryyliaatsidien yhteydessä esitetyllä menetelmällä (luku 3.1). Toisessa vaiheessa imidaattiryhmä syntetisoidaan nitrilistä reaktiolla HCl:n ja alkoholin kanssa imidoestereiden yleisellä synteessimenetelmällä (luku 4). Atsidi-imidaatti-linkkereiden valmistuksessa ja säilytyksessä täytyy huomioida atsidi-ryhmän herkkyys valolle ja kuumuudelle sekä imidoestereiden kosteusherkkyyttä.<sup>16,21</sup> Kuvassa 29 on esitetty atsidi-imidaatti-linkkereiden rakenteet.



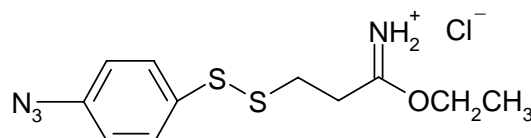
metyyli-4-atsidobentsoimidaatti



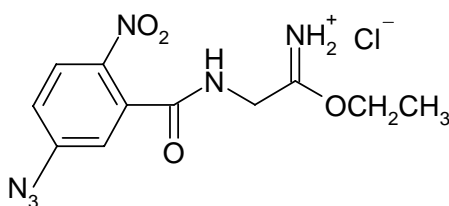
etyyli-4-atsidobentsoimidaatti



etyyli-4-[(4-atsidofenyli)ditio]butyrimidaatti



metyyli-3-[(4-atsidofenyli)ditio]propionimidaatti



etyyli-N-5-atsido-2-nitrobentsoyyliaminoasetimidaatti

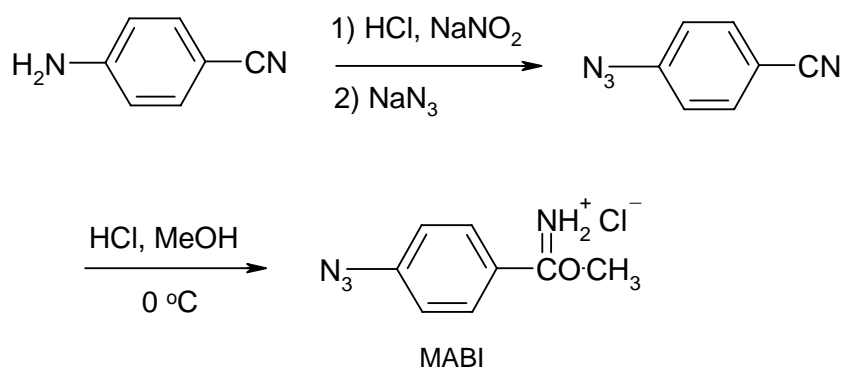
Kuva 29. Atsidi-imidaatti-linkkerit: ylärivillä MABI ja EABI, keskellä EADB ja MADP, ja alarivillä ANB-AI.<sup>16,17,20,21,50</sup>



## 7.1 Lohkeamattomat linkkerit

Kaksi rakenteeltaan yksinkertaista atsidi-imidaatti-linkkeriä, metyyli-4-atsidobentsoimidaatti (MABI)<sup>16</sup> ja etyyli-4-atsidobentsoimidaatti (EABI)<sup>17,21</sup> syntetisoidaan 4-aminobentsonitriilistä. Reaktion ensimmäisessä vaiheessa 4-aminobentsonitriili liuotetaan väkevään suolahappoliuokseen ja jäädytettyyn seokseen lisätään natriumnitriittiliuosta. Diatsotoituun seokseen lisätään natriumatsidia, ja saostuva 4-atsidobentsonitriili suodatetaan. MABI:n ja EABI:n synteeseissä ylimääräistä typpihapoketta ei poisteta urealla ennen natriumatsidin lisäystä, mikä on yleinen käytäntö vastaavissa diatsotointireaktioissa. Natriumnitriittiä ja natriumatsidia käytetään reaktiossa ylimäärin, noin kaksi ekvivalenttia 4-aminobentsonitriilin määrään verrattuna.

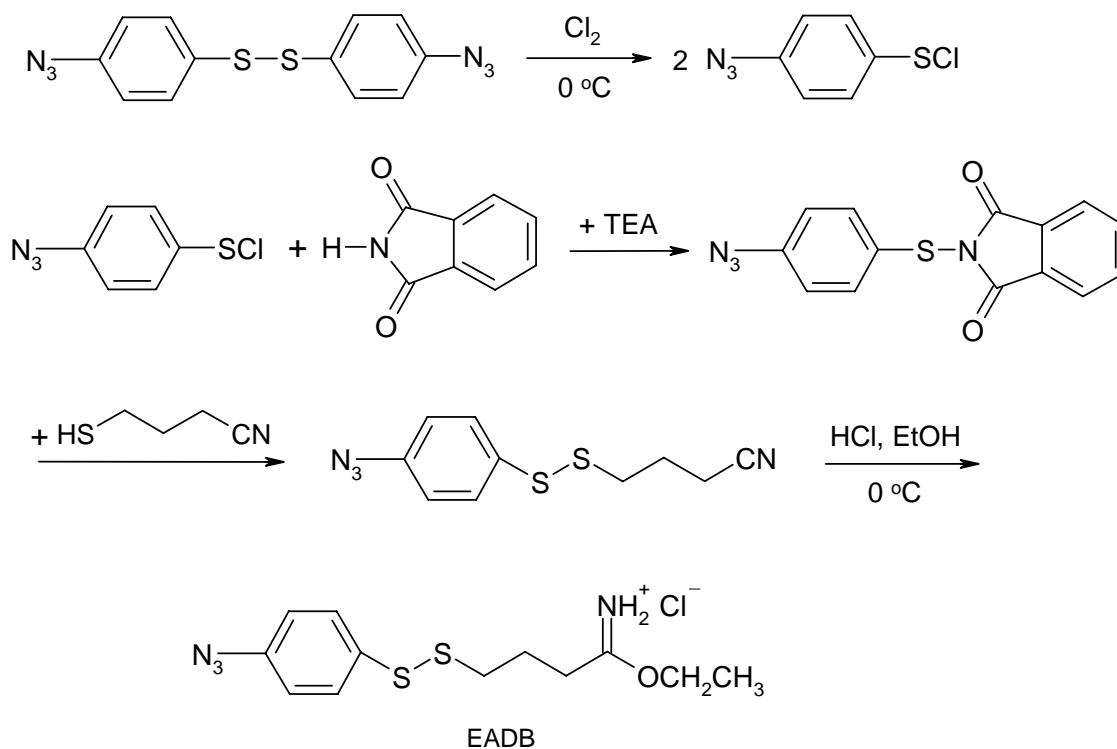
Nitriiliryhmä muutetaan imidaatiksi kuivan HCl-kaasun avulla. Liuottimena käytetään kuivaa eetteriä ja alkoholia, MABI:n tapauksessa kuivaa metanolia. Reaktiossa HCl-kaasua johdetaan jäähautteessa olevaan seokseen puolen tunnin ajan, ja reaktioastia jätetään yön yli  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :een. Saostunut tuote suodatetaan.<sup>16</sup> Kun alkoholiksi valitaan etanoli, saadaan tuotteeksi etyyli-4-atsidobentsoimidaattia (EABI).<sup>17</sup> Synteesi voidaan tehdä myös pelkässä etanoliliuoksessa, johon lisätään eetteriä reaktion jälkeen tuotteen saostamiseksi.<sup>21</sup> MABI:n synteesikaavio on kuvassa 30.



Kuva 30. Metyyli-4-atsidobentsimidaatin synteesikaavio.<sup>16</sup>

## 7.2 Lohkeavat linkkerit

Kiehm ja Ji<sup>17</sup> ovat syntetisoineet lohkeavan atsidi-imidaatti-linkkerin, etyyli-4-[(4-atsidofenyyliditio]butyrimidaatin (EADB), ja käyttäneet molekyyliä kalvoproteiinien konjugoimiseen salamafotolyysin (flash-fotolyysi) avulla. Salamafotolyysissä atsidiryhmä aktivoidaan noin 1 ms kestäväällä valon välähdyksellä, jolloin konjugointi tapahtuu erittäin nopeasti, ja reaktiotuotteiden analysointi helpottuu. Synteesin lähtöaineena käytetään 4,4'-ditiobisfenyyliatsidia, jonka valmistusta on käsitelty atsidien yhteydessä (luku 3.1). Disulfidista valmistetaan *N*-[(4-atsidofenyylitio]ftaaliimidiä Behforouzin ja Kerwoodin menetelmällä<sup>51</sup>. Ensimmäisessä vaiheessa 4,4'-atsidofenyylidisulfidin annetaan reagoida kloorikaasun kanssa 0 °C:ssa, jolloin reaktiossa syntyy sulfenyylidikloridia. Seuraavassa vaiheessa sulfenyylidikloridi muodostaa ftaaliimidin kanssa sulfenimidin, *N*-(4-atsidofenyylitio)ftaaliimidin. Reaktiossa käytetään kaksi ekvivalenttia ftaaliimidiä 4,4'-ditiobisfenyyliatsidiin verrattuna ja 2,4 ekvivalenttia trietyyliamiinia, joka neutraloi syntyvää happoa. *N*-(4-atsidofenyylitio)ftaaliimidi liuotetaan bentseeniin 4-merkaptobutyronitriilin kanssa, ja seosta refluksoidaan kolmen tunnin ajan. Refluksoinnin aikana ftaaliimidi saostuu liuoksesta, koska se ei liukene bentseeniin<sup>20</sup>. Nitriiliryhmä muutetaan imidaatiksi käsittelemällä sitä HCl-kaasulla etanoli-etteri-seoksessa. Tuotteen annetaan saostua -20 °C:ssa ennen suodattamista. EADB:n synteesikaavio on esitetty kuvassa 31.



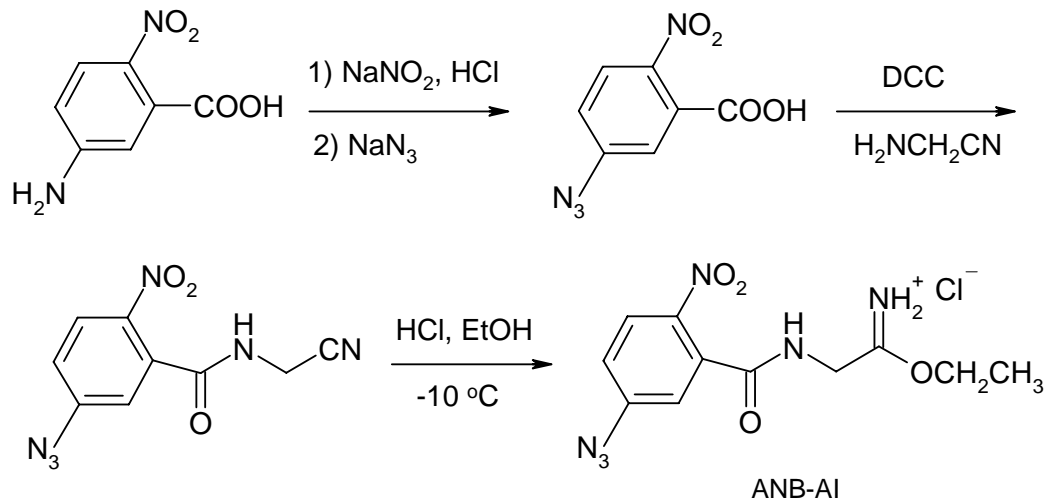
Kuva 31. Etyyli-4-[(4-atsidofenyyliditio)butyrimidaatin synteesi.<sup>17</sup>

Metyyli-3-(4-atsidofenyyliditio)propionimidaattia (MADP) voidaan valmistaa samalla menetelmällä kuin EADB:a, kun reagensseina käytetään 4-merkaptobutyronitriilin sijaan 3-merkaptobutyronitriiliä ja synteesin viimeisessä vaiheessa etanolin tilalla metanolia.<sup>20,50</sup> 3-Merkaptopropionitriilin synteesikaavio on esitetty kuvassa 11 (luku 4.2), ja samalla synteesimenetelmällä voidaan valmistaa myös 4-merkaptobutyronitriiliä.<sup>17</sup>

### 7.3 Nitrosubstituoitu atsidi-imidaatti-linkkeri ANB-AI

Lewis *et al.*<sup>21</sup> ovat syntetisoineet nitrosubstituoidun aryyliatsidin, etyyli-*N*-5-atsido-2-nitrobentsoyyliminoasetimidaatin (ANB-AI). Lähtöaineena käytetään 5-amino-2-nitrobentsoehappoa, jonka aminoryhmä muutetaan atsidiksi diatsotointireaktiolla ja substituutioreaktiolla natriumatsidin kanssa. Reaktio tehdään jää-metanolihauteessa  $-10-0$  °C lämpötilassa. Ennen natriumatsidin lisäämistä seokseen lisätään jäätikkoa. Atsidin muodostumisen jälkeiset reaktiovaiheet tehdään valolta suojatussa astiassa. Muodostuneen atsidin happoryhmä reagoi toisessa vaiheessa aminoasetonitriilin kanssa muodostaen amidisidoksen. Reaktio tehdään kuivassa dioksaanissa

disykloheksyylikarbodi-imidin avulla. Disykloheksyyliurea suodatetaan ja suodoksesta eristetään *N*-5-atsido-2-nitrobensoyyliaminoasetonitriili. Nitriili muutetaan imidaatiksi etanolin ja HCl-kaasun avulla. ANB-AI:n synteesikaavio on kuvassa 32.

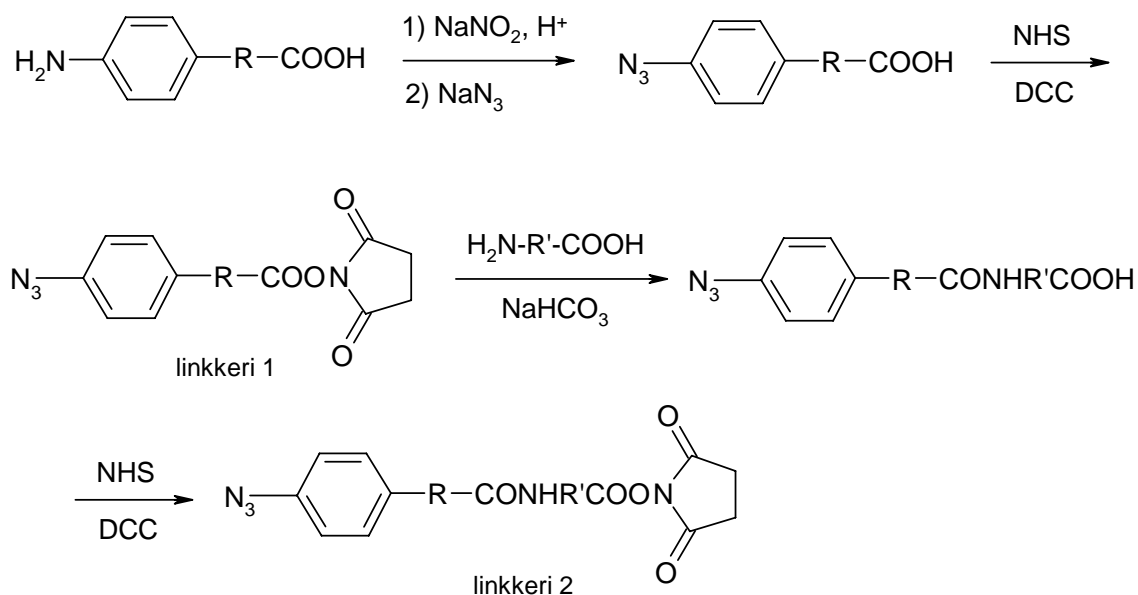


Kuva 32. Etyyli-*N*-5-atsido-2-nitrobensoyyliaminoasetimidaatin synteesi.<sup>21</sup>

## 8 ATSIDI-NHS-ESTERI-LINKKERIT

Atsidi-NHS-esteri-linkkerit muodostavat suuren heterobifunktionaalisten reagenssien ryhmän, jossa NHS-esteripää reagoi spesifisesti aminoryhmien kanssa ja atsidiryhmä reagoi valoaktivoinnin jälkeen lähellä olevan kovalenttisen sidoksen kanssa<sup>4,14</sup>. Atsidi-NHS-esteri-linkkerit muistuttavat reaktiivisuudeltaan atsidi-imidaatti-linkkereitä, mutta NHS-esterit eivät ole yhtä herkkiä hydrolyysille kuin imidoesterit<sup>30</sup>.

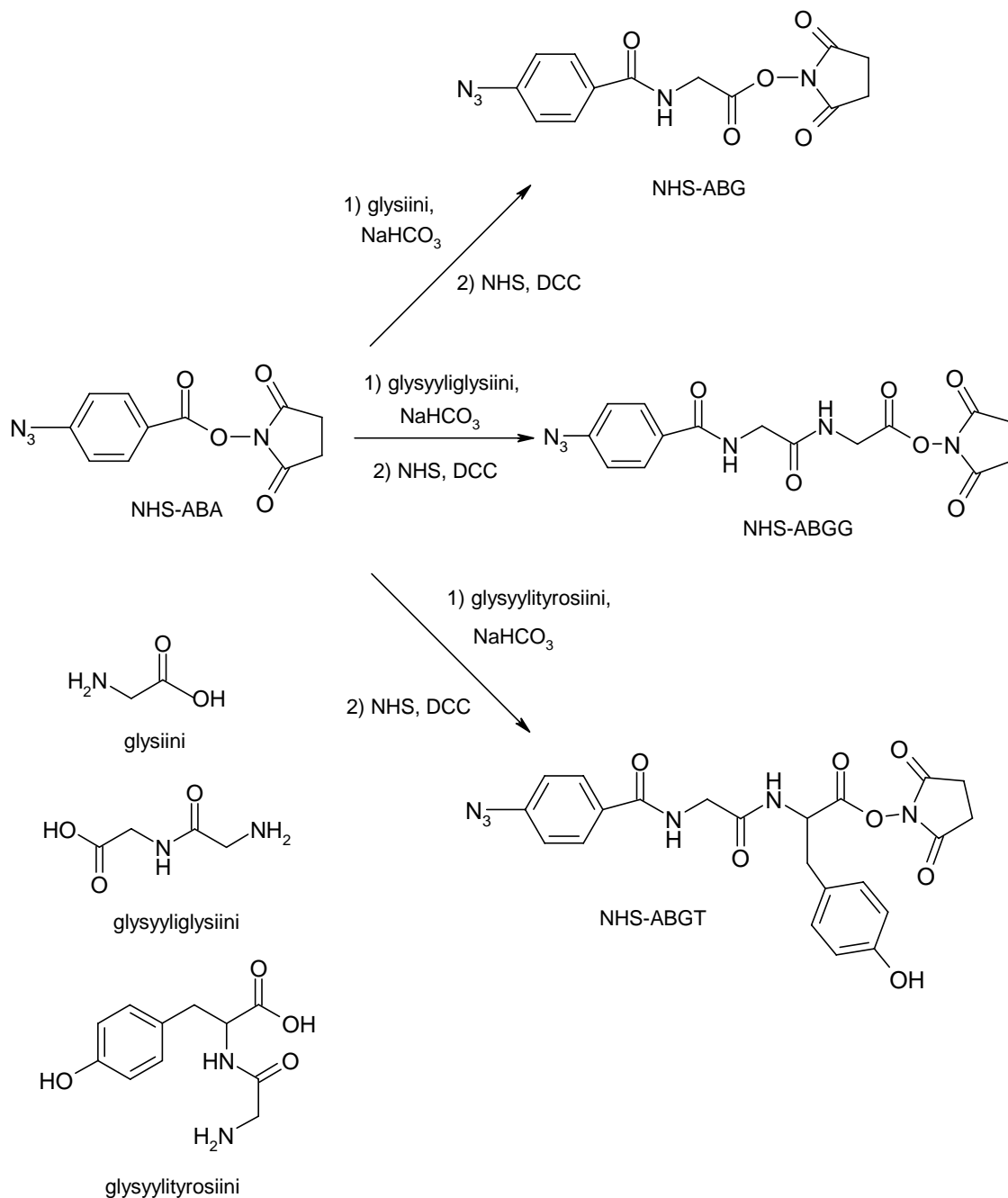
Atsidi-NHS-esteri-linkkereiden lähtöaineena käytetään usein aminobentsoehappoa. Aminoryhmä muutetaan atsidiksi diatsotointireaktiolla ja natriumatsidilla (luku 3.1). Karboksyylihappo esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä NHS-esterilinkkereiden yhteydessä esitetyllä DCC-menetelmällä (luku 5). Kahden reaktion synteesillä saadun linkkerin käsivartta voidaan pidentää aktivoituneen esterin reaktiolla aminohapon kanssa, jonka jälkeen happoryhmä esteröidään jälleen *N*-hydroksisukkinimidillä. Kuvassa 33 on esitetty yleinen reaktiokaavio atsidi-NHS-esteri-linkkereille.<sup>24,50,52-54</sup>



Kuva 33. Yleinen reaktiokaavio atsidi-NHS-esteri-linkkereille. Linkkeri 1 on yksinkertainen atsidi-NHS-esteri-linkkeri, linkkeri 2 on pidennetty linkkeri.<sup>52</sup>

NHS-ABA eli 4-atsidobentsoehapon *N*-hydroksisukkinimidiesteri<sup>50,52</sup> on yksinkertainen atsidi-NHS-esteri-linkkeri. Se valmistetaan kuvassa 33 esitetyn menetelmän mukaan 4-aminobentsoehaposta. Diatsotointi tehdään joko rikkihappo- tai suolahappoliuoksessa. NHS-esteröinti tehdään jäähauteella disykloheksyylikarbodi-imidin avulla. Liuottimena

käytetään kuivaa asetonia tai dioksaania. NHS-ABA toimii lähtöaineena monille pidennetyille atsiidi-NHS-esteri-linkkereille<sup>24,53,54</sup>, ja sen rakenne on esitetty kuvassa 34.



Kuva 34. 4-Atsidobentsooyliglysiinin *N*-hydroksisukkinimidiesterin (NHS-ABG), 4-atsidobentsooyliglysiyliiglysiinin *N*-hydroksisukkinimidiesterin (NHS-ABGG) ja 4-atsidobentsooyliglysiylyityrosiinin *N*-hydroksisukkinimidiesterin (NHS-ABGT) synteesi.<sup>24,53,54</sup>

4-Atsidobentsoehapon *N*-hydroksisukkinimidiesteri reagoi glysiinin aminoryhmän kanssa emäksisissä olosuhteissa muodostaen 4-atsidobentsooyliglysiiniä. NHS-ABA

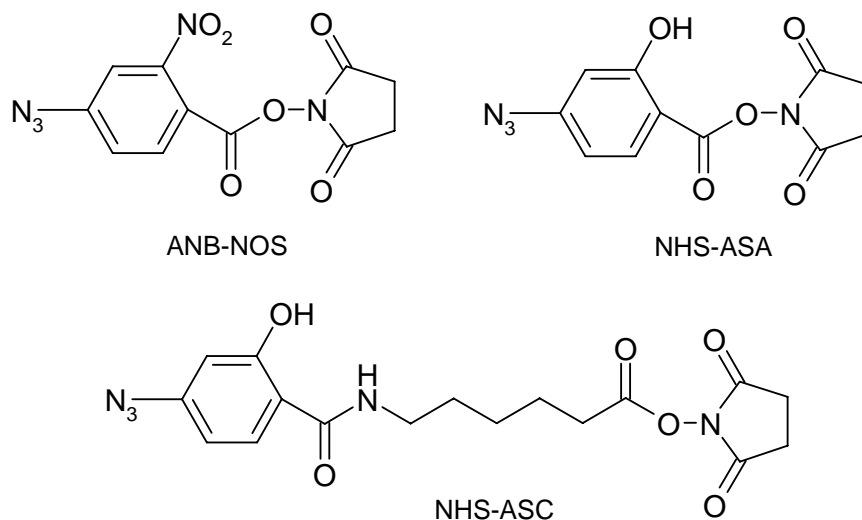
liuotetaan dioksaaniin ja liuokseen lisätään glysiiniä natriumbikarbonaattiliuoksessa. Kun 4-atsidobentsooyyliglysiini esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä DCC-menetelmällä<sup>38</sup>, tuotteeksi saadaan 4-atsidobentsooyyliglysiinin *N*-hydroksisukkinimidi-esteriä (NHS-ABG), jonka rakenne on kuvassa 34.<sup>53,54</sup>

NHS-ABG:n lisäksi tunnetaan 4-atsidobentsooyyliglysyylityrosiinin *N*-hydroksisukkinimidiesteri (NHS-ABGT)<sup>24</sup> ja 4-atsidobentsooyyliglysyyliglysiinin *N*-hydroksisukkinimidiesteri (NHS-ABGG)<sup>53</sup>. NHS-ABGT:n synteesissä käytetään glysiinin tilalla glysiinityrosiinia ja NHS-ABGG:n synteesissä glysyyliglysiiniä. Linkkereiden rakenteet ovat kuvassa 34.

## 8.1 Nitro- ja hydroksyyli-substituoidut aryyliatsidit

Nitro- tai hydroksyyli-substituoitujen atsidi-NHS-esteri-linkkereiden lähtöaineena käytetään aminonitrobentsoehappoa tai aminosalisyylihappoa.<sup>21,24</sup> Esimerkiksi *N*-5-atsido-2-nitrobentsooylioksisukkinimidi (ANB-NOS)<sup>21</sup> valmistetaan 5-amino-2-nitrobentsoehaposta kuvassa 33 esitetyn menetelmän mukaan. Ensimmäisessä vaiheessa aminoryhmä muutetaan atsidiksi diatsotoimalla ja substituutiolla natriumatsidin kanssa  $-10-0$  °C lämpötilassa. Toisessa vaiheessa happoryhmä esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä disykloheksyylikarbodi-imidin avulla huoneenlämmössä. Liuottimena käytettävään dioksaaniin lisätään kuivausaineksi magnesiumsulfaattia, joka suodatetaan pois, kun lähtöaine eli 5-atsido-2-nitrobentsoehappo on liuennut. Linkkerin rakenne on esitetty kuvassa 35.

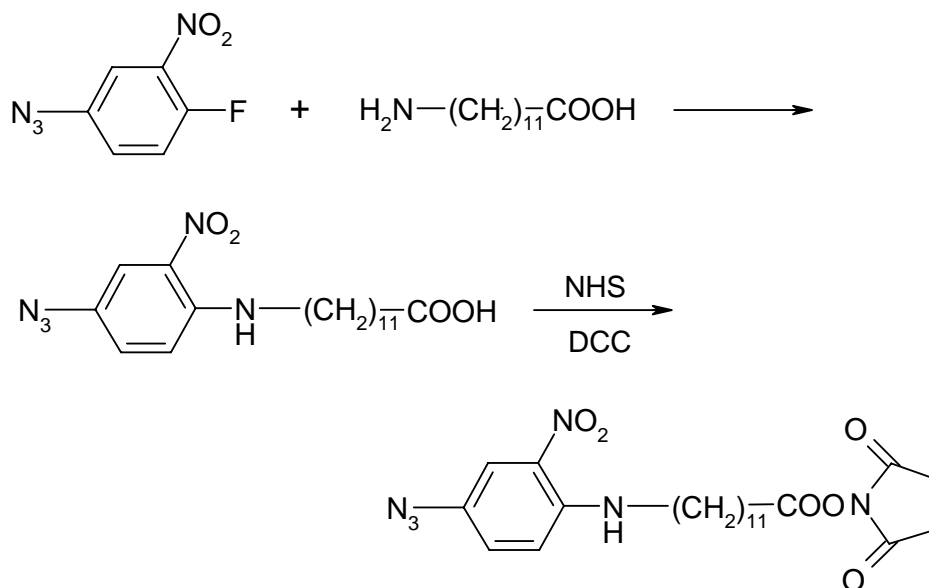
NHS-ABA:n salisyylihappon analogi NHS-ASA<sup>24</sup> valmistetaan 4-aminosalisyylihaposta kuvassa 33 esitettyllä menetelmällä. NHS-ASA:a eli 4-atsidosalisyylihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteriä voidaan pidentää reaktiolla aminohapon kanssa. Reaktiossa käytetään samaa menetelmää kuin NHS-ABG:n<sup>53,54</sup> synteesissä (kuva 34). Kun 6-aminoheksaanihappo reagoi NHS-ASA:n esteripään kanssa, syntyy *N*-(4-atsidosalisyyli)-6-aminoheksaanihappoa, joka esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä. Tuotteeksi saadaan *N*-(4-atsidosalisyyli)-6-aminoheksaanihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteriä (NHS-ASC).<sup>24</sup> NHS-ASA:n ja NHS-ASC:n rakenteet on esitetty kuvassa 35.



Kuva 35. Hydroksyyli- tai nitrosubstituoidut linkkerit ANB-NOS (*N*-5-atsido-2-nitrobensoyylioksisukkinimidi), NHS-ASA (4-atsidosalisyylihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteri) ja NHS-ASC (*N*-(4-atsidosalisyyli)-6-aminoheksaanihapon *N*-hydroksi-sukkinimidiesteri).<sup>21,24,53,54</sup>

Atsidi-NHS-esteri-linkkereiden valmistamisessa voidaan käyttää aminobentsoehapon sijaan fluoriyhdistettä. Witzemann *et al.*<sup>55</sup> ovat syntetisoineet fluoriyhdisteen avulla *N*-(4-atsido-2-nitrofenyyli)dodekaanihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteriä (kuva 36). Synteesissä 3-nitro-4-fluorifenyyliatsidia ja 12-aminododekaanihappoa liuotetaan kuivan dimetyyliformamidin, kloroformin ja trietyyliamiinin seokseen, ja seosta refluksoidaan kolmen tunnin ajan. Tuotteeksi saatava yhdiste esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä huoneenlämmössä disyklokarbodiimidin avulla. Liuottimena käytetään kuivaa tetrahydrofuraania.





Kuva 36. *N*-(4-atsido-2-nitrofenyyli)dodekaanihapon *N*-hydroksisukkinimidiesterin synteesi.<sup>55</sup>

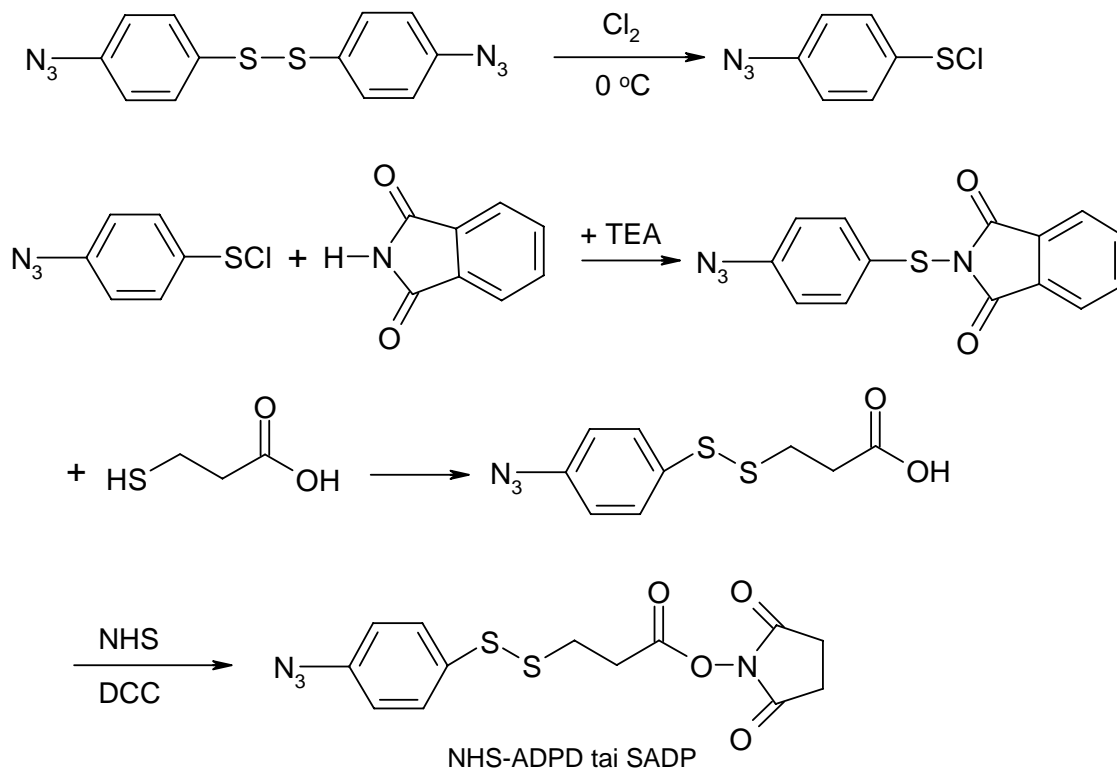
## 8.2 Lohkeavat linkkerit

Lohkeavien atsidi-NHS-esteri-linkkereiden ryhmässä käsitellään yhdisteitä, joiden lohkeava ryhmä on disulfidisilta<sup>11,20</sup> tai atsoryhmä, joka voidaan pelkistää natriumditioniitilla ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )<sup>14</sup>.

### 8.2.1 Disulfidisilta

NHS-APDP tai SADP (3-[(4-atsidofenyyli)ditio]propionihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteri)<sup>20</sup>, valmistetaan *N*-[(4-atsidofenyyli)tio]ftaali-imidistä ja 3-merkaptopropionihaposta. *N*-[(4-atsidofenyyli)tio]ftaali-imidin valmistus on esitelty luvussa 7.2. Lähtöaineena käytetään 4,4'-aminodifenyyliisulfidia, joka muutetaan diatsidiksi, ja joka muodostaa kloorin kanssa sulfenyylikloridia. Sulfenyylikloridi reagoi edelleen ftaali-imidin kanssa muodostaen *N*-[(4-atsidofenyyli)tio]ftaali-imidiä. *N*-[(4-atsidofenyyli)tio]ftaali-imidi liuotetaan bentseeniin ja liuokseen lisätään 3-merkaptopropionihappoa. Seosta refluksoidaan, ja reaktion aikana vapautuva ftaali-imidi saostuu liuoksesta, koska se ei liukene bentseeniin. Reaktiotuote, 3-[(4-atsidofenyyli)ditio]propionihappo esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä disykloheksyyli-karbodi-imidin avulla huoneenlämmössä. Liuottimena käytetään kuivaa asetonitriiliä.

Reaktiossa muodostuva disyκλοheksyyliurea poistetaan sentrifugoimalla, ja tuotteeksi saadaan 3-[(4-atsidofenyyliditio)propionihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteriä eli NHS-ADPD:tä (kuva 37).

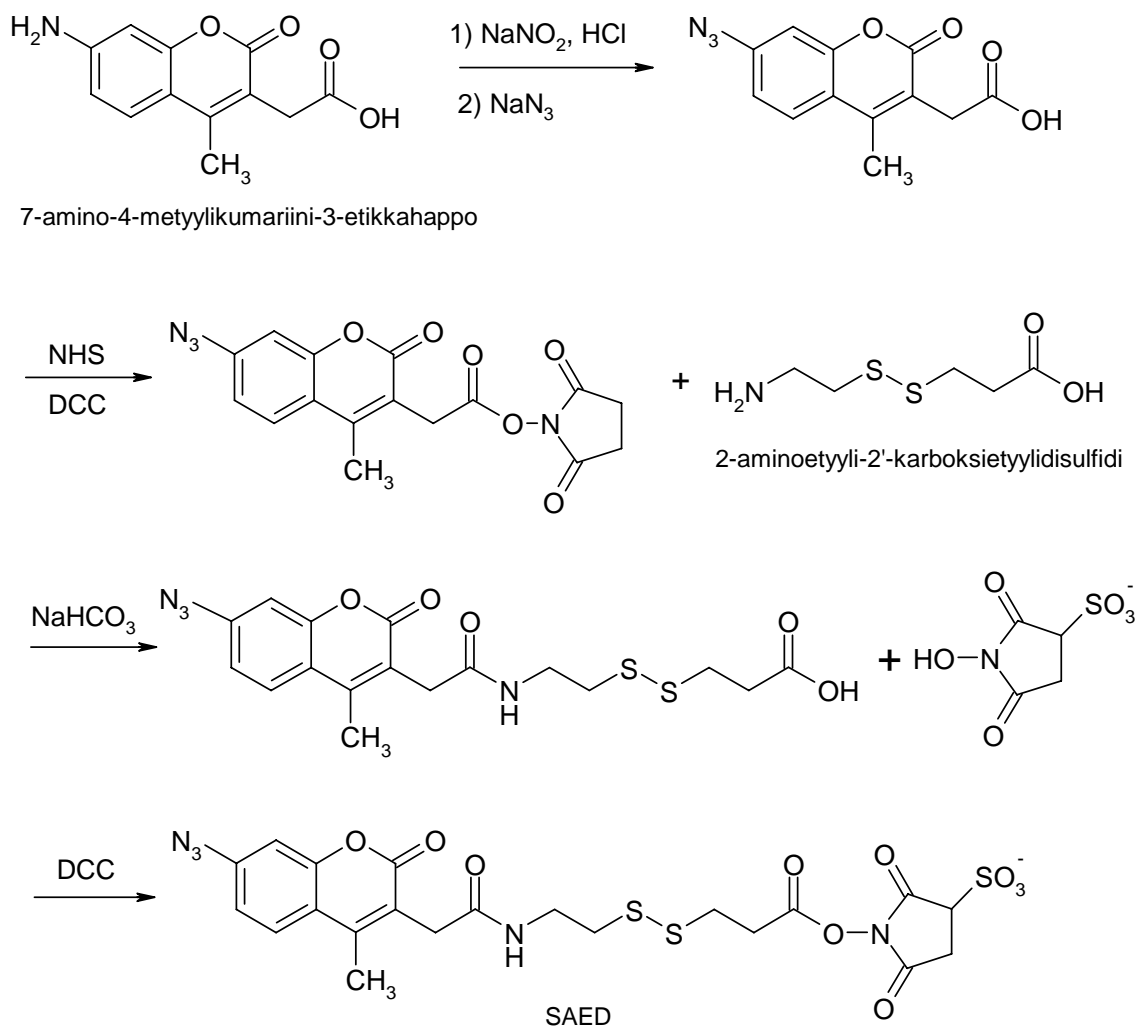


Kuva 37. 3-[(4-Atsidofenyyliditio)propionihapon *N*-hydroksisukkinimidiesterin synteysi lähtien 4,4'-atsidodifenyylisulfidista.<sup>20</sup> Synteysi muistuttaa EADB:n synteisiä (kuva 31).

3-Merkaptopropionihapon tilalla voidaan käyttää myös 2-merkptoetikkahappoa, jolloin saadaan yhtä hiiliatomia lyhyempi linkkeri, 2-[(4-atsidofenyyliditio)etikkahapon *N*-hydroksisukkinimidiesteri (NHS-ADPA). Lisäksi *N*-[(4-atsidofenyylitio)ftaali-imidiä voidaan käyttää sulfhydryyli-ryhmien kanssa reagoivana linkkerinä.<sup>20</sup>

SAED eli sulfosukkinimidyli-2-(7-atsido-4-metyylikumariini-3-asetamido)-etyyli-1,3'-ditiopropionaatti<sup>11</sup>, sisältää fluoresoivan kumariini-ryhmän, joten linkkeriä voidaan käyttää esimerkiksi proteiinien fluoresenssileimauksessa. SAED syntetisoidaan neljässä vaiheessa valolta suojattuna (kuva 38). 7-Amino-4-metyylikumariini-3-etikkahappo liuotetaan HCl-liuokseen ja diatsotoidaan natriumnitriitillä. Seokseen lisätään ylimäärin natriumatsidia, jolloin aromaattinen amiini muuttuu atsidiksi. Happoryhmä esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä DCC-menetelmällä<sup>38</sup>. Kolmannessa vaiheessa linkkeri

pidennetään reaktiolla 2-aminoetyyli-2'-karboksietyylidisulfidin kanssa 1 M natriumbikarbonaattiliuoksessa kuten NHS-ABGG:n reaktiossa<sup>53</sup>. Lopuksi SAED:n happosiaste esteröidään *N*-hydroksisulfosukkinimidyyliesterillä *N,N*-disykloheksyyli-karbodi-imidin läsnä ollessa, kuten yleensä sulfonoitujen NHS-estereiden tapauksessa<sup>30</sup> (luku 5.1).



Kuva 38. SAED:n eli sulfosukkinimidyyli-2-(7-atsido-4-metyylikumariini-3-asetamido)-etyyli-1,3'-ditiopropionaatin synteesi.<sup>11</sup>

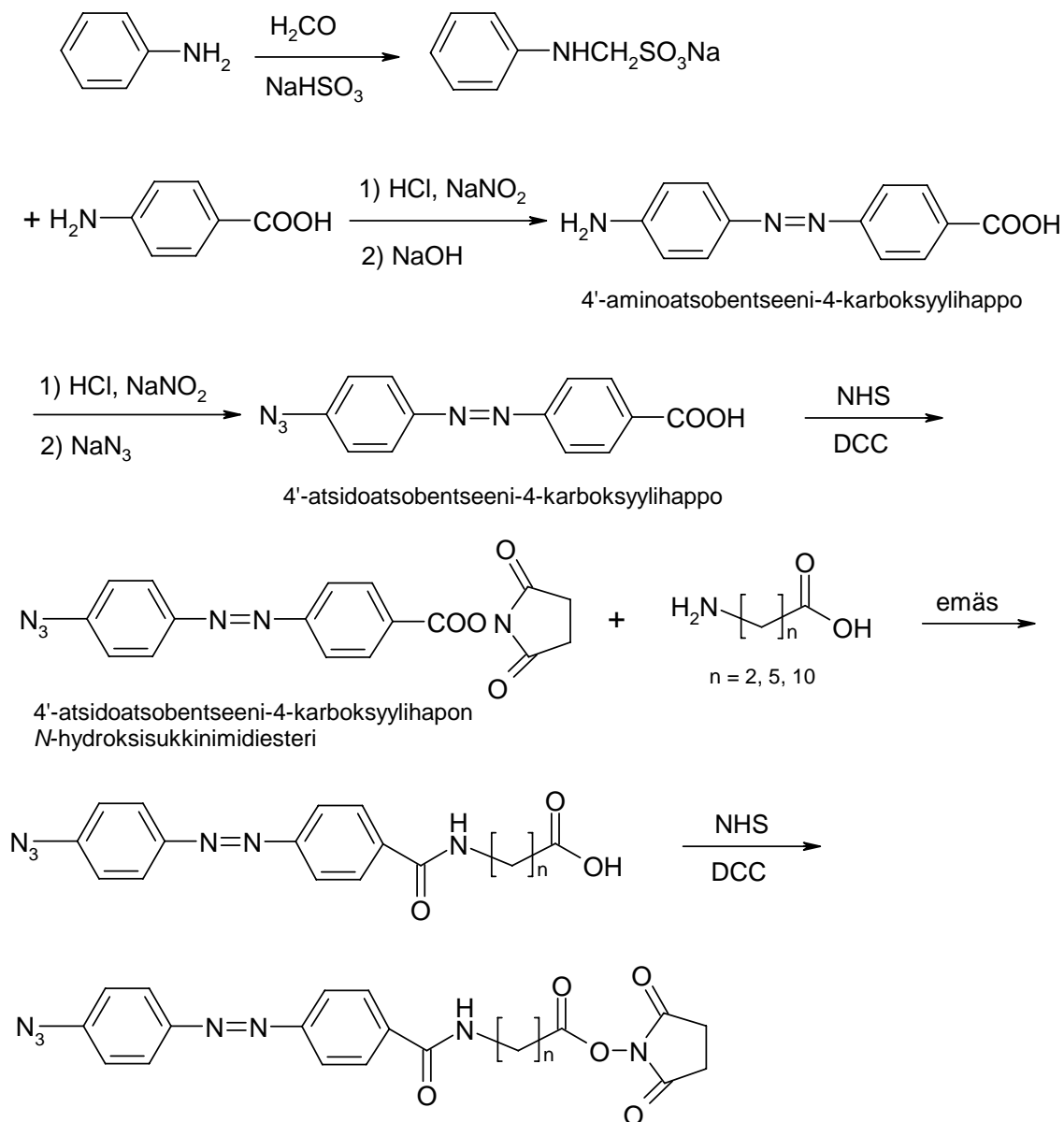
### 8.2.2 Atsobentseeniyhdisteet

Jaffe *et al.*<sup>14</sup> ovat valmistaneet 4'-aminoatsobentseeni-4-karboksyylihappoon perustuvia linkkereitä, jotka voidaan lohkaista natriumditioniitilla (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). Atsoryhmä kestää miedot pelkistävät reagenssit, kuten 2-merkptoetanolin tai ditiotreitolin, eikä se reagoi solun pinnan -SH tai disulfidiryhmien kanssa, kuten yleisemmin käytetty lohkeava

ryhmä, disulfidisilta. Atsoryhmän sisältävät linkkerit sopivat glykoproteiinien konjugointiin paremmin kuin glykoliryhmän sisältävät linkkerit, sillä linkkerin katkaisuun käytettävä ditioniitti ei tuhoa sokeriketjuja, toisin kuin glykoliryhmän katkaisuun käytettävä perjodaatti. Yksinkertaisin atsobentseenilinkkereistä on 4'-atsidoatsobentseeni-4-karboksyylihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteri, joka syntetisoidaan diatsotoimalla 4'-aminoatsobentseeni-4-karboksyylihappo 4'-atsidoatsobentseeni-4-karboksyylihapoksi, ja esteröimällä happopää *N*-hydroksisukkinimidillä. Esteröinnissä käytetään disykloheksyylikarbodi-imidiä ja liuottimena kuivaa dimetyyliformamidia. Syntynyt disykloheksyyliurea poistetaan suodattamalla ja suodos lyofilisoidaan ja puhdistetaan pylväskromatografialla. 4'-aminoatsobentseeni-4-karboksyylihappoon perustuvien linkkereiden synteesi on esitetty kuvassa 39.

Lähtöaineena käytettävä 4'-aminoatsobentseeni-4-karboksyylihappo valmistetaan diatsotoidusta *p*-aminobentsoehaposta ja aniliini- $\omega$ -metyylisulfonaatista (kuva 39), ja metyyliisulfonaattiryhmä poistetaan alkalisella hydrolyysillä. Aniliini- $\omega$ -metyylisulfonaatti puolestaan syntetisoidaan aniliinista formamidin ( $H_2CO$ ) ja natriumvetysulfaatin avulla.<sup>14</sup>

4'-Atsidoatsobentseeni-4-karboksyylihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteristä voidaan valmistaa pidennettyjä linkkereitä reaktiolla aminohapon kanssa.<sup>14</sup> Aminohappo, esimerkiksi 3-aminopropionihappo tai 6-aminoheksaanihappo, liuotetaan 1 % natriumbikarbonaattiliuokseen ja seokseen lisätään 4'-atsidoatsobentseeni-4-karboksyylihapon *N*-hydroksisukkinimidiesteriä. Liuotin haihdutetaan ja jäännökseen lisätään väkevää suolahappoa, minkä jälkeen tuote suodatetaan talteen. Happoryhmä esteröidään *N*-hydroksisukkinimidillä disykloheksyylikarbodi-imidin avulla. Liuottimena käytetään dimetyyliformamidia. Tuotteeksi saadaan *N*-[4-(*p*-atsidofenylylatso)bentsoyyli]-3-aminopropyli-*N'*-oksisukkinimidiesteriä tai *N*-[4-(*p*-atsidofenylylatso)bentsoyyli]-6-aminoheksyyli-*N'*-oksisukkinimidiesteriä. Kun aminohappona käytetään pitkäketjuista 11-aminoundekaanihappoa, se liuotetaan vesiliuoksen sijasta dimetyylisulfoksidiin ja emäksenä käytetään trietyyliamiinia natriumbikarbonaatin sijaan. NHS-esteröinti tehdään samalla tavalla kuin muillekin atsobentseenilinkkereille, ja tuotteeksi saadaan *N*-[4-(*p*-atsidofenylylatso)bentsoyyli]-11-aminoundekyyli-*N'*-oksisukkinimidiesteriä. Linkkerien synteesikaavio on esitetty kuvassa 39.



Kuva 39. 4'-Aminoatsobentseeni-4-karboksylihappoon perustuvien linkkerien synteesi.<sup>14</sup>  $n = 2$ : *N*-[4-(*p*-atsidofenyyliaatso)bentsoyyli]3-aminopropyli-*N'*-oksisukkinimidiesteri,  $n = 5$ : *N*-[4-(*p*-atsidofenyyliaatso)bentsoyyli]6-aminoheksyyli-*N'*-oksisukkinimidiesteri,  $n = 10$ : *N*-[4-(*p*-atsidofenyyliaatso)bentsoyyli]11-aminoundekyyli-*N'*-oksisukkinimidiesteri

## 9 ESIMERKKEJÄ LINKKERIEN KÄYTÖSTÄ

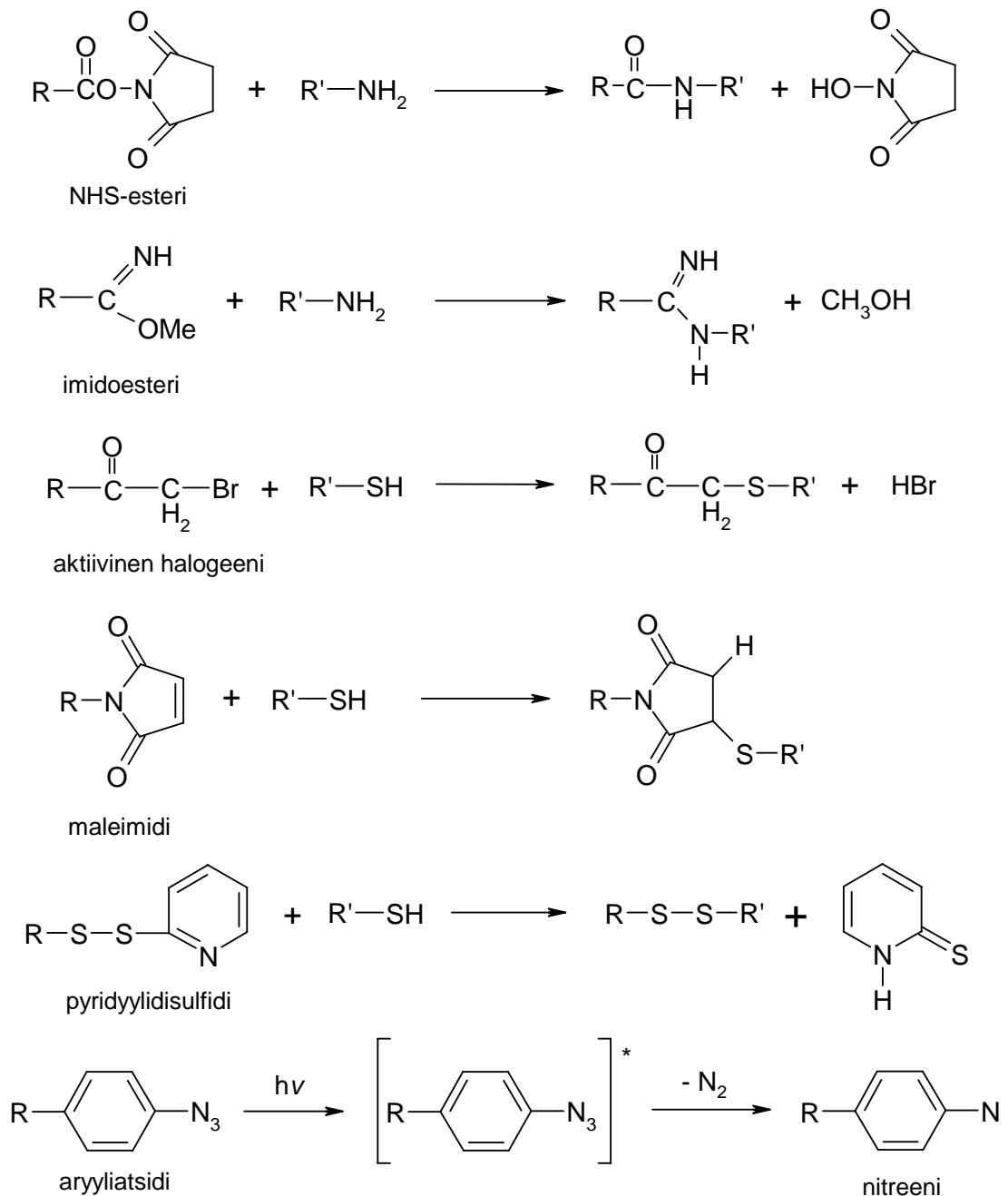
Bifunktionaalisia reagensseja käytetään monipuolisesti biokemian sovelluksissa, esimerkiksi proteiinien ja kompleksien kolmiulotteisen rakenteen analysoimiseen, vasta-aine-entsyymi-konjugaattien valmistamiseen, molekyylien immobilisoimiseen ja hapteenien konjugoimiseen kantajaproteiineihin.<sup>8</sup> Proteiinikemiassa tärkeitä käyttötapoja ovat esimerkiksi proteiinien rakenteen vahvistaminen intramolekulaarisilla sidoksilla, proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkiminen, proteiinien reaktiivisten ryhmien etäisyyksien selvittäminen, tai kahden proteiinin yhdistäminen toisiinsa, jolloin saadaan kaksi aktiivisuutta samaan rakenteeseen.<sup>4</sup> Eri sovelluksissa linkkeriltä vaaditaan kuhunkin tarkoitukseen sopivia ominaisuuksia, joten erilaisia yhdisteitä tarvitaan paljon. Monet näistä ovat helposti saatavilla joko kemikaalivalmistajilta tai yksinkertaisen laboratoriosynteesin avulla.<sup>3</sup>

### 9.1 Reagenssin valinta

Sopivan reagenssin valinta on tärkeä edellytys konjugoinnin onnistumiselle.<sup>13</sup> Merkittävä valintaperuste on konjugoitavien molekyylien ominaisuudet, eli mitä funktionaalisia ryhmiä modifioitavassa proteiinissa tai peptidissä on, ja millaisiin kemiallisiin reaktioihin nämä ryhmät osallistuvat, sekä millaisia sidoksia reaktioissa muodostuu.<sup>6</sup> Jos tiedetään, minkä molekyylin funktionaalisista ryhmistä halutaan reagoivan, linkkeri valitaan spesifisyyden mukaan. Tämä rajoittaa syntyvien tuotteiden määrää, parantaa saantoa ja helpottaa sidoksen paikan tunnistamista. Jos molemmissa konjugoitavissa molekyylyleissä tähdätään samaan funktionaaliseen ryhmään, homobifunktionaalinen reagenssi on yleensä hyvä valinta.<sup>13</sup> Homobifunktionaaliset reagenssit muodostavat myös tehokkaasti siltoja makromolekyylin alayksiköiden välille.<sup>3</sup> Heterobifunktionaaliset reagenssit puolestaan mahdollistavat kahden erilaisen biomolekyylin kontrolloidun liittämisen toisiinsa.<sup>6</sup> Koplausreaktiot voidaan tehdä kahdessa vaiheessa, jolloin linkkerin toinen pää reagoi ensin yhden biomolekyylin kanssa, ja tuotteet voidaan tarvittaessa puhdistaa ja analysoida ennen toista reaktiota.<sup>4</sup>

Kuvaan 40 on koottu linkkerien funktionaalisten ryhmien reaktioita. Proteiineissa lysiinin  $\epsilon$ -aminoryhmät ovat yleensä reagoivista ryhmistä käyttökelpoisimmat konjugoinnin kannalta, sillä niitä on paljon ja ne ovat yleensä laskostuneen proteiinin

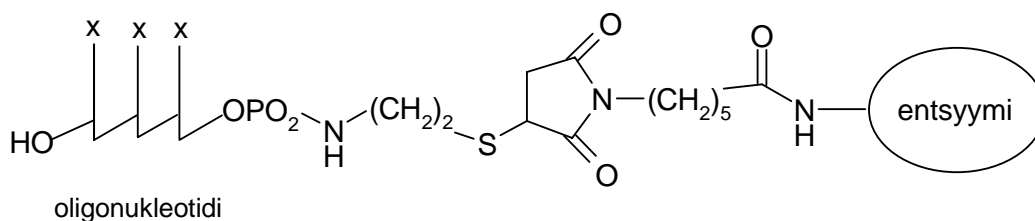
ulkopinnalla (vertaa kuva 43 B). Aminospesifisiä ryhmiä ovat muun muassa NHS-esterit, imidoesterit ja aktivoidut aryylifluoridit.<sup>4</sup>



Kuva 40. Linkkereiden funktionaalisten ryhmien reaktiot.<sup>48,56,57</sup> Nitreeni reagoi epäspesifisesti N-H-, O-H-, C-H- ja C=C-sidosten kanssa.

Maleimidit, haloasetyylijohdannaiset (aktiiviset halogeenit) ja pyridiylidisulfidit reagoivat tioliryhmien kanssa.<sup>6</sup> Monissa heterobifunktionaalisissa reagensseissa toinen funktionaalinen ryhmä on maleimidi ja toinen NHS-esteri, jolloin samassa linkkerissä on sekä tioli- että aminospesifinen ryhmä. Koska NHS-esteri on altis hydrolyysille, sen

annetaan reagoida ensin toisen konjugoitavan molekyylin aminoryhmien kanssa, joka ei sisällä tioliryhmiä tai jonka tioliryhmät on suojattu. Toisessa vaiheessa syntyneen johdannaisen maleimidiryhmä reagoi liitettävän molekyylin tioliryhmän kanssa.<sup>4</sup> Ghosh *et al.*<sup>7</sup> ovat valmistaneet entsyymi-oligonukleotidi-konjugaatteja eli DNA-koettimia käyttäen 6-maleimidoheksaanihapon sukkinimidiesteriä (kuva 41). Ensimmäisessä vaiheessa linkkerin NHS-esteripää reagoi alkalisen fosfataasin aminoryhmän kanssa. Toisessa vaiheessa linkkerin maleimidiryhmä reagoi kemiallisesti muokatun oligonukleotidijohdannaisen SH-ryhmän kanssa muodostaen kestävän tioetterisidoksen. DNA-koetinta käytetään tunnistamaan hyvin pieniä määriä komplementaarisia DNA-sekvenssejä.



Kuva 41. Kaaviokuva DNA-koettimesta.<sup>7</sup>

Aryyliatsidit viritetään UV-säteilyn avulla, jolloin ne muodostavat hyvin reaktiiviseen nitreenin. Nitreenit reagoivat nopeasti ja epäspesifisesti N–H-, O–H-, C–H- ja C=C-sidosten kanssa. Aryyliatsideja käytetään, kun tarvitaan nopea konjugointireaktio, jolloin molekyylien satunnaisten törmäysten aiheuttamat reaktiot eivät häiritse tuloksia.<sup>3</sup> Heterobifunktionaaliset aryyliatsidilinkkerit ovat erityisen käyttökelpoisia tutkittaessa interaktioita monimutkaisissa biologisissa systeemeissä, esimerkiksi *N*-sukkinimidyyl-6-[(4'-atsido-2'-nitrofenyyli)amino]heksanoaattia on käytetty erilaisten peptidireseptorien tunnistamisessa. Linkkerin NHS-esteripää reagoi ensin pimeässä, jonka jälkeen atsidiryhmä aktivoidaan valolla.<sup>4,58,59</sup>

Linkkerin funktionaalisten ryhmien lisäksi käsivarren rakenteella on suuri merkitys linkkerin valinnassa.<sup>4</sup> Esimerkiksi lohkeavaa käsivartta käytetään, kun konjugoidut molekyylit halutaan reaktion jälkeen irrottaa toisistaan. Solukalvoa läpäisemättömät linkkerit reagoivat selektiivisesti solun ulkopinnan molekyylien kanssa.<sup>3</sup> Muita tärkeitä tekijöitä ovat käsivarren konformaation joustavuus sekä käsivarren pituus. Pidemmän käsivarren oletetaan yleisesti konjugoivan paremmin suuria proteiineja ja proteiineja,



joiden reaktiivinen kohta on steerisesti ahdas.<sup>4</sup> Esimerkiksi bisimidaatit, joiden pituus on alle 5 Å, eivät muodosta juurikaan kovalenttisia siltoja, kun taas 11–22 Å pituiset linkkerit muodostavat sidoksia tehokkaasti. Periaatteessa makromolekyylien vuorovaikutuksia voisi kartoittaa homologisella linkkerisarjalla, jossa käsivarren pituus kasvaa. Kuitenkin makromolekyylin rakenteen sekä useimpien linkkerien joustavuus tekevät luotettavien tulosten saamisen vaikeaksi.<sup>3</sup> Jos linkkerin käsivarsi on rakenteeltaan joustava, ketju ei välttämättä ole maksimipituudessaan.<sup>13</sup>

## 9.2 Konjugointireaktion olosuhteet

Rakenteeltaan monimutkaisten biopolymeerien ja pienten orgaanisten molekyylien välisissä reaktioissa on tärkeää huomioida muutamia yleisiä sääntöjä.<sup>6</sup> Konjugointireaktio tehdään puskuriliuoksessa, jossa on reaktiolle sopiva pH, ja jonka ionivahvuus on yleensä 25–100 mM. Esimerkiksi tioliryhmien ja  $\alpha$ -aminoryhmien reaktiot tapahtuvat fysiologisessa pH:ssa (7,0–7,5), jolloin fosfaattipuskurit toimivat hyvin. Lysiinin aminoryhmät vaativat emäksisemmän pH:n, joten niiden reaktioissa on parempi käyttää karbonaatti/bikarbonaatti- tai boraattipuskureita. Modifioitavan proteiinin lisäksi kannattaa huomioida linkkerin funktionaalinen ryhmä, esimerkiksi konjugointi NHS-esterillä onnistuu parhaiten bikarbonaattipuskurissa pH:ssa 8,2.

Konjugointireaktio kannattaa yleensä tehdä huoneenlämpötilaa alhaisemmassa lämpötilassa, koska matalat lämpötilat parantavat reaktion selektiivisyyttä, mikä vähentää sivureaktioiden määrää. Reaktioajaksi riittää yleensä 1–2 tuntia, mutta myös yön yli jätettävät reaktiot ovat tavallisia. Funktionaalisten ryhmien reaktiivisuus vaikuttaa luonnollisesti reaktioaikaan, esimerkiksi aminospesifisistä reagensseista NHS-esterit ja isotiosyanaatit ovat reaktiivisuudeltaan keskitasoa, kun taas sulfonyylihalidit ovat hyvin reaktiivisia. Yksi käytännöllinen tapa on lisätä linkkeri jäähauteella olevaan proteiiniliuokseen ja antaa hauteen lämmitä huoneenlämpöiseksi parin tunnin aikana.<sup>6</sup> Toisaalta konjugointireaktio tehdään usein myös huoneenlämmössä.<sup>40,41,46,49,60,61</sup>

Jos linkkerimolekyyli liukenee vesi- tai puskuriliuokseen riittävästi eli vähintään millimolaariseksi pitoisuudeksi, se lisätään reaktioseokseen liuotettuna pieneen määrään vettä.<sup>6</sup> Jos linkkeri liukenee veteen huonosti tai linkkeri reagoi helposti veden kanssa, käytetään apuna orgaanista liuotinta, johon reagenssi liuotetaan ennen lisäystä

reaktioseokseen. Liuottimen täytyy sekoittua vesiliuokseen eikä se saa aiheuttaa linkkerin hajoamista tai biomolekyylin denaturoitumista tai saostumista. Tavallisia apuliuottimia ovat DMF ja DMSO, joista DMF:a käytetään sulfonyylikloridien reaktioissa, sillä ne reagoivat DMSO:n kanssa.

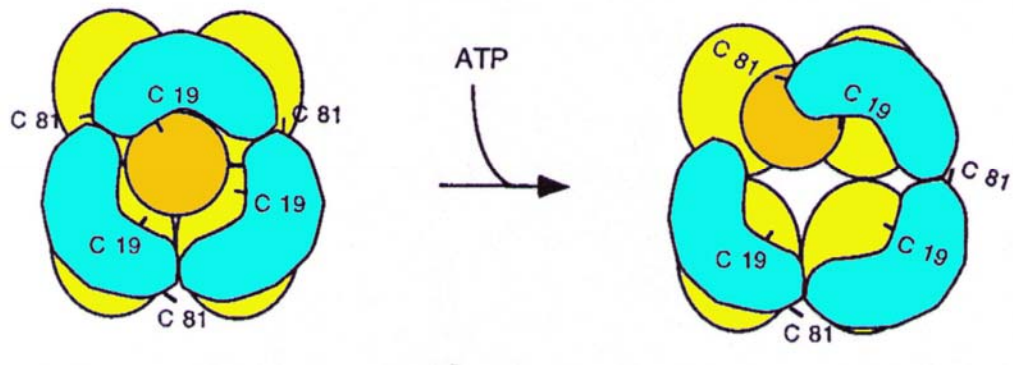
Konjugointireaktiossa käytettävien reagenssien moolisuhteisiin vaikuttaa ainakin konjugaatin käyttötarkoitus, reaktiivisten ryhmien lukumäärä proteiinissa, linkkerin liukoisuus reaktioseoksessa ja konjugaatin liukoisuus.<sup>6</sup> Jos tavoitteena on immunogeeni, jossa kantajaproteiinin kiinnitetään lääkeaine tai muu hapteeni, kantajaproteiini saa olla kattavasti modifioitu. Jos taas halutaan leimata vasta-aine tai entsyymi, modifiointi ei saa olla liian runsasta, jotta molekyylin biologinen aktiivisuus säilyy leimauksen jälkeen. Liian kattava modifiointi voi myös pienentää konjugaattien liukoisuutta. Yleisesti ottaen 10 moolia isotiosyanaattia tai NHS-esteriä leimaa 1 moolin proteiinia. Proteiini-konsentraatio reaktioseoksessa saa olla yli 10  $\mu\text{M}$ , optimaalinen alue on noin 50–100  $\mu\text{M}$ . Laimeammassa liuoksessa linkkerin hydrolyysi kilpailee merkittävästi konjugointireaktion kanssa. Konjugaatin liukoisuus on yleensä huonompi kuin natiivin proteiinin. Jos linkkeri tai leima on kovin hydrofobinen tai sisältää monia ionisoituneita ryhmiä, se voi vaikuttaa proteiinin laskostumiseen ja pienentää liukoisuutta. Lisäksi liian runsaasti substituoitu proteiini-konjugaatti saattaa saostua liuoksessa.

### 9.3 Proteiini-interaktioiden tutkiminen

Proteiiniin, jonka aminohapposekvenssi tunnetaan, voidaan bifunktionaalisen reagenssin avulla tehdä kovalenttisia sidoksia. Kun sidosten paikat määritetään, saadaan tietoa aminohappotähteiden välisistä etäisyyksistä ja proteiinien välisistä interaktioista.<sup>13,28</sup>

Bakteriofaagi T4:n DNA-replikaatiosysteemissä toimii varsinaisen DNA-polymeraasin lisäksi toinen proteiini-kompleksi, ns. liukupuristin (engl. sliding clamp), joka kiinnittää polymeraasin DNA-kaksoiskierteeseen.<sup>49</sup> Ilman kiinnitystä polymeraasi dissosioituisi DNA:sta fysiologisissa olosuhteissa. Näiden lisäksi liukupuristimen kiinnittymistä katalysoi ATPaasi, ns. puristimen latauskompleksi gp44/62 (engl. clamp loader). Liukupuristin muodostuu kolmesta gp45-alayksiköstä, joiden aminohapposekvensseihin lisätään pistemutaation avulla yksi kysteini tähteeseen 19 tai 81. Proteiinit leimataan TFPAM-3:lla eli *N*-(4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyli)-3-maleimidopropionamidilla,

jonka toisessa päässä on tiilien kanssa reagoiva maleimidiryhmä, ja toisessa valoaktivoitua aryyliatsidi. Reaktio tehdään huoneenlämmössä, ja se pysäytetään lisäämällä reaktioseokseen kysteiniiliuosta. Atsidiryhmä fotolysoidaan säteilyttämällä näytteitä 45 minuutin ajan UV-lampulla, jonka jälkeen tuotteet analysoidaan SDS-PAGE:lla ja western-blottauksella. Vertailemalla eri näytteissä syntyneiden konjugaattien massoja saadaan tietoa gp45-gp44/62-kompleksin rakenteesta ja topografian muutoksista liukupuristimen kiinnittyessä DNA:han. Kuvassa 42 on esitetty tutkimusten perusteella tehty malli gp45-gp44/62-kompleksin alayksikköjen järjestäytymisestä ja ATP:n hydrolyysin aikana tapahtuvista muutoksista.



Kuva 42. Kaaviokuva gp45-gp44/62-kompleksista ja topografian muutoksista ATP:n hydrolyysin aikana.<sup>49</sup> Kolme liukupuristimen gp45-alayksikköä on merkitty kuvaan turkoosilla, neljä latauskompleksin gp44-alayksikköä keltaisella ja keskellä oleva gp62-alayksikkö oranssilla. DNA:n kiinnittymisen jälkeen gp45-kompleksin rengas sulkeutuu ja gp44/62-kompleksi irtoaa.

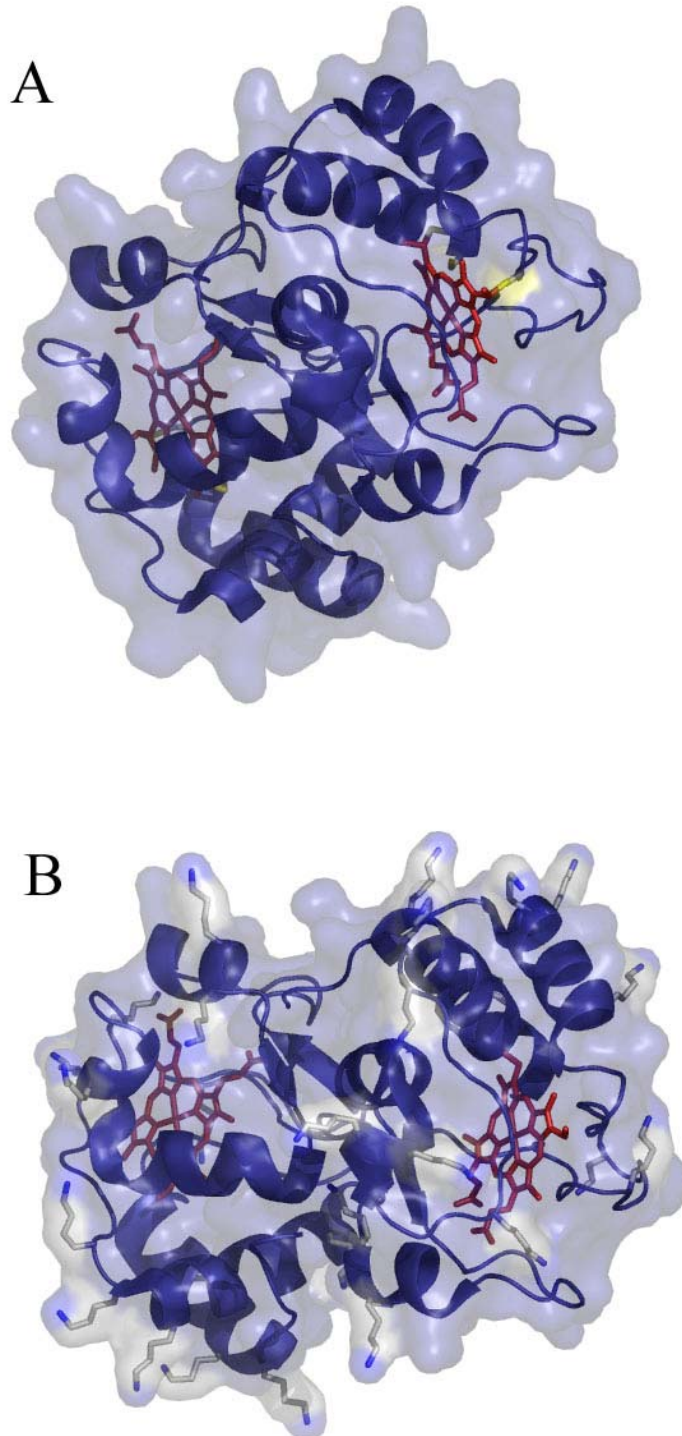
Proteiinikompleksien avaruudellista ja topologista järjestystä voidaan tutkia muodostamalla proteiineihin kovalenttisia siltoja linkkereiden avulla ja analysoimalla syntyneitä tuotteita.<sup>60</sup> Menetelmän vaikeus on syntyneiden tuotteiden tunnistaminen monimutkaisista reaktioseoksista, mutta uusilla massaspektrometrisillä menetelmillä saadaan analysoitua tarkasti monimutkaisia biologisia näytteitä. Esimerkiksi Fourier-muunnos-ionisyklotroniresonanssimassaspektrometria (FTICR-MS) soveltuu tarkoitukseen hyvin, sillä sen etuja ovat erittäin hyvä massaresoluutio ja tarkkuus suurten massojen määrittämisessä.

Schmidt *et al.*<sup>60</sup> ovat tutkineet kalsiumriippuvan kalmoduliinin ja adenylyylisyklaasi 8:n C-terminaalisen peptidin välisiä interaktioita kahden homobifunktionaalisen reagenssin

avulla, ja analysoineet reaktiotuotteita FTICR-massaspektrometrillä. BS<sup>3</sup> eli bis(sulfosukkinimidyyli)suberaatti ja BS<sup>2</sup>G eli bis(sulfosukkinimidyyli)glutaraatti ovat sulfonoituja NHS-esterilinkkereitä, jotka reagoivat lysiinin ε-aminoryhmien tai proteiinin N-terminaalisen aminoryhmän kanssa muodostaen amidisidoksen. Reaktiossa kalsiumioneilla kyllästettyä kalmoduliinia ja adenylyylisyklaasi 8:n peptidiä inkuboidaan linkkerin kanssa, niin että linkkeriä on 50–200-kertainen ylimäärä proteiiniin verrattuna. Tuotteet analysoidaan SDS-PAGE:lla ja sopivan massan omaavat proteiinit pilkotaan entsyymaattisesti trypsiinillä. Entsyymikäsitelty seos erotellaan korkeapainenestekromatografilla, josta eluoituneet tuotteet johdetaan suoraan FTICR-massaspektrometriin, ja tuloksista voidaan ratkaista linkkerien muodostamien sidosten paikat.

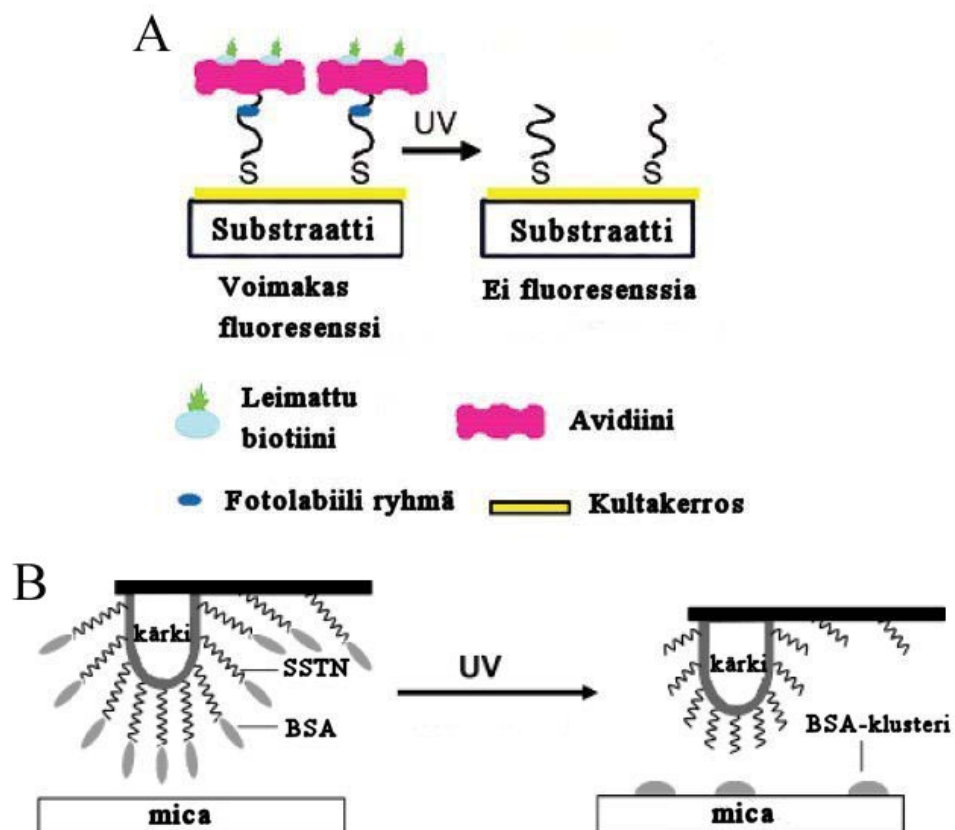
#### 9.4 Molekyylien immobilisointi

Proteiinien immobilisointi voi joissakin tapauksissa parantaa niiden stabiilisuutta.<sup>4</sup> Esimerkiksi Cheng *et al.*<sup>46</sup> ovat kiinnittäneet hiivan sytokromi *c*:n kovalenttisesti pintaan heterobifunktionaalisella *N*-(γ-maleimidobutyryloksi)sulfosukkinimidiesterillä (sGMBS). Pii-pinta derivoidaan (3-aminopropyli)trimetoksisilaanilla, jonka jälkeen vapaat aminoryhmät reagoivat linkkerin NHS-esteripään kanssa. Proteiinin aminohapposekvenssissä on kysteiini tähteessä 102, joka sijaitsee natiivissa konformaatiossa proteiinin pinnalla ja reagoi linkkerin maleimidiryhmän kanssa. Kiinnitys stabiloi proteiinin rakennetta alkoholi- ja happodenaturaatiota vastaan. Yleensä proteiini-pintainteraktiot aiheuttavat osittaisia laskosten purkautumista proteiinissa, mutta joissain tapauksissa immobilisointi voi parantaa proteiinin konformaation stabiilisuutta. Hypoteesin mukaan rajoitettu tila nostaa dynaamisten prosessien energiakynnystä, ja siirtää tasapainoa natiivin tilan suuntaan. Kuvassa 43 on esitetty hiivan sytokromi *c*, johon on merkitty kysteiinitähde 102 keltaisella (43 A), ja lysiinitähteet harmaalla ja sinisellä (43 B).



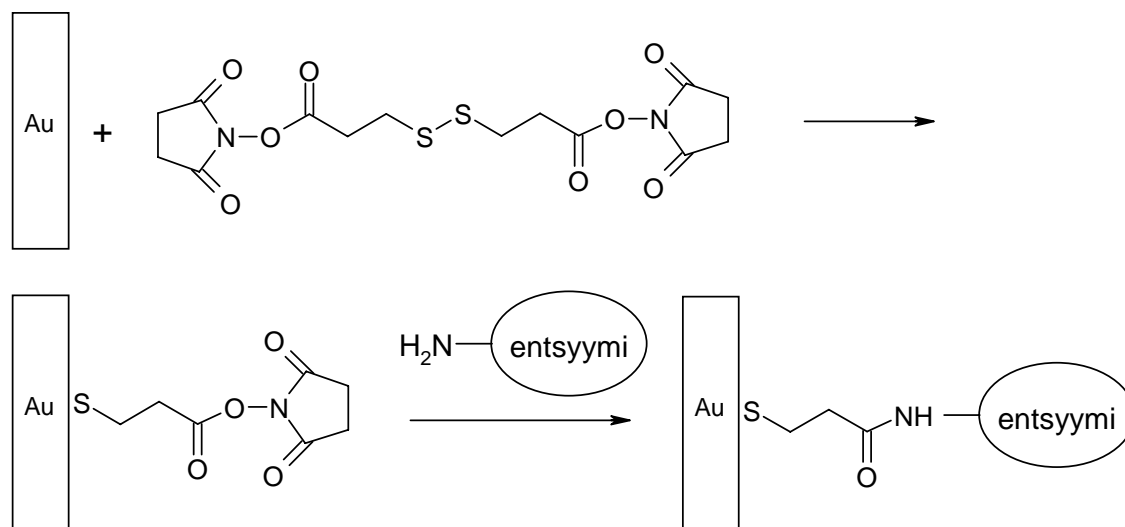
Kuva 43. Hiivan sytokromi *c*. A-kohdassa kysteini 102 on esitetty keltaisena tikkumallina, B-kohdassa lyysiinitähteet on esitetty harmaana ja sinisenä tikkumallina. Molempien alayksiköiden hemiryhmät on esitetty punaisina tikkumalleina ja proteiinin sekundäärirakenteen elementit ns. cartoon-mallina. Kuva on valmistettu PyMOL-ohjelmalla (<http://pymol.sourceforge.net/>) käyttäen röntgensädekristallografian avulla määritettyjä atomikoordinaatteja (PDB-koodi 1YCC).

Yan *et al.*<sup>40</sup> ovat tutkineet kultapinnan modifioimista avidiinilla käyttäen UV-säteilyllä lohkeavaa heterobifunktionaalista linkkeriä, SSTN:ä. Linkkerin toisessa päässä on disulfidiryhmä, joka kiinnittyy kultapintaan, kun substraattia inkuboidaan SSTN-asetonitriililiuoksessa. Linkkerin toisessa päässä oleva NHS-esteri kiinnitetään avidiinin lysiinitähteiden vapaisiin aminoryhmiin inkuboimalla substraattia natriumvetykarbonaattia sisältävässä avidiiniliuoksessa huoneenlämmössä neljän tunnin ajan (kuva 44 A). Avidiinin kiinnittymistä voidaan seurata inkuboimalla substraattia fluoresenssileimatussa biotiiniliuoksessa. Kovalenttisesti kiinnitettyt proteiinit irrotetaan kultapinnasta säteilyttämällä levyä 297 nm aallonpituudella, jolloin linkkerin *o*-nitro-bentsyylisteriryhmä lohkeaa. UV-säteily voidaan kohdistaa rajattuun kohtaan levyllä, jolloin proteiinien irtoamista voidaan säädellä, toisin kuin käytettäessä tavallisia kemiallisilla reagensseilla tai entsyymeillä lohkeavia linkkereitä. Lisäksi linkkerillä voidaan kiinnittää proteiineja, kuten naudan seerumialbumiinia (BSA), atomivoimamikroskoopin kultapäälysteiseen mittakärkeen. Kun mittakärki viedään piipinnalle ja kärkeä säteilytetään UV-valolla, proteiinit irtoavat kärjestä ja tarttuvat piipintaan noin 35–50 makromolekyylin ryppäiksi, jotka voidaan kuvantaa samalla kärjellä (kuva 44 B).



Kuva 44. Kaaviokuva modifioidusta substraatista (A) ja AFM-mittakärjestä (B).<sup>40</sup>

Myös DTSP eli ditiobis-*N*-sukkinimidyylipropionaatti reagoi kultapinnan kanssa muodostaen pinnalle *N*-sukkinimidyyli-3-tiopropionaattikerroksen.<sup>62</sup> Linkkerin avulla kultaelektrodiin kiinnitetään piparjuuriperoksidaasientsyymi, jolloin elektrodi toimii H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-biosensorina. Kaaviokuva elektrodiin kiinnitetystä piparjuuriperoksidaasientsyymistä on esitetty kuvassa 45 ja piparjuuriperoksidaasin rakenne kuvassa 48. Elektrodit päällystetään linkkerillä upottamalla kunnostetut kultaelektrodit DTSP-DMSO-liuokseen huoneenlämmössä. Entsyymi kiinnitetään linkkerin NHS-esteripäähän inkuboimalla modifioituja elektrodeja entsyymiliuoksessa 4 °C:ssa vuorokauden ajan. Kovalenttisesti kiinnitetyn entsyymin aktiivisuus tutkitaan spektrofotometrisesti ja elektrokemiallisilla menetelmillä. Amperometrisessä biosensorissa proteiinin redox-keskuksen ja elektrodin pinnan välillä tarvitaan elektroninen yhteys. Elektroninsiirtoa proteiinin ja elektrodin pinnan välillä tehostetaan siirtymämetallikomplekseilla, kuten Os ja Ru 1,10-fenantroliini-5,6-dioni-komplekseilla. Biosensorin reaktiota eri vetyperoksidipitoisuuksiin seurataan syklisen voltametrian avulla, jolloin kasvava H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-pitoisuus aiheuttaa suuremman mittaustavasteen.



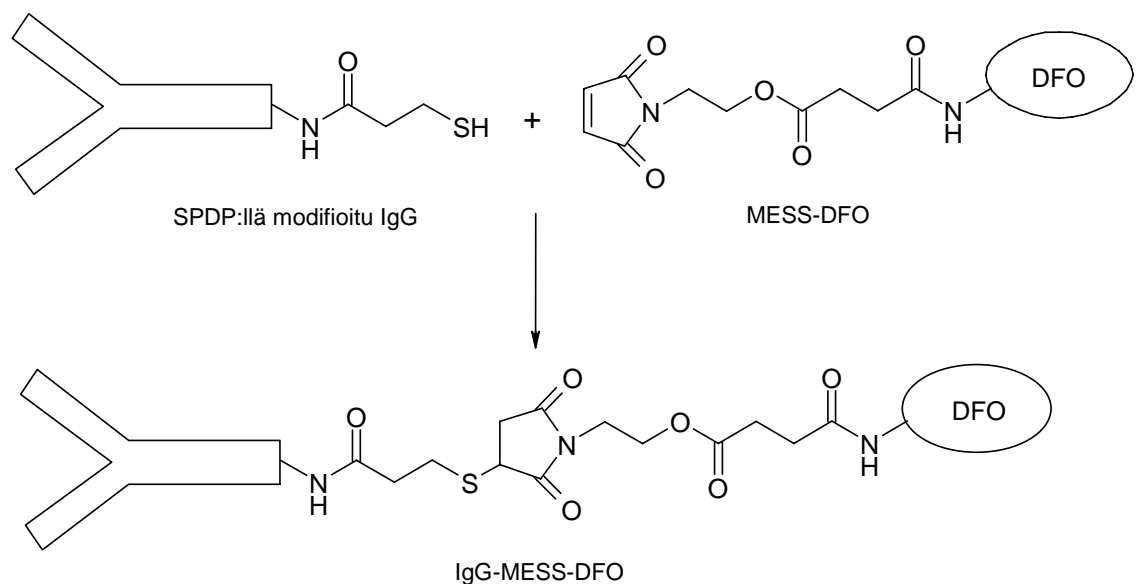
Kuva 45. Kaaviokuva elektrodiin kiinnitetystä piparjuuriperoksidaasientsyymistä.<sup>62</sup>

## 9.5 Proteiinkonjugaatit

Bifunktionaalisia reagensseja käytetään myös lääkeaineiden konjugoimisessa vasta-aineisiin. Esimerkiksi radioaktiivisen <sup>67</sup>Ga:n sukkinyylideferoksamiinikelaatti ja ihmisen IgG voidaan konjugoida MESS:llä. MESS eli *N*-[[4-(2-maleimido-

etoksi)sukkinyyli]-oksi]sukkinimidi on heterobifunktionaalinen reagenssi, jonka toisessa päässä on maleimidi-ryhmä ja toisessa aktivoitu esteri. MESS:n käsivarressa on esterisidos, jonka esteraasientsyymi pystyy pilkkomaan. Esterisidos tekee linkkeristä metabolisesti hajoavan ja estää radioaktiivisen konjugaatin kertymisen maksaan tai munuaisiin.<sup>41</sup>

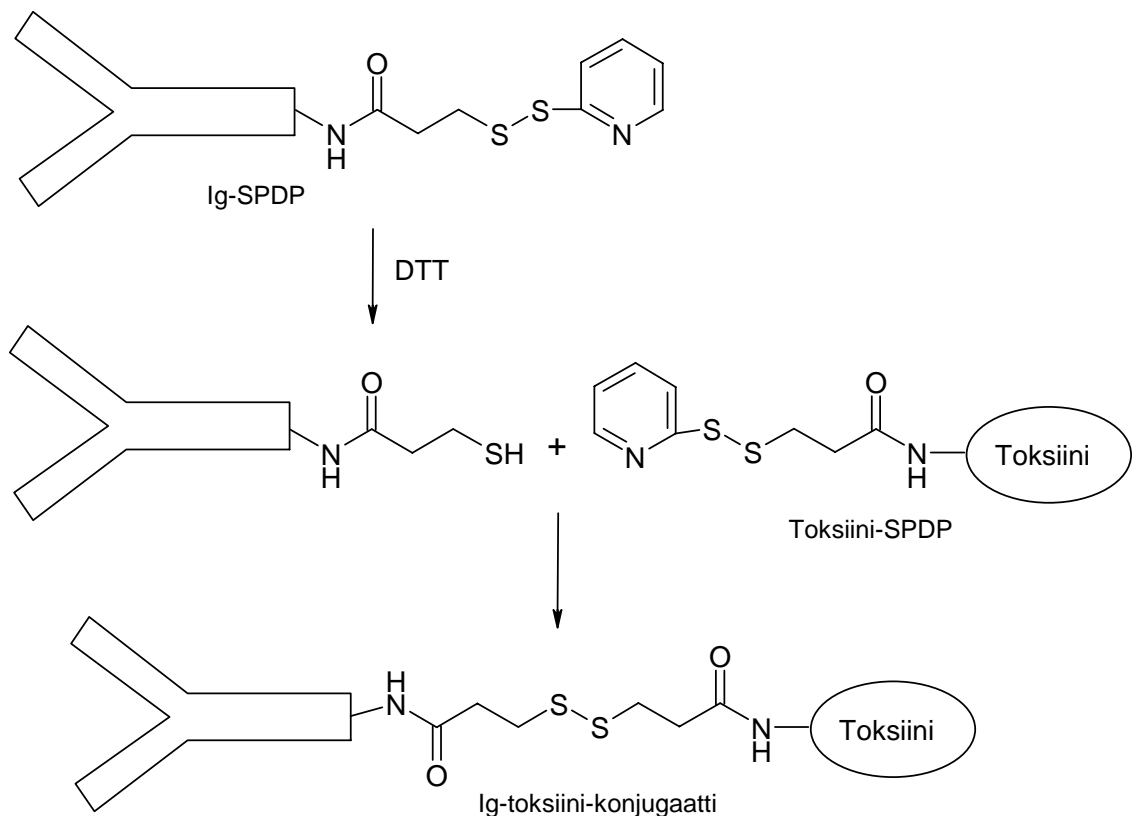
IgG-konjugaatin valmistamisessa käytetään myös toista heterobifunktionaalista reagenssia, SPDP:tä eli *N*-sukkinimidyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaattia, joka kiinnittyy NHS-esteripäästään IgG:n vapaisiin aminoryhmiin.<sup>41</sup> Kun SPDP:n pyridyylidisulfidiryhmä pelkistetään ditiotreitolilla (DTT), saadaan tuotteeksi vapaan tioliryhmän sisältäviä IgG-molekyylejä. Sopivissa olosuhteissa kuhunkin vastainemolekyylisiin saadaan kiinnitettyä yksi tioliryhmä. Toisessa vaiheessa MESS:ä liuotetaan dimetyyliformamidiin, ja seos lisätään boraattipuskuriin liuotetun deferoksamiinin (DFO) sekaan. MESS:n NHS-esteriryhmä reagoi DFO:n aminoryhmän kanssa muodostaen amidisidoksen. Kun DFO-MESS-konjugaatti lisätään modifioitun IgG:n sekaan, MESS:n maleimidiryhmä reagoi IgG:n tioliryhmän kanssa. Tuotteeksi saadaan IgG-MESS-DFO-konjugaatti, joka muodostaa kelaatin <sup>67</sup>Ga:n kanssa. Kuvassa 46 on esitetty kaaviokuva konjugaatista. <sup>67</sup>Ga:lla leimattua IgG:tä voidaan käyttää syöpäkasvainten hoitoon radioimmunoterapiassa.



Kuva 46. Kaaviokuva IgG-MESS-DFO-konjugaatista (DFO = deferoksiamiini).<sup>41</sup>



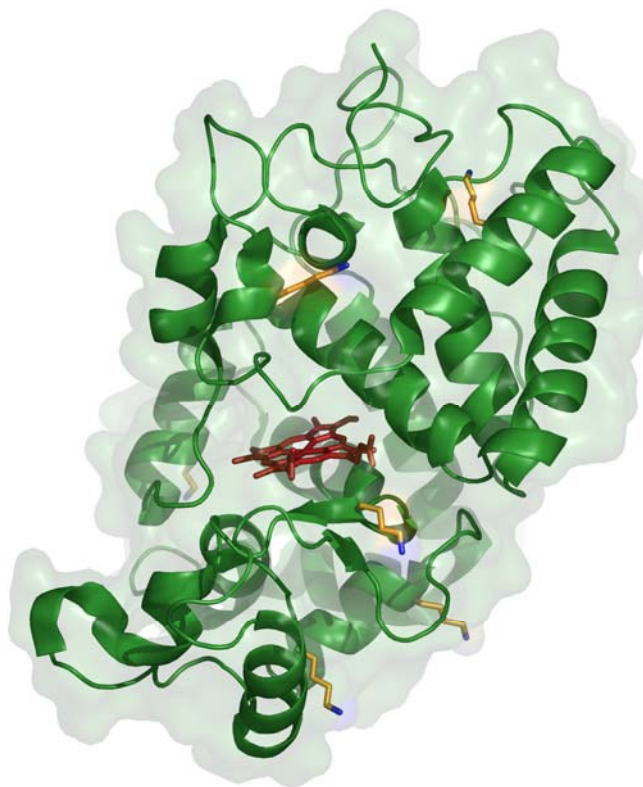
Cumber *et al.*<sup>61</sup> ovat käyttäneet SPDP:tä vasta-aine-toksiinikonjugaattien valmistamiseen (kuva 47). Sekä immunoglobuliini että toksiini (risiini, abriini tai geloniini) reagoivat erikseen SPDP:n NHS-esteripään kanssa. Toksiinia inkuboidaan SPDP:n kanssa, ja tuote puhdistetaan geelisuodatuksella. Immunoglobuliinia inkuboidaan SPDP:n kanssa samalla tavalla kuin toksiinia, mutta reaktion jälkeen SPDP:n pyridyylidisulfidisyhmä pelkistetään ditiotreitolilla sulfhydryyliryhmäksi. Modifioitu toksiini ja immunoglobuliini yhdistetään, jolloin toksiinin pyridyyliditioryhmä reagoi immunoglobuliinin tioliryhmän kanssa muodostaen difulfididoksen. Reaktiot tehdään huoneenlämmössä, ja konjugaatti puhdistetaan geelisuodatuksella.



Kuva 47. Kaaviokuva Ig-toksiini-konjugaatista (DTT = ditiotreitoli).<sup>61</sup>

Vasta-aine-entsyymikonjugaattien valmistamisessa voidaan käyttää heterobifunktionaalista maleimidi-NHS-esterilinkkeriä, SMCC:tä. SMCC:n (*N*-(4-karboksisykloheksyyli-metyyli)maleimidin *N*-hydroksisukkinimidiesteri) avulla on konjugoitu kanin Fab'-vasta-ainefragmentti piparjuuriperoksidaasientsyymiin. Piparjuuriperoksidaasin rakenne on esitetty kuvassa 48. Ensimmäisessä reaktiossa 100-kertainen ylimäärä

SMCC:tä sekoitetaan entsyymien joukkoon natriumfosfaattipuskurissa, ja linkkerin NHS-esteriryhmä reagoi entsyymien aminoryhmien kanssa 30 °C:ssa. Tuote puhdistetaan sentrifugoimalla ja geelisuodatuksella. Toisessa vaiheessa johdannaisen maleimidi-ryhmä reagoi Fab'-n kanssa tioliryhmän kanssa 4 °C:ssa, jolloin tuotteeksi saadaan suurimmaksi osaksi monomeeristä entsyymi-vasta-aine-konjugaattia hyvällä saannolla.<sup>2</sup>



Kuva 48. Piparjuuriperoksidaasin rakenne. Lysiinitähteet on esitetty keltaisena ja sinisenä tikkumallina, hemiryhmä punaisena tikkumallina ja proteiinin sekundaari-rakenne-elementit ns. cartoon-mallina. Kuva on valmistettu PyMOL-ohjelmalla (<http://pymol.sourceforge.net/>) käyttäen röntgensädekristallografian avulla määritettyjä atomikoordinaatteja (PDB-koodi 1W4W).

Bieniarz *et al.*<sup>1</sup> ovat tutkineet käsivarren pituuden vaikutusta entsyymi-vasta-ainekonjugaattien biologiseen aktiivisuuteen mikropartikkelientsyymi-immunanalyysillä (MEIA). Yleisesti oletetaan, että pidempi käsivarsi konjugoit paremmin suuria proteiineja, ja että käsivarren pituus ja joustavuus ovat keskeisiä tekijöitä biokonjugaattien synteesissä. Steeriset esteet vaikuttavat merkittävästi orgaanisten molekyylien reaktiivisuuteen ja reaktionopeuksiin sekä vesiliuoksessa että orgaanisissa liuottimissa.

Bieniarz *et al.*<sup>1</sup> konjugoivat alkalisen fosfataasin ja IgG:n 9-atomisella SMCC:llä ja SMCC:n pidennetyillä muodoilla, 16-, 23- ja 30-atomisilla LC-SMCC-linkkereillä. Linkkerin pituudella ei ole vaikutusta entsyymin aktiivisuuteen, mutta käsivarren pidentäminen parantaa vasta-aineen antamaa signaalia MEIA-kokeessa eli vasta-aineen biologista aktiivisuutta. Tämä johtuu todennäköisesti steeristen esteiden vähenemisestä vasta-aineen antigeenin tunnistamisalueella, kun vasta-aineen ja entsyymin tai matriisin välinen etäisyys kasvaa.

## 10 YHTEENVETO

Erilaisia bifunktionaalisia reagensseja tunnetaan paljon, joten kuhunkin käyttötarkoitukseen löytyy runsaasti vaihtoehtoja. Suurin osa linkkerien funktionaalisista ryhmistä reagoi spesifisesti esimerkiksi amino- tai tioliryhmien kanssa. N-Terminaaliset aminoryhmät, lysiinitähteiden  $\epsilon$ -aminoryhmät, ja kysteiinien tioliryhmät ovat yleisimpiä linkkereillä modifioitavia ryhmiä proteiineissa.

Imidoesterit ja NHS-esterit reagoivat aminoryhmien kanssa. Imidoesterien reaktiossa muodostuu positiivisesti varautunut amidiini ja NHS-esterien reaktiossa neutraali amidisidos. NHS-esterit kestävät hydrolyysiä paremmin kuin imidoesterit, joten niillä konjugointisaanto on yleensä parempi. Siksi NHS-esterit ovat nykyään suositumpia kuin imidoesterit. Toisaalta imidoesterit ovat vesiliukoisia, mikä helpottaa niiden käyttöä puskuriliuoksissa. NHS-esterit liukenevat huonosti veteen, mutta niiden vesiliukoisuus paranee, kun käytetään sulfonoituja *N*-hydroksisulfosukkinimidiestereitä. Kun proteiini konjugoidaan imidoesterillä, sen nettovaraus säilyy, mutta NHS-esterillä konjugoitaessa nettovaraus pienenee yhden yksikön jokaista syntynyttä amidisidosta kohti. Lopullisen paremmuuden ratkaisee linkkerin käyttötarkoitus.

Yleisimpiä tiolispesifisiä reagensseja ovat maleimidit, pyridyylidisulfidit ja aktiiviset halogeenit eli  $\alpha$ -halokarbonyylit. Pyridyylidisulfidien reaktiossa tioliryhmän kanssa muodostuu disulfidisilta, joka ei ole yhtä stabiili kuin maleimidien ja  $\alpha$ -halokarbonyylien muodostama tioetterisidos. Disulfidisilta on herkkä pelkistävälle reagensseille, kuten ditiotreitolille tai 2-merkaptoletanolille, ja tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää silloin kuin tarvitaan reversiibeli sidos. Jos halutaan valmistaa stabiileja konjugaatteja, maleimidi tai  $\alpha$ -halokarbonyyli antaa luotettavamman tuloksen.  $\alpha$ -Halokarbonyylit, erityisesti jodoasetamidit, saattavat reagoida tiolien lisäksi myös histidiiniin ja metioniiniin kanssa, kun taas maleimidit reagoivat ainoastaan tioliryhmien kanssa.

Maleimidit ja  $\alpha$ -halokarbonyylit kestävät hydrolyysiä paremmin kuin aminospesifiset reagenssit. Proteiineissa on yleensä lysiinitähteitä huomattavasti enemmän kuin kysteiinejä (vrt. kuva 43), joten tiolispesifisillä reagensseilla reaktiopaikka on paremmin hallittavissa. Toisaalta aminospesifiset reagenssit ovat hyödyllisempiä, jos halutaan kiinnittää proteiiniin suuri määrä linkkerimolekyylejä. Usein kaksi reaktiivisuutta

yhdistetään samaan molekyyliin heterobifunktionaaliseksi maleimidi-NHS-esteri-linkkeriksi. Tällaisella reagenssilla konjugointireaktio tehdään kahdessa vaiheessa, mikä mahdollistaa kahden erilaisen proteiinin kontrolloidun yhdistämisen.

Aryyliatsidit ovat valoaktiivisia reagensseja, jotka reagoivat fotolyysin jälkeen nopeasti ja epäspesifisesti lähellä olevien kovalenttisten sidosten kanssa. Siksi aryyliatsideilla saadaan hyvin heterogeenisiä konjugaatteja. Erityisesti diatsideilla reaktiosaanto voi jäädä pieneksi, koska molempien ryhmien täytyy reagoita kohdemolekyylin kanssa, ja reaktiot liuotinmolekyylien kanssa pienentävät saantoa. Atsidit ovatkin yleisempiä heterobifunktionaalisisissa reagensseissa, joissa toinen pää reagoi ensin pimeässä tavallisen kemiallisen reagenssin tapaan. Tällöin linkkerin toinen pää saadaan ankkuroitua mahdollisesti tunnettuun paikkaan proteiinissa, jonka jälkeen atside kiinnittyy nopeasti linkkerin käsivarren kantaman sisällä olevaan ryhmään. Atsidien etuna on nopea konjugointireaktio, sillä aryylnitreenien puoliintumisaika on noin  $10^{-2}$ – $10^{-4}$  s. Reaktion saantoa voidaan parantaa lisäämällä aryyliatsidin bentseenirenkaaseen hydroksyyli- tai nitroryhmiä, tai fluorisubstituentteja. Ne tehostavat nitreenin reaktiota C-H-sidosten kanssa, todennäköisesti lisäämällä nitreenin reaktiivisuutta ja ehkäisemällä molekyylin sisäistä renkaanlaajenemista.

Linkkerit valmistetaan suhteellisen yksinkertaisilla laboratoriosynteeseillä. Valmistuksessa täytyy kuitenkin huomioida linkkereiden funktionaalisten ryhmien reaktiivisuus, esimerkiksi kosteudelle herkät imidoesterit ja NHS-esterit suojataan kosteudelta jo valmistuksen aikana, ja valoherkät atsidit suojataan kirkkaalta valolta. Synteesireitit ovat suhteellisen yhteneviä kullekin linkkeriryhmälle. Esimerkiksi aryyliatsidit valmistetaan aniliinijohdannaisista diatsotoimalla ja substituutioreaktiolla natriumatsidin kanssa, NHS-esterit valmistetaan DCC-menetelmällä esteröimällä happo *N*-hydroksisukkinimidillä *N,N*-disykloheksyylikarbodiimidin läsnä ollessa, ja imidoesterit valmistetaan nitriileistä reaktiolla HCl-kaasun ja alkoholin kanssa. Maleimidilinkkerit valmistetaan esimerkiksi *N*-substituoidusta maleimidijohdannaisesta, johon liitetään linkkerin käsivarsi.

Heterobifunktionaalisten reagenssien valmistuksessa synteesireitit suunnitellaan niin, että käytettäviä reaktio-olosuhteita huomommin kestävä ryhmä syntetisoidaan viimeiseksi. Esimerkiksi maleimidi-NHS-esteri-linkkereillä maleimidipää ja käsivarsi valmistetaan ensin, ja käsivarren toiseen päähän jäävä vapaa happoryhmä esteröidään

lopuksi *N*-hydroksisukkinimidillä. Atsidi-imidoesteri-linkkereiden ja atsidi-NHS-esteri-linkkereiden tapauksessa atsidiryhmä valmistetaan ensin, ja aminospesifinen ryhmä syntetisoidaan viimeiseksi. Atsidin muodostumisen jälkeen reaktioseosta suojataan valolta.

Pitkäketjuisia linkkereitä valmistetaan joko pitkän alkyyliketjun omaavista lähtöaineista tai käyttämällä hyväksi jo olemassa olevan linkkerin funktionaalisten ryhmien reaktiivisuutta. Tyypillinen esimerkki on valmiin linkkerin NHS-esteripään reaktio  $\omega$ -aminohapon aminoryhmän kanssa, jonka jälkeen linkkeri aktivoidaan uudestaan esteröimällä happoryhmä *N*-hydroksisukkinimidillä.

Bifunktionaalisia reagensseja käytetään proteiini-interaktioiden tutkimiseen, erilaisten konjugaattien valmistamiseen ja molekyylien kiinnittämiseen pinnoille eli immobilisoimiseen. Sopivan linkkerin valintaan vaikuttavat monet seikat, joista tärkein on linkkerin funktionaaliset ryhmät. Proteiini-interaktioiden tutkimisessa käytetään yleensä aminospesifisiä homobifunktionaalisia reagensseja, koska vapaat aminoryhmät ovat proteiineissa yleensä runsaasti edustettuina, tai heterobifunktionaalisia aryylisideja, joilla voidaan hyödyntää nopeaa konjugointireaktiota. Jos käytetään lohkeavaa käsivartta, reaktiotuotteita voidaan analysoida kaksisuuntaisen SDS-PAGE:n avulla. Tavallisia lohkeavia ryhmiä ovat disulfidi-, glykoli-, atso-, ja esteriryhmät. Disulfididokset voidaan katkaista pelkistävällä ditiotreitolilla tai 2-merkptoetanolilla, glykoliryhmät perjodaatilla ja atsoidokset natriumditioniitillä. Kun konjugointi tehdään eripituisilla linkkereillä, saadaan tietoa aminohappoketjujen välisistä etäisyyksistä.

Konjugaattien valmistamisessa käytetään tavallisesti heterobifunktionaalisia reagensseja, kun yhdistetään kaksi erilaista proteiinia tai molekyyliä. Myös proteiinien kiinnitys erilaisiin pintoihin tehdään heterobifunktionaalisten reagenssien avulla. Esimerkiksi kultapintaan voidaan kiinnittää linkkereitä, joiden toisessa päässä on disulfidiryhmä ja toisessa päässä proteiiniin kiinnittyvä amino- tai tiolispesifinen ryhmä.

**Kokeellinen osa**

## 11 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Avidiinin vahvaa, lähes irreversiibeliä sitoutumista biotiiniin hyödynnetään paljon bio- ja lääketieteen sovelluksissa. Avidiini on kananmunan valkuaisesta eristetty proteiini, joka sitoo biotiinia heikommin muitakin ligandeja, kuten 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappoa eli HABA:a. Avidiinin HABA-affiniteettia on pyritty parantamaan mutaatioiden avulla<sup>63</sup>. Työn tavoitteena oli syntetisoida käsivarrellinen HABA ja liittää se sopivaan proteiiniin, sekä käyttää syntynyttä konjugaattia avidiinin mutanttien HABA-affiniteetin seulomiseen.

Työn toisessa osassa tutkittiin uutta kanan (*Gallus gallus*) biotiinia sitovaa proteiinia BBP-A:ta ja sen mutanteja. Tarkoitus oli selvittää, miten BBP-A:n ominaisuudet eroavat avidiinista mm. biotiinin sitomiskyvyn suhteen, ja voidaanko BBP-A:n ominaisuuksia muuttaa valittujen mutaatioiden avulla. Lisäksi haluttiin tutkia, vastaavatko BBP-A:n ominaisuudet aikaisemmin kananmunan keltuaisesta<sup>64,65</sup> ja valkuaisesta<sup>66</sup> löydettyjen biotiinia sitovien proteiinien (engl. biotin-binding protein, BBP) ominaisuuksia eli onko BBP-A joku aiemmin tutkituista BBP:sta. Mittauksia varten BBP-A:ta tuotettiin *Spodoptera frugiperda* -hyönteissoluissa bakulovirus-ekspressiosysteemin avulla. Lisäksi työssä käytettiin aiemmin bakteerisoluihin tuotettua BBP-A:ta ja sen kahta mutatoitua muotoa.<sup>67</sup>



## **12 MATERIAALIT JA MENETELMÄT**

### **12.1 Käsivarrellisen HABA:n synteesi**

HABA eli 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo on atsobentseeniyhdiste, joka syntetisoidaan yksinkertaisista lähtöaineista diatsotointireaktion avulla. Työn synteettisessä osassa HABA-molekyylin bentseenirenkaaseen syntetisoitiin käsivarsi, jonka avulla molekyyli kiinnitettiin kovalenttisesti proteiiniin. Käsivarren päässä oleva HABA voi edelleen sitoutua ligandina avidiiniin. Käsivarrellisen HABA:n synteesi tehtiin mukaillen viitteen 68 synteessiohjetta.

#### **12.1.1 Reagensseja**

Taulukossa 1 on esitetty synteettisessä työssä käytetyt reagenssit, niiden valmistajat ja puhtausasteet.

Taulukko 1. Käsivarrellisen HABA:n synteesissä käytetyt reagenssit ja liuokset

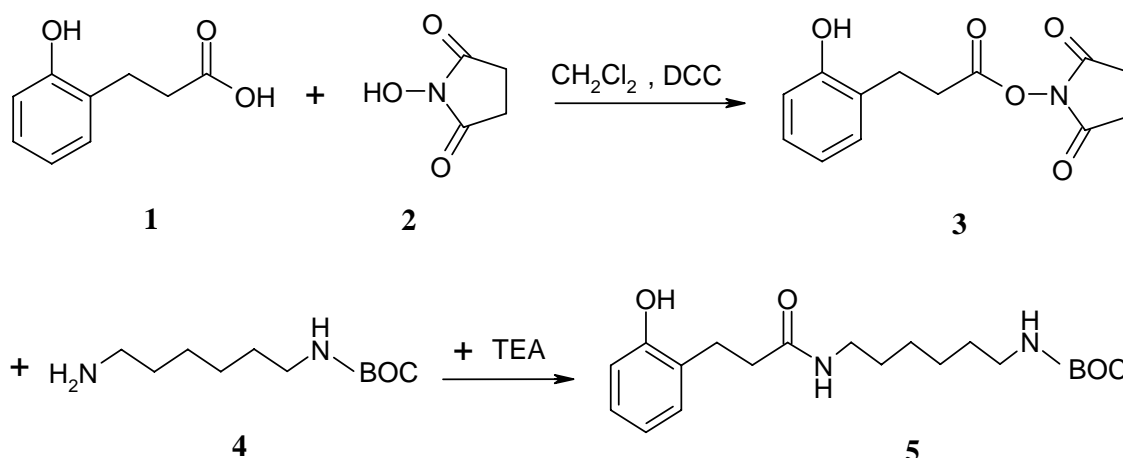
Reagenssi/liuos	Valmistaja	Puhtausaste
Antraniilihappo	Acros Organics	98+ %
<i>N</i> -BOC-1,6-diaminoheksaani	Fluka	≥98 %
3-(2-hydroksifenyyli)propionihappo	Aldrich	99 %
Kaliumhydroksidi, KOH	BDH	≥ 85 %
Natriumnitriitti, NaNO <sub>2</sub>	Merck	≥99 %
Suolahappo, HCl	Riedel-de Haën	≥ 37 %
Natriumhydroksidi, NaOH	Merck	≥ 99 %
Sitruunahappomonohydraatti	Baker	2064 `Baker` Grade
1,4-dioksaani	J.T. Baker	≥ 99 %
Dimetyyliformamidi	Lab-Scan	99,8 %
Asetonitriili	Mallinckrodt	HPLC
Dietyylieetteri	Merck	99,5 %
Etyyliasettaatti	Lab-Scan	99,8 %
Dikloorimetaani	Fluka	99,9 %
Di-( <i>N</i> -sukkinimidyli)-karbonaatti	Fluka	≥95 %
<i>N,N'</i> -disykloheksyylikarbodi-imidi	Acros Organics	99 %
Trietyyliamiini	Riedel-de Haën	≥ 99 %
<i>N</i> -hydroksisukkinimidi	Aldrich	97 %
Silikageeli 60 (0,040 - 0,063 mm)	Merck	
Natriumvetykarbonaatti, NaHCO <sub>3</sub>	J.T.Baker	99,0 - 101,0 %
Natriumsulfaatti, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Riedel-de Haën	≥ 99%
Metanoli	Fluka	99,8 %
Kloroformi	BDH	99,0 - 99,4 %
Molekyyliseula 4 Å	Prolabo	

### 12.1.2 Käsivarsi

1,0 g 3-(2-hydroksifenyyli)propanihappoa (**1**) liuotettiin 17 ml:aan dikloorimetaania. Huoneenlämpöiseen liuokseen lisättiin 0,83 g *N*-hydroksisukkinimidiä (**2**). 1,49 g *N,N'*-disykloheksyylikarbodi-imidiä (DCC) liuotettiin 4 ml:aan dikloorimetaania ja lisättiin reaktioseokseen. Seoksen annettiin reagoida pystyjäähdyttäjän alla neljä tuntia sekoittaen. Vapautunut disykloheksyyliurea poistettiin suodattamalla ja suodokseen

lisättiin 1,6 ml *N'*-BOC-1,6-diaminosykloheksaania (**4**) ja 835  $\mu$ l trietyyliamiinia (TEA). Seosta sekoitettiin yön yli.

Dikloorimetaani evaporoitiin vaaleankellertävästä reaktioseoksesta pyöröhaiduttimella, ja tuote **5** erotettiin jäännöksestä uuttamalla se 21 ml:lla etyyliasettaattia. Saostunut disykloheksyyliurea suodatettiin pois liuksesta. Uuttoliuosta pestiin kaksi kertaa 7 ml:lla 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>:a, kaksi kertaa 7 ml:lla 0,1 M sitruunahappoa ja kolme kertaa 7 ml:lla vettä. Uutos kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, ja liuotin evaporoitiin. Jäljelle jäänyt öljymäinen tuote uutettiin 30 ml:lla dietyylieetteriä, ja saostunut disykloheksyyliurea suodatettiin pois. Liuotin evaporoitiin ja tuote **5** kuivattiin vakuumilinjassa, jolloin se saostui valkoisena jauheena. Kuvassa 49 on esitetty synteesireitti lähtien 3-(2-hydroksi-fenyyli)propanihaposta (**1**) tuotteeseen **5**. Saanto oli 0,85 g (39 %).



Kuva 49. Synteesireitti tuotteeseen **5** (BOC = *tert*-butoksikarbonyyli).

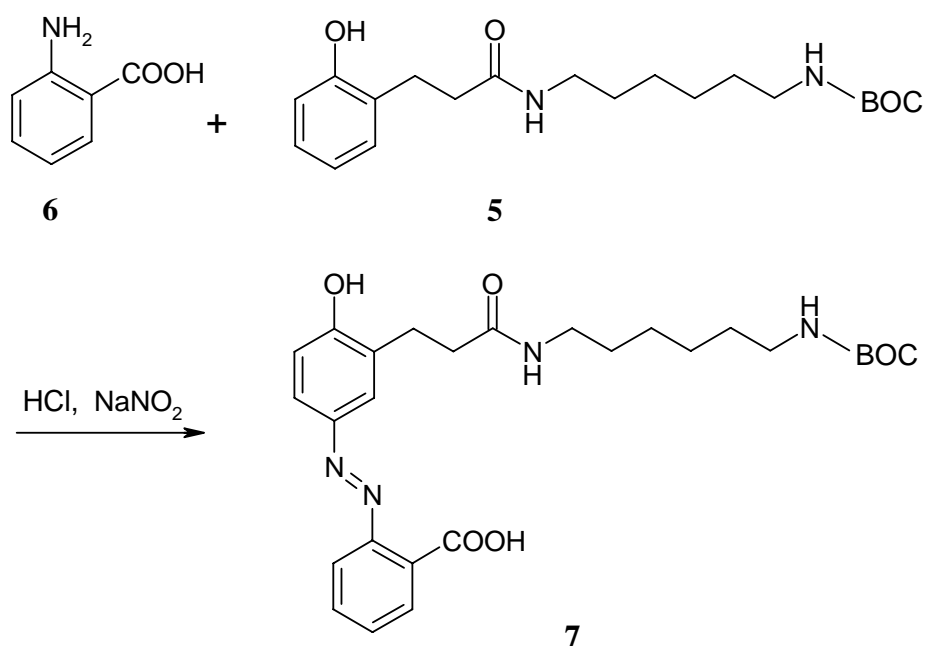
### 12.1.3 Diatsotointi

0,22 g anraniilihappoa (**6**) liuotettiin 4,6 ml:aan vettä ja liuokseen lisättiin 0,5 ml 18 % suolahappoa. Liuos jäähdytettiin jäähauteella 0–5 °C lämpötilaan. 0,12 g natriumnitriittiä liuotettiin 1 ml:aan vettä ja jäähdytettiin jäähauteella. Natriumnitriittiliuosta lisättiin tipoitain anraniilihappoliuoksen joukkoon siten että lämpötila pysyi välillä 0–5 °C.

0,42 g yhdistettä **5** liuotettiin seokseen, jossa oli 4 ml:a metanolia ja 3 ml:a 0,5 M KOH-liuosta. Seos jäädytettiin 0–5 °C lämpötilaan, ja siihen lisättiin hiljalleen sekoittaen diatsotoitu antraniilihappoliuos. Lisäyksen aikana seos muuttui punaiseksi, tahmeaksi aineeksi. Lisäyksen jälkeen reaktiota jatkettiin 1,5 tuntia.

Liuoksen pH säädettiin 8:aan 0,5 M KOH-liuoksella, ja metanoli evaporoitiin pois. Tämän jälkeen liuoksen pH säädettiin 4:ään 0,1 M sitruunahapolla, ja tuotteen annettiin saostua yön yli jääkaapissa.

Tuote uutettiin neljä kertaa yhteensä 30 ml:lla etyyliasettaattia. Uutos pestiin vedellä kolme kertaa ja kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla. Liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella ja vakuumilinjassa. Puhdistettu tuote **7** oli ruskeaa, öljymäistä ainetta. Kuvassa 50 on esitetty diatsotointireaktio.



Kuva 50. Synteesireitti tuotteeseen **7**.

#### 12.1.4 *tert*-Butoksidikarbonyylisuojauksen purkaminen

Tuote **7** liuotettiin noin 30 ml:aan molekyylliseuloilla kuivattua dioksaania. Liuokseen lisättiin noin 25 ml HCl-kaasulla kyllästettyä dioksaania, jolloin liuoksen väri muuttui tumman ruskeaksi. Liuoksen annettiin kiteytyä jääkaapissa 1,5 tuntia. Sakka suodatettiin

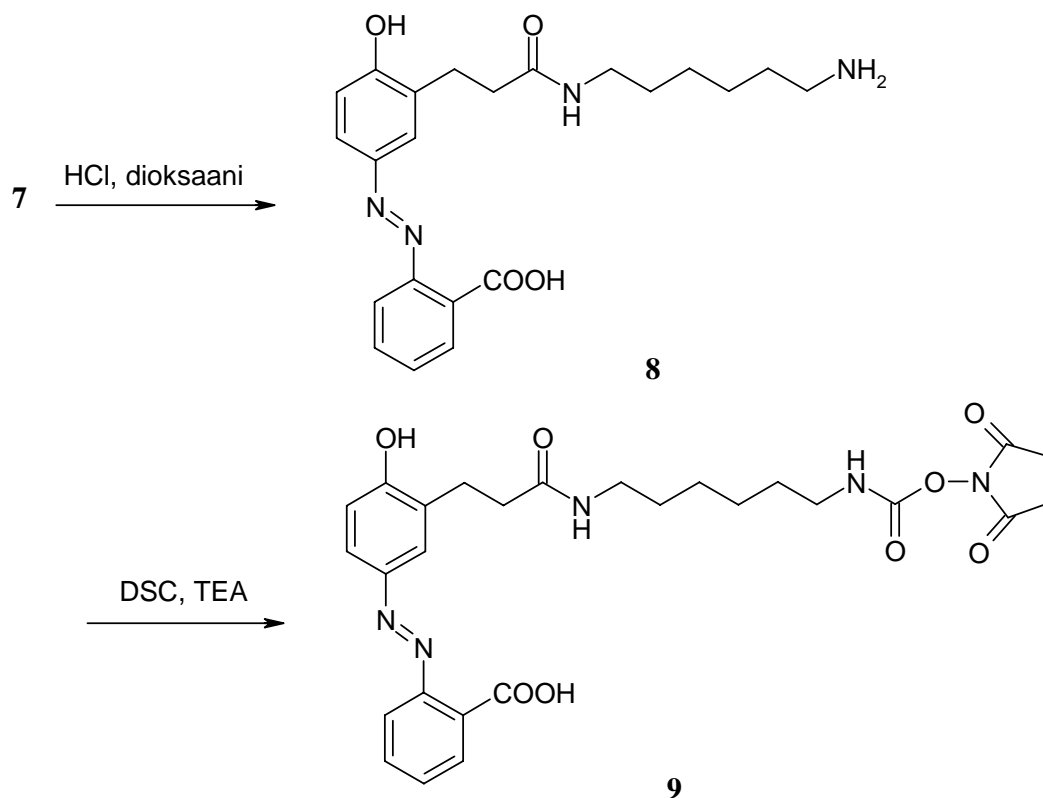
ja pestiin natrium-kuivatulla eetterillä. Ennen eetteripesua tuote **8** oli hyvin tahmeaa ja vaikeaa käsitellä, sillä yhdiste on erittäin hygroskooppista. Eetteripesu poisti tuotteesta vettä, jolloin tuote muuttui osittain jauhomaiseksi. Tuote **8** kuivattiin vakuuissa. Saanto oli 0,28 g (59 %).

Tuote **8** puhdistettiin silikageelipylväällä käyttäen eluenttina kloroformi-metanoli-seosta vaihtelevilla suhteilla 4:1–1:1. Aluksi eluenttina käytettiin 4:1 seosta, jolla saatiin eluoitumaan nopeammin kulkeutuvat, vähemmän polaariset epäpuhtaudet. Tämän jälkeen eluentin polarisuutta lisättiin, kunnes lopuksi eluenttina käytettiin 1:1 seosta.

### 12.1.5 *N*-hydroksisukkinimidiesteröinti

NHS-esteröinti eli *N*-hydroksisukkinimidiesteröinti tehtiin pienelle määrälle aiemmin valmistettua (Juha Määttä) ja puhdistamatonta tuotetta **8**. 25 mg disukkinimidyylis-karbonaattia (DSC) liuotettiin 2,0 ml:aan asetonitriiliä. Liukeneminen oli hidasta ja vaati pitkän sekoitusajan. Toisessa astiassa liuotettiin 20 mg tuotetta **8** 0,5 ml:aan dimetyyliformamidia ja liukseen lisättiin 14 µl trietyyliamiinia (TEA). Seos lisättiin hitaasti tipoittain DSC-liuokseen sekoittaen magneettisekoittajalla huoneenlämmössä 4,5 tunnin aikana. Kun koko seos oli lisätty, reaktioseoksen väri oli vaihtunut keltaisesta ruskeaksi. Reaktioseosta sekoitettiin edelleen magneettisekoittajalla ja 40 minuutin kuluttua seokseen lisättiin tipoittain 1,5 ml 1 M HCl-liuosta.

Reaktioseos jätettiin yöksi jääkaappiin kiteytymään. Liuotin evaporoitiin pyörö-haihduttimella ja vakuuolinjassa vuorokauden ajan. Reaktiokolvin pohjalle jäi siirappimainen tuote **9**, jota pestiin laimealla suolahapolla. Kuvassa 51 on esitetty reaktiokaavio BOC-suojauksen purkamisesta ja NHS-esteröinnistä, sekä käsivarrellisen 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylisäpon rakenne.



Kuva 51. NHS-esteröinti tuotteelle **8** ja käsivarrellinen HABA (**9**).

### 12.1.6 Tuotteiden karakterisointi

Tuotteiden karakterisointiin käytettiin massaspektrometriaa, NMR-spektrometriaa ja tuotteen sulamispisteen määrittäystä. Tuloksia verrattiin kirjallisuusarvoihin<sup>68</sup>.

Massaspektrometria on hyvin yleinen ja käyttökelpoinen menetelmä yhdisteiden molekyylipainon määrittämiseen. Menetelmä perustuu näytteen ionisoimiseen kaasutilassa ja syntyneiden ionien massa-varaussuhteen määrittämiseen.<sup>69</sup> Näytteiden ionisoimiseen voidaan käyttää erilaisia menetelmiä. Tavallisesti näyte ensin höyrystetään, minkä jälkeen se ionisoidaan esimerkiksi elektronisuihkun avulla (viite 18 s. 904). Sähkösumutuksessa (ESI, electrospray ionization) höyrystäminen ja ionisointi tapahtuvat yhtä aikaa. Sähkösumutus soveltuu orgaanisten yhdisteiden lisäksi polypeptidien, proteiinien, oligonukleotidien ja inorgaanisten yhdisteiden ionisoimiseen (viite 70 s. 499–511).

Massaspektrometrimittaukset tehtiin Micromass LCT sähkösumutusmassaspektrometrillä, jossa on lentoaikadetektor. Liuottimina käytettiin metanolia tai asetoniiriä. Näytteen syöttönopeus oli 20–30 µl/min, ja spektrometrin jännitteet olivat: kapillaari 3200–3500 V, näytesuppilo 40–80 V ja RF-linssi 200–400 V. Tuote **5** analysoitiin VG AutoSpec massaspektrometrillä kiinteästä näytteestä.

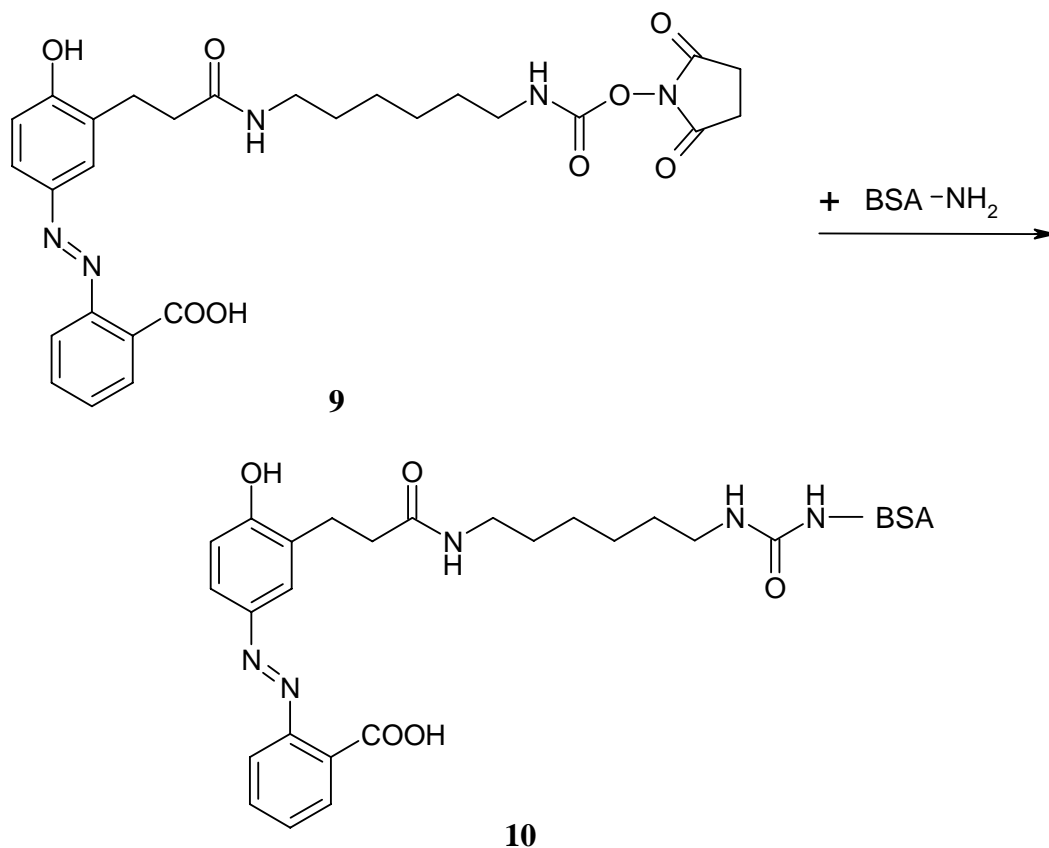
NMR-spektroskopia perustuu radiotaajuisten sähkömagneettisen säteilyn absorptioon mittaamiseen. Näyte asetetaan voimakkaaseen magneettikenttään, jotta ytimet ovat sopivassa energiatilassa säteilyn absorboimiseen (viite 70 s. 445). NMR-mittaukset tehtiin Bruker Avance DPX 250 NMR-spektrometrillä ja Bruker Avance DRX 500 NMR-spektrometrillä. Mittaukset tehtiin 30 °C:een lämpötilassa, ja liuottimina käytettiin deuteroituja liuottimia, DMSO-d<sub>6</sub>:a, CDCl<sub>3</sub>:a ja CD<sub>3</sub>OD:a.

Tuotteiden sulamispisteet mitattiin Mettler Toledo FP62 -sulamispistemittarilla.

## **12.2 Käsivarrellisen HABA:n liittäminen proteiiniin**

1,2 mg BSA-proteiinia liuotettiin 1 ml:aan NF100-puskuria (liuokset ja reagenssit on esitelty liitteessä 3). Liuos lisättiin astiaan, jossa oli arviolta 10 µg tuotetta **9**, jolloin BSA:n ja HABA:n moolisuhde oli noin 1:1. Osa tuotteesta **9** liukeni puskuriliuokseen, sillä liuos muuttui oranssiksi. Seosta inkuboitiin keinuravistelijassa huoneenlämmössä 72 tuntia valolta suojattuna.

Liuos pipetoitiin 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen ja sentrifugoitiin (13 000 rpm, 5 min). Supernatantti dialysoitiin dialyysiletkussa (Medicell International Ltd, 12000–14000 Da) NF100-puskuria vasten yön yli. Dialyysin jälkeen liuoksen väri säilyi oranssina, joten tuote **9** oli vahvasti kiinnittynyt BSA-proteiiniin. Kuvassa 52 on esitetty käsivarrellisen HABA:n liittäminen BSA-proteiiniin ja HABA-BSA-konjugaatin rakenne.



Kuva 52. Käsivarrellisen HABA:n (**9**) kiinnittäminen BSA-proteiiniin ja HABA-BSA-konjugaatin rakenne (**10**).

### 12.3 ELISA

ELISA:n (enzyme-linked immunosorbent assay) avulla voidaan tutkia, sisältääkö näyte tiettyä antigeeniä (viite 71 s. 232). Näytteen proteiinit adsorboidaan inertille pinnalle, yleensä 96-kuoppaiselle polystyreenilevyllä. Levyn vapaat sitoutumiskohdat peitetään epäspesifisellä proteiinilla. Levyä käsitellään ensimmäistä vasta-ainetta (primäärivasta-aine) sisältävällä liuoksella, joka kiinnittyy spesifisesti tutkittavaan proteiiniin, antigeeniin. Sitoutumaton vasta-aine pestään pois, ja levyllä lisätään toista vasta-ainetta, joka tunnistaa ensimmäisen vasta-aineen (sekundäärivasta-aine). Sekundäärivasta-aineeseen on liitetty entsyymi, joka katalysoi reaktiota, jossa syntyy värillinen tuote. Sitoutumaton vasta-aine pestään pois, ja levyllä lisätään entsyymin substraattiliuosta. Reaktiotuotteen syntyminen eli värin intensiteetti on verrannollinen tutkittavan proteiinin konsentraatioon näytteessä.



Kokeessa tutkittiin ELISA:n avulla, sitoutuuko avidiini ja avidiinin N118M-mutantti<sup>63</sup> spesifisesti HABA-BSA-konjugaattiin. HABA-BSA-konjugaatti adsorboitiin kuoppalevyn pintaan, ja vapaaksi jääneet sitoutumispaikat blokattiin BSA-liuoksella. Levylle lisättiin avidiiniliuosta. Sitoutumisen spesifisyyden tutkimiseksi kontrollikuoppiin lisättiin *d*-biotiniä, johon avidiinilla on suurempi affiniteetti kuin 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappoon. Sitoutunut avidiini tunnistettiin kanissa tuotetulla polyklonaalisella avidiinin vasta-aineella (Oulun yliopisto). Toisena vasta-aineena käytettiin vuohessa tuotettua anti-kani vasta-ainetta, johon oli liitetty alkalinen fosfataasi (GAR-AP, Bio-Rad 170-6518). Levyn pesemiseen käsittelyjen välillä käytettiin PBS-Tween -puskuria.

HABA-BSA-konjugaattiliuosta (1 mg/ml) laimennettiin 1/100. Kuoppalevy (Costar, E.I.A./R.I.A. Plate nro 3590) päällystettiin HABA-BSA-konjugaatilla pipetoimalla 50 µl laimennosta kuoppiin ja inkuboimalla huoneenlämmössä 30 minuuttia. Levy pestiin kolme kertaa PBS-Tween -puskurilla. Vapaat sitoutumispaikat blokattiin 1 % BSA-liuoksella (100 µl 90 minuuttia huoneenlämmössä). Kuopat pestiin kertaalleen puskuriliuoksella. Kontrollikuoppiin pipetoitiin 3,3 µl 15 mM biotiiniliuosta.

Avidiinista (Belovo S. A., Bastogne, Belgia) valmistettiin 1, 10 ja 100 µg/ml vahvuiset liuokset. Liuoksia pipetoitiin 50 µl kuhunkin kuoppaan. Avidiinin N118M-mutanttia pipetoitiin 1 ja 10 µg/ml vahvuisena liuksena kuoppiin. Sekä biotiinittomiin että biotiinia sisältäviin kuoppiin jätettiin nollanäyte, joihin lisättiin avidiinin sijaan pelkkää puskuria. Kaikki näytteet pipetoitiin duplikaatteina. Levyä inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C:ssa, ja kuopat pestiin kolme kertaa puskuriliuoksella.

Polyklonaalista avidiinin vasta-ainetta laimennettiin 1/5000 1 % BSA-liuokseen, ja sitä pipetoitiin 100 µl kuoppaa kohti. Levyä inkuboitiin 30 min 37 °C:ssa, ja kuopat pestiin kolme kertaa puskuriliuoksella. GAR-AP-vasta-ainetta laimennettiin 1/2000 1 % BSA-liuokseen, ja sitä pipetoitiin 100 µl kuoppaa kohti. Levyä inkuboitiin 30 min 37 °C:ssa, ja kuopat pestiin kuusi kertaa puskuriliuoksella.

Jokaiseen kuoppaan lisättiin 100 µl alkalisen fosfataasin PNPP-substraattiliuosta. Reaktiota seurattiin mittaamalla absorbanssi 405 nm aallonpituudella Labsystems Type 314 ELISA-lukijalla.

## 12.4 Uusi biotiinia sitova proteiini BBP-A

Erikoistyön toisessa osassa tutkittiin uuden biotiinia sitovan proteiinin, BBP-A:n, rakenteellisia ja toiminnallisia ominaisuuksia. Proteiinia tuotettiin *Spodoptera frugiperda*-hyönteissoluissa bakulovirusekspressiosysteemillä. Lisäksi käytettiin aiemmin bakteerisoluisissa tuotettua BBP-A:ta ja sen kahta mutatoitua muotoa, BBP-A(A74S):a ja BBP-A(T118F):a.<sup>67</sup>

Proteiinin teoreettinen molekyylipaino laskettiin aminohapposekvenssin perusteella ProtParam-ohjelmalla<sup>72</sup>. Sekvenssistä vähennettiin signaalipeptidi SignalP 3.0 -ohjelman<sup>73,74</sup> ennustaman katkaisukohtaan mukaan. Lisäksi ProtParam-ohjelmalla laskettiin teoreettinen isoelektrinen piste, pI, ja molaarinen absorptiokerroin  $\epsilon$ .

Proteiinia analysoitiin SDS-PAGE:n eli natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidi-geelielektroforeesin ja immunoblotauksen avulla käyttäen polyklonaalista avidiinin vasta-ainetta. Proteiinille määritettiin molekyylipaino ESI-MS-kokeen avulla ja sen kvaternäärirakennetta tutkittiin geelisuodatuksella. Proteiinin kvaternäärisen rakenteen lämpöstabiilisuutta tutkittiin elektroforeettisella menetelmällä. Lisäksi tutkittiin Endoglykosidaasi H -käsittelyn avulla, oliko hyönteissolutuotettu BBP-A glykosyloitu. Proteiinin biotiininsitomiskykyä tutkittiin määrittämällä proteiini-biotiinikompleksin dissosiaationopeusvakio fluoresenssispektrofotometrisesti ja radioaktiivisen biotiinin avulla. Työssä käytetyt liuokset ja reagenssit on esitetty liitteessä 3.

### 12.4.1 BBP-A:n tuottaminen hyönteissoluissa

#### 12.4.1.1 Hyönteissolujen transfektio

BBP-A:ta tuotettiin bakulovirusekspressiosysteemillä *Spodoptera frugiperda* Sf9-hyönteissoluissa. Solut transfektoitiin kuusikuoppaisilla soluviljelylevyillä (Nunc) käyttäen lipofektiota. Lipofektiossa syntetoinen lipidi muodostaa komplekseja DNA:n kanssa. DNA:ta sisältävät kompleksit fuusioituvat solukalvoon, jolloin DNA siirtyy solun sisään.<sup>75</sup>

Transfektioon käytettiin aikaisemmin valmistettua bakuloviruksen genomia, BBP-A-bakmidia<sup>67</sup> ja Cellfectin<sup>®</sup> -reagenssia (Invitrogen). Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin steriilisti 1 ml Sf9-hyönteissolususpensiota ( $1 \cdot 10^6$  solua/ml) ja 1 ml Insect-Xpress -kasvatusmediumia (Cambrex Bioscience Walkersville Inc.). Levyä inkuboitiin 28 °C:ssa 75 minuuttia solujen kiinnittymisen aikaansaamiseksi.

Jokaista kuoppaa varten valmistettiin bakmidi-liuokset: Eppendorf-putkissa sekoitettiin 10 µl BBP-A-bakmidia ja 100 µl kasvatusmediumia. Lisäksi valmistettiin Cellfectin<sup>®</sup> -liuokset: Eppendorf-putkiin pipetoitiin 5 µl Cellfectin<sup>®</sup> -reagenssia ja 100 µl kasvatusmediumia. Putkia sekoitettiin naputtelemalla. Cellfectin<sup>®</sup> -liuokset pipetoitiin bakmidi-liuosten sekaan ja putkia inkuboitiin 45 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen putkiin lisättiin 800 µl kasvatusmediumia.

Solujen kiinnittyminen kuoppiin tarkistettiin mikroskoopilla ja solut pestiin kerran 2 ml:lla kasvatusmediumia. DNA-lipidi-seos pipetoitiin solujen päälle ja levy siirrettiin inkubaattoriin 28 °C:een neljäksi tunniksi. Inkuboinnin jälkeen medium pipetoitiin kuopista pois, ja jokaiseen kuoppaan lisättiin 2 ml uutta mediumia. Inkubointia jatkettiin 28 °C:ssa noin neljä vuorokautta.

#### **12.4.1.2 Virusten monistaminen ja proteiinin tuottaminen**

Transfektoitujen solujen mediumia käytettiin infektoimaan 20 ml  $1 \cdot 10^6$  solua/ml Sf9-soluja. Inkubointi lopetettiin 3 vuorokauden kuluttua ja hyönteissolususpensioille tehtiin biotiinin sitoutumiskoe fluoresenssispektrofotometrillä eli tutkittiin vaimeneeko BF560-leimatun biotiinin fluoresenssi hyönteissolususpension läsnä ollessa<sup>76</sup>. Kokeen avulla havaittiin, että infektiio oli onnistunut.

Proteiinin hyönteissolutuottoa varten infektoitiin 100 ml:n erä Sf9-soluja ( $2 \cdot 10^6$  solua/ml). Ennen infektiota hyönteissolut oli siirretty biotiinittomaan HyQ SFX-Insect -mediumiin (HyClone). Solujen sekaan pipetoitiin steriilisti 1 ml 20 ml:n infektiosta sentrifugoimalla eristettyä bakulovirus-mediumia. Infektoituja soluja inkuboitiin kolmen vuorokauden ajan 28 °C:ssa 120 rpm ravistelussa.

Infektio pysäytettiin kolmen vuorokauden kuluttua. Infektio pipetoitiin steriilisti kahteen 50 ml:n putkeen. Putkia sentrifugoitiin Hermle Z 513 K -sentrifuugilla viisi minuuttia 1500 rpm. Supernatantti pipetoitiin pois ja säästettiin mahdollista myöhempää käyttöä varten. Solut pakastettiin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **12.4.1.3 Proteiinin eristäminen**

BBP-A eristettiin bakulovirus-infektoiduista hyönteissoluista affiniteetikromatografian avulla käyttäen sefaroosiin immobilisoitua 2-iminobiotiinia<sup>77</sup>. Aluksi solut suspensoitiin 30 ml:aan HilloI -puskuria ja hajotettiin Branson Digital Sonifier -sonikaattorilla (amplitudi 20 %, kesto 1 min, 1 s on / 1 s off). Suspensiota sentrifugoitiin 15 minuuttia Sorvall Instruments RC5C -sentrifuugilla GSA-roottorilla (15 000 g). Supernatantti suodatettiin Miracloth-suodatinkankaan (Calbiochem) läpi. Pelletti suspensoitiin 30 ml:aan PBS-puskuria ja pakastettiin. Supernatanttiin lisättiin 1,75 g NaCl:a niin, että lopulliseksi suolapitoisuudeksi tuli 1 M. Supernatantin pH säädettiin Radiometer Copenhagen PHM83 Autocal pH-mittarin ja 1 M NaOH:n avulla arvoon 11.

Proteiini eristettiin ja puhdistettiin 2-iminobiotin-Sepharose 4 FF -resiinillä (Affiland). 1 ml resiinisuspensiota kaadettiin pylvääseen ja pestiin 50 ml:lla NK1000-puskuria. Pesty resiini siirrettiin pylväästä supernatantin sekaan. Seosta inkuboitiin pyörivässä sekoittajassa  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa reilun tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen seosta sentrifugoitiin Heraeus Megafuge 1.0R -sentrifuugilla 5 minuuttia (500 g). Supernatantti dekantoiitiin varovasti pois resiinin päältä ja pakastettiin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :een.

Resiini pestiin 30 ml:lla NK1000-puskuria ja sentrifugoitiin uudestaan (5 minuuttia, 500 g). Supernatantti dekantoiitiin varovasti pois ja pesu toistettiin. Tämän jälkeen resiini siirrettiin pylvääseen NK1000-puskurin avulla, ja sitä pestiin yhteensä 20 ml:lla NK1000-puskuria. Resiiniin kiinnittynyt proteiini eluoitiin NA100-puskurilla 1 ml:n fraktioissa. Fraktioista mitattiin absorbanssit Pharmacia GeneQuant RNA/DNA Calculator -spektrometrillä aallonpituudella 280 nm. Tuloksista laskettiin fraktioiden proteiinipitoisuudet Lambert-Beerin lain avulla (viite 18 s. 884)

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (12-1)$$

jossa  $c$  on pitoisuus (mol/l),  $A$  on absorbanssi,  $\varepsilon$  on molaarinen absorptiokerroin ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) ja  $l$  on kyvetin valotien pituus (cm).

Puhdistuksen eri vaiheista otettiin näytteitä SDS-PAGE-analyysiä varten. Näytteet otettiin sonikoidusta seoksesta, sentrifugoinnin jälkeen supernatantista ja suspensoidusta pelletistä, sekä resiinin lisäyksen jälkeen sentrifugoidun näytteen supernatantista.

#### 12.4.2 Bakteerisoluisissa tuotettu BBP-A ja mutantit

BBP-A:n cDNA-sekvenssin sisältävä plasmidi tilattiin UK Chicken EST Consortiumista (ARK Genomics). Bakteerisolutuottoa varten proteiinin alkuperäinen signaalisekvenssi korvattiin *Bordetella avium* OmpA -signaalipeptidillä. Konstrukti subkloonattiin pGemTeasy-vektoriin (Promega). Ekspressiokonstrukti siirrettiin LR-kloonauksen avulla (Invitrogen) pBVboostFG-ekspressiovektoriin<sup>78</sup>, ja plasmidit tarkistettiin DNA-sekvensoinnilla. BBP-A tuotettiin *E. coli* BL-21(AI) soluissa (Invitrogen).<sup>67</sup>

BBP-A:n A74S- ja T118F-mutaatiot tehtiin QuikChange-menetelmällä (Stratagene, La Jolla, CA, USA) pGemTeasy-vektoriin kloonattuun *BBP-A*:han, ja ekspressiokonstruktit valmistettiin yllä olevan kuvauksen mukaan. BBP-A(A74S)- ja BBP-A(T118F)-mutantit tuotettiin *E. coli* soluissa samalla tavalla kuin BBP-A:n villityyppi.<sup>67</sup>

#### 12.4.3 SDS-PAGE

Polyakryyliamidigeelielektroforeesi (PAGE) erottelee proteiineja lähinnä koon mukaan (viite 71 s.134 ja viite 79 s. 26–28). Menetelmä perustuu sähköisesti varautuneen proteiinin ajautumiseen sähkökentässä. SDS eli natriumdodekyylisulfaatti on detergentti, joka sitoutuu proteiineihin noin 1,4 g SDS:a proteiinigrammaa kohti. SDS:n sitoutuminen antaa proteiineille lähes samanlaisen varaustiheyden, jolloin niiden liikkuminen geelissä riippuu lähinnä molekyylipainosta. Näytteen molekyylipaino voidaan määrittää käyttämällä kontrollinäytteenä tunnettujen proteiinien seosta.

Näytteiden analysointia varten valettiin 15 % SDS-PAGE-geelit. Alageelin reagenssit sekoitettiin keskenään, ja geeli valettiin kahden lasilevyn väliin. Kun alageeli oli jähmettynyt, valettiin sen päälle ylägeeli eli konsentroitigeeli, ja geeliin työnnettiin näytekampa. Kun ylägeeli oli jähmettynyt, näytekampa poistettiin ja geeli siirrettiin elektroforeesilaitteeseen (Mini Protean II, Bio-Rad). Ajokammio täytettiin EA-puskurilla.

Näytteisiin lisättiin näytetilavuuden verran SDS-PAGE-näytepuskuria, ja näytteitä kuumennettiin 10 minuuttia kiehuvaan vesihautteeseen tai 95 °C lämpöblokkissa. Näytteiden annettiin jäähtyä ja ne pipetoitiin geeliin näytekoloihin. Kontrollinäytteenä käytettiin LW-molekyylipainomarkkeria (Bio-Rad). Näytteet ajettiin 80 V:n jännitteellä, kunnes näytteet saavuttivat erottelugeelin yläreunan. Sen jälkeen jännite nostettiin 180 V:iin, kunnes näytepuskurin väriaine oli ajautunut erottelugeelin alareunaan.

SDS-PAGE:lla analysoidut proteiinit värjättiin Coomassie-värjäyksellä. Elektroforeesin jälkeen geelit siirrettiin keinuravistelijaan värjäysastiassa. Proteiinit kiinnitettiin geeliin inkuboimalla niitä muutaman minuutin ajan värinpoistoliuoksessa. Geelit huuhdeltiin vedellä ja inkuboitiin Bio-Safe Coomassie -väriliuoksessa (Bio-Rad) vähintään 1–2 tuntia huoneenlämmössä tai yön yli (4 °C). Ylimääräinen väri poistettiin inkuboimalla geelejä vedessä useita tunteja.

#### **12.4.4 Proteiinien siirto nitroselluloosakalvolle**

Proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvolle vasta-ainetunnistusta varten kahdella eri menetelmällä. Immunoblottauksessa (western-blottaus) SDS-PAGE:lla analysoidut näytteet siirrettiin elektroforeettisesti nitroselluloosakalvolle. Dot blot -menetelmässä proteiininäytteet pipetoitiin suoraan nitroselluloosakalvolle. Vertailunäytteenä käytettiin avidiinia (Belovo).

Bakteerituotettu BBP-A (0,2 mg/ml) ja avidiinin laimennussarja (0,002 mg/ml, 0,02 mg/ml ja 0,2 mg/ml) analysoitiin 15 % SDS-PAGE-geelin avulla. Kontrollinäytteenä käytettiin molekyylipainomarkkeria (Bio-Rad). Geeli siirrettiin Mini Trans-Blot -laitteen (Bio-Rad) blottauskasettiin. Blottauskasetti asetettiin jääkalikan ja magneettisekoittajan sauvan kanssa elektroforeesiastiaan. Astia täytettiin Kodak-

puskurilla ja nostettiin magneettisekoittajan päälle. Proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvolle (Protran, Schlecher&Schuell) 100 V:n jännitteellä, ajoaika oli 60 minuuttia. Elektroforeesin jälkeen kalvo värjättiin Ponceau-värjäysliuoksella, ja kalvolle merkittiin molekyylipainomarkkerien paikat. Väriliuos huuhdeltiin pois ionivaihdetulla vedellä, ja proteiinit värjättiin immunovärjäyksellä.

Dot blot -menetelmässä proteiininäytteet imettiin nitroselluloosakalvolle vakuumpumpun ja Bio-Radin Bio-Dot-laitteen avulla. Kalvolle pipetoitiin avidiinin laimennussarja 0,98 µg/ml–500 µg/ml, bakteerituotettua BBP-A:ta (0,2 mg/ml) ja hyönteissolutuotettua BBP-A:ta (0,2 mg/ml). Lisäksi yhteen kaivoon pipetoitiin BSA-liuosta (1 mg/ml) negatiiviseksi kontrolliksi. Proteiinit värjättiin immunovärjäyksellä.

#### **12.4.5 Immunovärjäys**

Nitroselluloosakalvolle kiinnitetyt proteiinit tunnistettiin vasta-aineiden avulla. Tunnistus tehtiin kahdella avidiinin polyklonaalisella vasta-aineella (Oulun yliopisto ja Tda VIII<sup>80</sup>) keinuravistelijassa huoneenlämmössä.

Ensin nitroselluloosakalvoa inkuboitiin blokkauksliuoksessa (5 % (w/v) rasvaton maitojauhe TBS-puskurissa) tunnin ajan. Blokkauksliuos kaadettiin pois ja kalvo pestiin TBS-Tween -puskurilla. Avidiinin polyklonaalista vasta-ainetta laimennettiin 1/5000 blokkauksliukseen, ja kalvoa inkuboitiin vasta-aineliuoksessa 30 minuuttia. Kalvo pestiin kolme kertaa TBS-Tween puskurilla. Sekundäärivasta-ainetta, vuohessa tuotettua anti-kani vasta-ainetta, jossa alkalinen fosfataasi (GAR-AP, Sigma), laimennettiin 1/2000 blokkauksliukseen. Kalvoa inkuboitiin sekundäärivasta-aineessa 30 minuuttia. Kalvo pestiin kolme kertaa TBS-Tween puskurilla ja kerran Apa-puskurilla. 15 ml:aan Apa-puskuria lisättiin 150 µl BCIP:tä (5-bromo-4-kloro-3-indolyylifosfaatti, 15 mg/ml) ja 150 µl NBT:tä (Nitro Blue Tetrazolium, 30 mg/ml), ja kalvoa inkuboitiin liuoksessa muutaman minuutin ajan, kunnes väri kehittyi. Reaktio pysäytettiin pesemällä kalvoa ionivaihdetulla vedellä, ja kalvo kuivattiin paperikäsipyyhkeellä.

#### 12.4.6 Deglykosylaatio

Endoglykosidaasi H<sub>f</sub>-entsyymi pilkkoo proteiinien N-linkattuja sokeriosia. Deglykosylaation avulla haluttiin tutkia, oliko hyönteissolutuotettu BBP-A glykosyloitu.

Entsyymikäsittely tehtiin hyönteissolutuotetulle BBP-A:lle ja kananmunasta eristetylle avidiinille (Belovo). 1,5 ml:n eppendorf-putkiin pipetoitiin 20 µl proteiiniliuosta (BBP-A 0,5 mg/ml ja avidiini 2 mg/ml) ja 2,5 µl 10 x denaturoivaa puskuria (New England Biolabs), ja putkia kuumennettiin lämpöblokkissa 95 °C:een lämpötilassa 10 minuuttia. Putkien annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi ja putkiin lisättiin 2,6 µl 10x G5-puskuria ja 1 µl Endo H<sub>f</sub>-entsyymiä (puskuri ja entsyymi New England Biolabs). Putket siirrettiin lämpökaappiin, jossa niitä inkuboitiin 37 °C:ssa yön yli.

Seuraavana päivänä näytteisiin lisättiin 14 µl SDS-PAGE-näytepuskuria. Vertailunäytteinä analysoitiin bakteerisoluisissa tuotettua avidiinia, kananmunasta eristettyä avidiinia, hyönteissolutuotettua BBP-A:ta ja bakteerisoluisissa tuotettua BBP-A:ta. Näytteitä keitettiin vesihauteessa 10 minuuttia, ja ne analysoitiin 15 % SDS-PAGE-geelin avulla. Geelit värjättiin Bio-Safe Coomassie -värillä.

#### 12.4.7 Massaspektrometria

Bakteerisoluisissa tuotettu BBP-A puhdistettiin dialysoimalla ja konsentroidiin lyofilisoimalla. 1 ml proteiiniliuosta (0,5 mg/ml) dialysoitiin dialyysiletkussa (Medicell International Ltd, 12000–14000 Da) ionivaihdettua vettä vasten yön yli kylmiössä. Dialysoitu näyte jäähdytettiin kahdessa erässä –70 °C:een pakastimessa ja lyofilisoitiin B. Braun Biotech International Christ Alpha 1-4 -lyofilisaattorissa 20 tuntia.

Lyofilisoituun näytteeseen lisättiin ionivaihdettua vettä, siten että proteiinikonsentraatio oli 9,8 µM (1,4 mg/ml). Mittausta varten liuosta laimennettiin veden, asetonitriilin ja muurahaihapon seokseen (50 % H<sub>2</sub>O : 50 % CH<sub>3</sub>CN : 0,2 % HCOOH) 0,20 µM (2,7 µg/ml) pitoisuuteen.

Mittaus tehtiin Micromass LCT sähkösumutusmassaspektrometrillä. Näytteen syöttönopeus oli 30 µl/min, ja spektrometrin jännitteet olivat: kapillaari 4100 V,



näytesuppilo 70 V ja RF-linssi 640 V. Mittausolosuhteissa proteiinilla oli positiivinen varaus, joten mittauksessa detektoitiin positiivisia ioneja. Spektristä laskettiin proteiinin monomeerin molekyylipaino MassLynx-ohjelman avulla.

#### **12.4.8 Geelisuodatus**

Geelisuodatuksessa näyte johdetaan molekyyliseulan täyttämään pylvääseen, jota pestään sopivalla puskurilla eli eluentilla (viite 79 s. 24–26). Ensimmäisenä pylväästä eluoituvat ne molekyylit, jotka ovat liian suuria mahtuakseen matriisin huokosiin. Loput molekyylit eluoituvat suuruusjärjestyksessä, pienimmät viimeisenä. Proteiinien koko eli molekyyliaino määritetään kalibroimalla pylväs tunnetuilla standardiproteiineilla. Geelisuodatuksessa proteiinin eluotumisnopeuteen vaikuttaa molekyylin keskimääräinen tilavuus liuoksessa eli Stokesin säde. Siksi standardiproteiineilla ja näytteillä tulisi olla mahdollisimman samanlainen muoto ja fysikaaliset ominaisuudet.

Geelisuodatus tehtiin Shimadzu HPLC -laitteella. Laitteistoon kuului LC-10AT VP Liquid Chromatograph, DGU-14A Degasser, SPD-M10A VP Diode Array Detector, SCL-10A System Controller, FCV-10AL VP ja RF-10AXL Fluorescence Detector. Laitteistoon oli liitetty Superdex HR 10/300 -pylväs (Amersham). Eluenttina käytettiin NA650-puskuria ja NK650-puskuria.

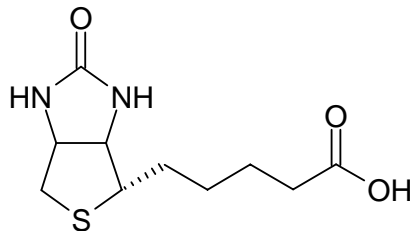
Fluoresenssidetektorin eksitaatioaallonpituus oli 280 nm ja emissioaallonpituus 350 nm, joilla havaittiin lähinnä tryptofaanin fluoresenssi. Virtausnopeus oli 0,5 ml/min ja paine 8–9 baaria. Standardiproteiineina käytettiin proteiiniseosta (Gel Filtration standard 151-1901, Bio-Rad), johon lisättiin 1 mg/ml BSA-liuosta. Lisäksi tehtiin erillinen analyysi avidiinille (Belovo). Bakteerituotettua BBP-A:ta analysoitiin 2 µg.

Pylvään läpi pumpattiin eluentia, kunnes paine asettui 8 baariin ja pylväs oli tasapainottunut. Fluoresenssi- ja DA-detektorin lamput kytkettiin päälle, ja fluoresenssidetektorin nollattiin. Mittaus käynnistettiin, ja 10 µl näytettä injektoidiin laitteeseen. Ajoaika näytteille oli 40–60 min.

### 12.4.9 Lämpöstabiilisuuskokeet

BBP-A:n villityypin ja mutatoitujen muotojen kvaternäärisen rakenteen lämpöstabiilisuutta tutkittiin SDS-PAGE:en perustuvan menetelmän avulla<sup>81</sup>. Näytteitä analysoitiin sekä biotiinin (kuva 53) läsnä ollessa että ilman, jotta saatiin tietoa biotiinin sitoutumisen vaikutusta proteiinin hajoamislämpötilaan.

Korkean pI:n omaavat proteiinit ovat positiivisesti varautuneita, joten ne muodostavat aggregaatteja anionisen detergentin, kuten SDS:n kanssa, jos proteiinia ei denaturoida. Kun proteiinin pI alennetaan asetyloimalla, proteiini ei saostu SDS:n kanssa ja pystyy tunkeutumaan SDS-PAGE-geeliin.<sup>81</sup>



Kuva 53. D-Biotiinin eli H-vitamiinin rakenne.

Koetta varten proteiininäytteet saturoitiin biotiinilla eppendorf-putkessa, yksi jokaista mittauslämpötilaa kohti. 5 µl:n proteiininäytteeseen lisättiin 5 µl 0,17 mg/ml biotiiniliuosta ja seosta inkuboitii 10 minuuttia huoneenlämpötilassa. Biotiinittomiiin näytteisiin lisättiin vastaavasti ionivaihdettua vettä.

Näytteet asetyloitiin NHS-etikkahappoesterillä. Näytteeseen lisättiin 1 µl 1 M NaHCO<sub>3</sub>-liuosta (pH 8,3) ja 3 µl NHS-etikkahappoesteriä, ja seosta inkuboitii 10 minuuttia huoneenlämmössä.

Näytteet jaettiin eriin ja niihin lisättiin vastaava tilavuus SDS-PAGE-näytepuskuria. Näytteitä lämmitettiin 20 minuuttia Biometran T3 Thermocycler PCR-laitteessa valitussa lämpötilassa. Näytteiden käsittelylämpötilat on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Käsittelylämpötilat termostabiilisuuskokeen proteiininäytteille (°C)

BBP-A		BBP-A(A74S) ja BBP-A(T118F)	
+ Biotiini	- Biotiini	+ Biotiini	- Biotiini
50	25	60	25
60	37	65	30
70	45	70	40
75	50	75	50
80	55	80	
85	60		
90	65		
95	70		
99,5	80		

Näytteet analysoitiin 15 % SDS-PAGE-geelien avulla ja värjättiin Bio-Safe Coomassie -värillä. Proteiinin tetrameerinen muoto näkyi geeleissä n. 45 kDa:n kohdalla ja monomeerinen muoto n. 14 kDa:n kohdalla. Hajoamislämpötilaksi määritettiin silmämääräisesti se lämpötila, jossa proteiinia oli yhtä paljon monomeeri- ja tetrameerimuodossa.

#### 12.4.10 Dissosiaationopeusvakioiden määrittäminen

Bakteerituotetun BBP-A:n ja mutanttien biotiininsitomiskykyä tutkittiin määrittämällä proteiini-biotiini-kompleksin dissosiaationopeusvakio ( $k_{\text{diss}}$ ). Mittaukset tehtiin kahdella eri menetelmällä: fluoresenssispektrofotometrisesti käyttäen leimattua BF560-biotiinia<sup>76</sup>, sekä radioaktiivisen biotiinin syrjäyttämisen avulla<sup>82</sup>. Mittaustuloksista laskettiin proteiini-biotiini-kompleksin pitoisuus ajan funktiona. Tuloksista määritettiin nopeusvakio ensimmäisen kertaluvun reaktion reaktionopeuslain mukaan (viite 69 s. 871)

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -kt \quad (12-2)$$

jossa  $A_0$  on kompleksin pitoisuus alkuhetkellä  $t = 0$ ,  $A$  on kompleksin pitoisuus ajanhetkellä  $t$  ja  $k$  on reaktionopeusvakio.

#### 12.4.10.1 Fluoresenssispektrofotometrinen määrittäminen

Mittauksessa käytettiin biotiinia, johon oli kiinnitetty fluoresoiva leima (ArcDia™ BF560-biotiini). Kun proteiini sitoutui leimattuun biotiiniin, leiman fluoresenssi vaimeni. Lisäämällä syntyneen kompleksin joukkoon vapaata biotiinia havaittiin kompleksien dissosioituminen fluoresenssin palautumisena. Mittauksen perusteella määritettiin proteiini-biotiini-kompleksin pitoisuus ajan funktiona.

Mittaukset tehtiin kvartsi kyvetissä Perkin Elmer LS 55 Luminescence -spektrometrillä. Näytteiden termostointiin käytettiin Haake K10 ja Haake DC10 Thermo vesihaudetta ja termostaattia, jotka oli liitetty kyvettelineeseen. Mittaukset tehtiin joko 25 tai 50 °C lämpötilassa. Eksitaatioon käytettiin 560 nm aallonpituutta, raonleveys oli 2,5 nm. Emissiota kerättiin 0,2 sekunnin välein 576 nm aallonpituudella, raonleveys oli 5 nm. Detektorijännite oli 825 U ja kyvetin magneettisekoitus suurella voimakkuudella (high).

Ensin mitattiin fluoresoivan biotiinin emissiointensiteettiä 100 sekunnin ajan NF650-puskurissa. Mittausliuoksen tilavuus oli 3 ml, ja leiman pitoisuus 50 nM. Seuraavaksi leiman sekaan pipetoitiin 5–20 µl proteiiniliuosta, siten että proteiinin pitoisuus oli 50 nM. Fluoresenssia mitattiin 300 sekunnin ajan. Tänä aikana havaittiin proteiinin sitoutuminen biotiiniin ja samanaikainen fluoresenssin vaimeneminen. Mittauksen jälkeen kyvetiin lisättiin 100-kertainen ylimäärä *d*-biotiniä eli 22,5 µl 0,17 mg/ml biotiiniliuosta. Fluoresenssimittaus käynnistettiin mahdollisimman nopeasti lisäyksen jälkeen, ja mittauksia jatkettiin 3600 s. Mittauksen aikana havaittiin fluoresenssin kasvu proteiini-leima-kompleksien hajotessa. Mittaustulokset analysoitiin MS Excel-ohjelman avulla.

#### 12.4.10.2 Radiobiotiinin määrittäminen

Mittauksissa käytettiin radioaktiivista [<sup>3</sup>H]biotiniä (Amersham). Menetelmä perustuu mittausliuoksessa vapaana olevan radiobiotiinin pitoisuuden määrittämiseen radioaktiivisuuden avulla.<sup>82</sup> Proteiini-biotiini-kompleksit poistettiin näytteestä suodattamalla.

Mittaukset tehtiin 30, 40 tai 50 °C lämpötilassa. Mittauksissa käytettiin NF100-puskuria. Näytteeseen pipetoitiin 4 ml puskuriliuosta, 4 µl BSA-liuosta (10 mg/ml) ja 2,2 µl [<sup>3</sup>H]biotiinia. BSA-liuoksen tehtävä oli estää epäspesifistä sitoutumista. Seosta inkuboitiin lämpöblokkissa mittauslämpötilassa. Liuoksesta otettiin näyte A pipetoimalla 300 µl filterilliseen mikrosentrifuugiputkeen (Microcon YM-30, Millipore) ja sentrifugoimalla 3 minuuttia 13 000 rpm. Suodoksesta pipetoitiin kolme 30 µl rinnakkaista näytettä mittausputkiin, joissa oli 4 ml Opti-Phase tuikenestettä (PerkinElmer). Rinnakkaisnäytteistä mitattiin radioaktiivisuus LKB Wallac 1217 Rackbeta liquid scintillation counter -tuikelaskijalla.

Koeputkeen [<sup>3</sup>H]biotiinin sekaan lisättiin 5–20 µl proteiiniliuosta, siten että proteiinin pitoisuudeksi tuli 50 nM. Putkea inkuboitiin mittauslämpötilassa 10 minuuttia, jonka aikana [<sup>3</sup>H]biotiini sitoutui proteiiniin. Liuoksesta otettiin näyte B samalla tavalla kuin näyte A. Suodattimelle jäi proteiiniin sitoutunut [<sup>3</sup>H]biotiini, ja suodoksesta mitattiin vapaan [<sup>3</sup>H]biotiinin radioaktiivisuus.

Koeputkeen lisättiin 11,5 µl biotiinia (15 mM) konsentraatioon 43 µM, ja käynnistettiin sekuntikello. Valittuina ajan hetkinä liuoksesta otettiin näytteet C–I samalla tavalla kuin näytteet A ja B. Suodoksen radioaktiivisuutta seurattiin mittauslämpötilasta riippuen 2–28 tuntia. Radioaktiivisuus kasvoi, kun proteiini-biotiini kompleksit hajosivat. Tulokset analysoitiin MS Excel-ohjelmalla.

## 13 TULOKSET

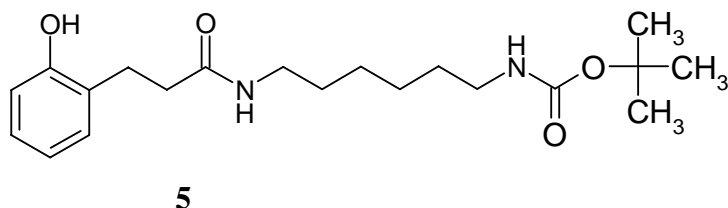
### 13.1 Käsivarrellisen HABA:n synteesi

Syntetisoidut tuotteet on esitelty alla. Tuote **8** puhdistettiin pylväskromatografisesti silikageelillä, ja mitattujen NMR- ja massaspektrien perusteella voitiin havaita puhdistuksen onnistuneen. Ennen puhdistusta mitatusta  $^{13}\text{C}$ -spektristä voitiin päätellä synteesituotteen joukossa olevan runsaasti epäpuhtauksia, mahdollisesti jopa tuotteen **8** rakennetta muistuttava sivutuote. Puhdistuksen jälkeen tuotteen **8**  $^1\text{H}$ -spektrissä näkyy lähinnä liuotinjäämistä, kuten dietyylieetteristä, ja muista epäpuhtauksista aiheutuvia ylimääräisiä signaaleja erityisesti alifaattisella alueella.

Tuotteen **9** massaspekttrissä näkyi molekyylin voimakas pilkkoutuminen. Osa havaituista piikeistä johtui varmasti myös tuotteen joukossa olleista epäpuhtauksista. Työn tarkoituksena oli saada aikaan aktivoitua HABA:a, joka myöhemmin voitaisiin puhdistaa esimerkiksi affiniteettikromatografialla, ja siksi lopputuotteen puhtaudella ei arveltu olevan suurta merkitystä sen hyödynnettävyyden kannalta.

#### 13.1.1 Tuote 5

Tuotteen **5** rakenne on esitetty kuvassa 54 ja analyysitulokset taulukossa 3.



Kuva 54. [6-(3-(2-Hydroksifenyyli)propionyyliamino)heksyyli]kارباميinihapon *tert*-butyyliesteri.

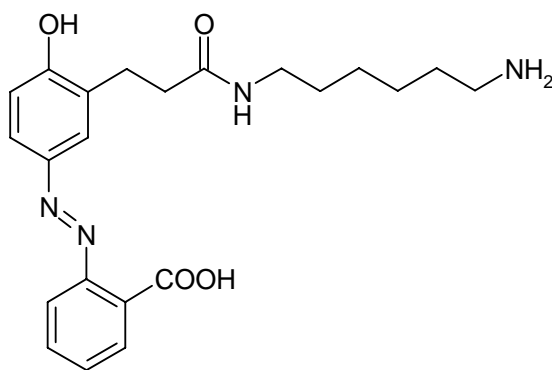
Taulukko 3. Tuotteen **5** analyysitulokset

Synteesikoodi	Saanto (g)	Saanto (%)	M (g/mol)	Kaava	MS-spektri [M] <sup>+</sup>
TBC-003	0,85	39	364,48	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	364

<sup>1</sup>H- ja <sup>13</sup>C-NMR spektrit mitattu.

### 13.1.2 Tuote **8**

Tuotteen **8** rakenne on esitetty kuvassa 55 ja analyysitulokset taulukossa 4.

**8**

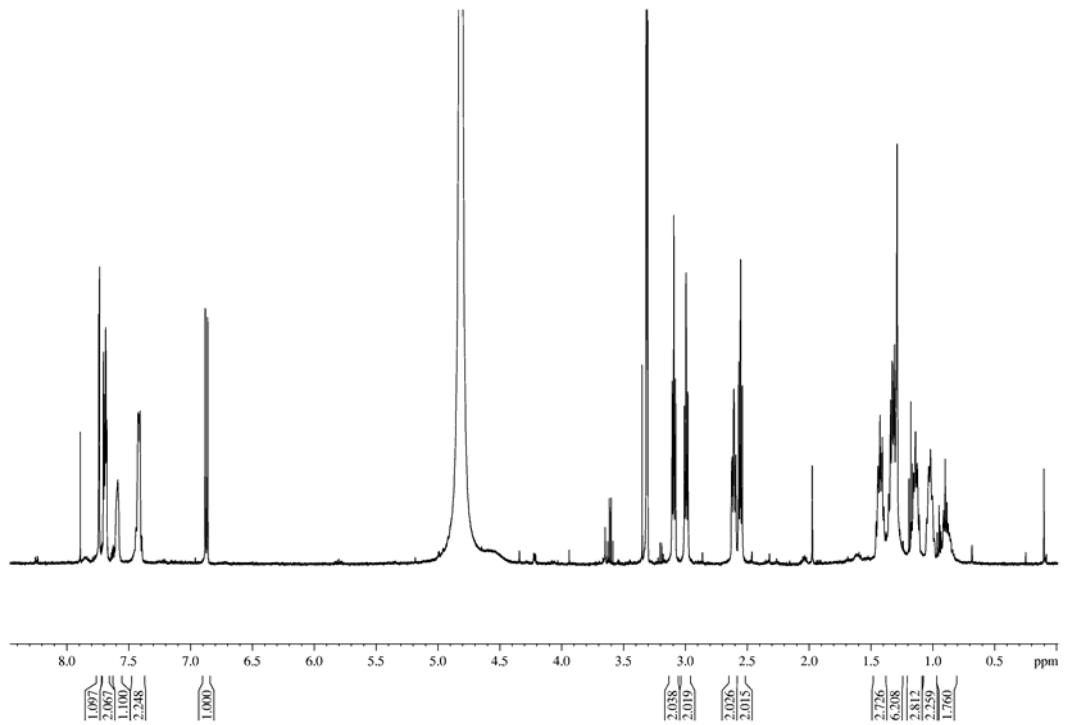
Kuva 55. 2-[3-(2-(6-Aminoheksyylikarbamoyyli)etyyli)-4-hydroksifenyyliatso]bentsoehappo.

Taulukko 4. Tuotteen **8** analyysitulokset

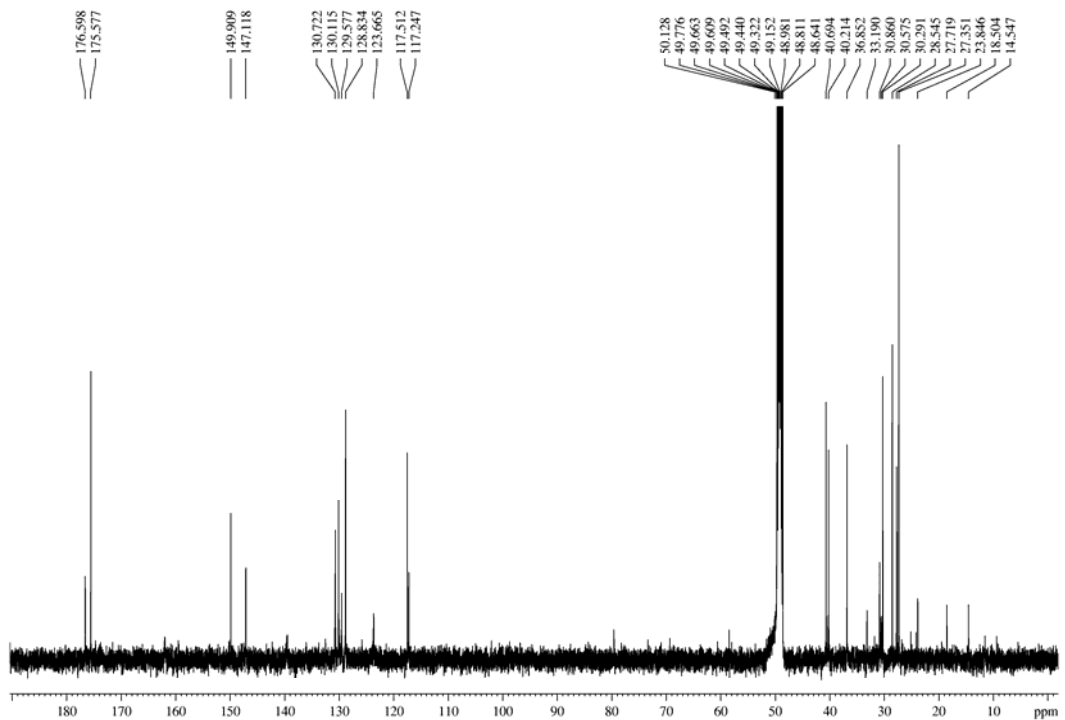
Synteesikoodi	Saanto (g)	Saanto (%)	M (g/mol)	Kaava	ESI-MS [M+H] <sup>+</sup>	sp (°C)
TBC-003	0,28 <sup>a</sup>	59 <sup>a</sup>	418,48	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	413,1 <sup>b</sup>	80 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> ennen puhdistusta pylväskromatografialla, <sup>b</sup> metanolissa

<sup>1</sup>H-NMR (kuva 56), <sup>13</sup>C-NMR (kuva 57) ja 2D-spektrit mitattu.



Kuva 56. Puhdistetun tuotteen **8**  $^1\text{H-NMR}$ -spektri (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ).  $\delta$  1,0–1,1 (m);  $\delta$  1,1–1,2 (m);  $\delta$  1,2–1,4 (m);  $\delta$  1,4–1,5 (m);  $\delta$  2,55 (t);  $\delta$  2,6 (t);  $\delta$  3,0 (t);  $\delta$  3,1 (t);  $\delta$  6,9 (d);  $\delta$  7,4–7,5 (m);  $\delta$  7,6 (m);  $\delta$  7,65–7,7 (m);  $\delta$  7,7 (d); metanoli  $\delta$  3,31

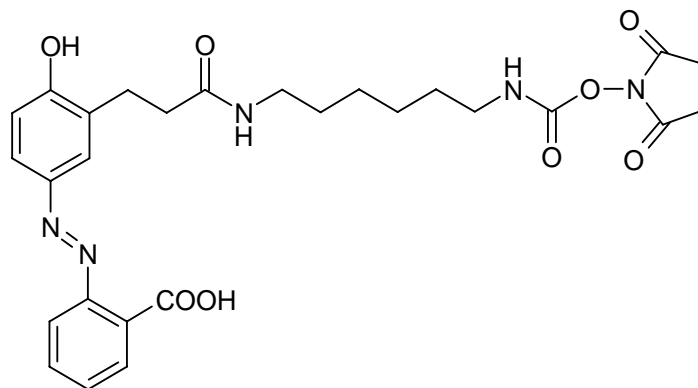


Kuva 57. Puhdistetun tuotteen **8**  $^{13}\text{C-NMR}$ -spektri (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ), metanoli  $\delta$  49.



### 13.1.3 Tuote 9

Tuotteen **9** rakenne on esitetty kuvassa 58 ja analyysitulokset taulukossa 5.



**9**

Kuva 58. 2-[3-(2-(6-(2,5-Dioksopyrrolidin-1-yl)oksykarbonyyliamino)-heksyylikarbamoyyli)etyyli-4-hydroksifenyliatso)bentsoehappo.

Taulukko 5. Tuotteen **9** analyysitulokset

Synteesikoodi	M (g/mol)	Kaava	ESI-MS [M+H] <sup>+</sup>	sp (°C)
TBC-002	553,56	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	554 <sup>b</sup>	122,7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> kirjallisuusarvo<sup>68</sup> 143–145 °C, <sup>b</sup> asetonitrilissä

## 13.2 ELISA

Proteiiniin kiinnitetty aktivoitu HABA ei irronnut dialyysissä, joten sen voidaan olettaa kiinnittyneen BSA:han muodostaen HABA-BSA-konjugaatteja. ELISA-kokeessa tunnin reaktioajan jälkeen mitatut absorbanssit on esitetty taulukossa 6. Kokeessa havaittiin selvä ero biotiinittomien ja biotiinia sisältävien kuoppien välillä, niin että biotiinittomat kuopat antoivat suuremman signaalin. Tämän perusteella voidaan päätellä, että BSA-HABA kiinnittyi spesifisesti avidiiniin ja avidiinin N118M-mutanttiin. Kuitenkin myös biotiinia sisältävien näytteiden signaali kasvoi avidiinin pitoisuuden funktiona, mutta vähemmän kuin biotiinittomissa kuopissa.

Taulukko 6. Mitatut absorbanssit 60 minuutin reaktioajan jälkeen. Vasemmassa sarakkeessa vaakarivin kuoppiin pipetoitu proteiini.

Proteiini	$\mu\text{g}$	$A_{405}$ (-Biot)		$A_{405}$ (+Biot)	
-	0	0,101	0,108	0,112	0,109
Avidiini	0,05	0,168	0,125	0,110	0,109
Avidiini	0,5	0,711	0,543	0,190	0,205
Avidiini	5	2,061	1,913	0,901	0,938
Avd-N118M	0,05	0,246	0,214	0,112	0,110
Avd-N118M	0,5	0,615	0,602	0,189	0,218

### 13.3 BBP-A

Protparam-ohjelmalla lasketut molekyylipainot on esitetty taulukossa 7. Molekyylipainot laskettiin proteiineille, joiden sekvensseistä oli vähennetty signaalipeptidit SignalP 3.0 -ohjelman ennustaman katkaisukohtaan mukaan. BBP-A:n monomeerin molekyylipainoksi saatiin 14 003,9 Da, josta tetrameerin painoksi tulee 56,0 kDa. BBP-A(A74S):n tetrameerin molekyylipainoksi saatiin 56,1 kDa ja BBP-A(T118F):n molekyylipainoksi 56,2 kDa. BBP-A:n teoreettinen pI oli 9,75 ja molaarinen absorptiokerroin  $\epsilon_{280} = 24\,160\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

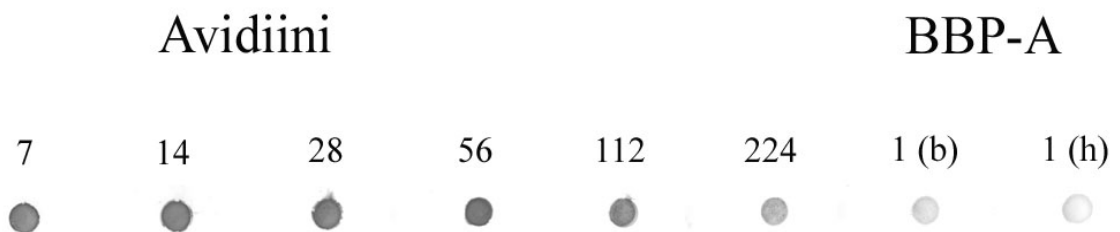
Taulukko 7. Protparam-ohjelmalla lasketut molekyylipainot

Proteiini	BBP-A	BBP-A(A74S)	BBP-A(T118F)
$M_{\text{monomeeri}}$ (Da)	14 003,9	14 019,9	14 050,0
$M_{\text{tetrameeri}}$ (Da)	56 015,6	56 079,9	56 200,0
M (kDa)	56,0	56,1	56,2

BBP-A:n tuottaminen onnistui bakulovirusekspressiosysteemillä *Spodoptera frugiperda* -hyönteissoluissa. 100 ml:n kasvatuksesta saatiin eristettyä 0,6 mg proteiinia. SDS-PAGE -analyysin mukaan BBP-A oli puhdasta ja homogeenistä, sillä geelissä näkyi ainoastaan yksi vyöhyke noin 15 kDa:n kohdalla.

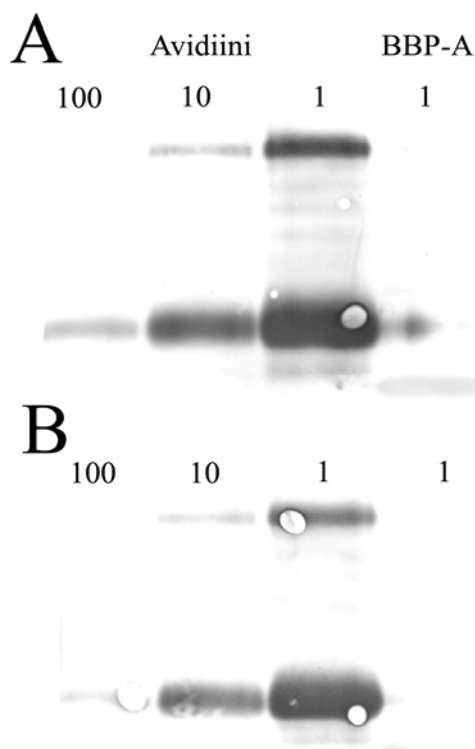
### 13.3.1 Immunovärjäys

Bakteerituotettu BBP-A ja hyönteissolutuotettu BBP-A tunnistuivat heikosti avidiinin polyklonaalisella vasta-aineella. Kokeet tehtiin kahdella avidiinin polyklonaalisella vasta-aineella, joista TdaVIII antoi heikosti positiivisen tuloksen. Dot blot -kokeen toisessa kalvossa oli niin paljon taustaa, ettei sen perusteella pysty sanomaan tunnistuiko BBP-A toisella vasta-aineella (Oulun yliopisto). Kuvassa 59 näkyy osa dotblotatusta nitroselluloosakalvosta, jossa BBP-A erottuu kahtena haaleana täplänä. Laimeimman avidiininäytteen laimennuskerroin oli 224 verrattuna BBP-A:n pitoisuuteen, mutta värireaktio on voimakkaampi kuin BBP-A-näytteissä.



Kuva 59. Nitroselluloosakalvo dotblotauksesta. Proteiinien tunnistuksessa käytettiin TdaVIII vasta-ainetta. Kuvaan on merkitty avidiinin laimennuskertoimet verrattuna bakteerituotettuun (b) ja hyönteissolutuotettuun (h) BBP-A:han.

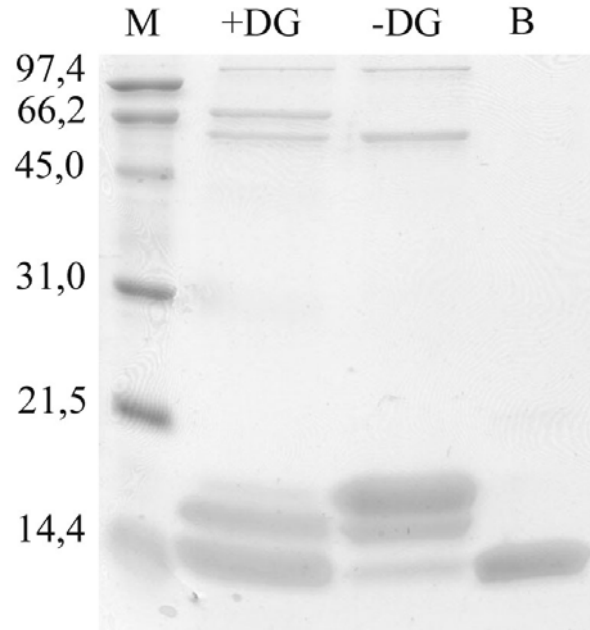
Kuvassa 60 on kuva immunoblotatuista nitroselluloosakalvoista, joissa avidiininäytteet ovat vasemmalla ja bakteerituotettu BBP-A oikealla. TdaVIII vasta-aineella BBP-A erottuu hyvin haaleana vyöhykkeenä (60 A), ja Oulun yliopiston vasta-aineella BBP-A ei erotu lainkaan (60 B). Laimein avidiininäyte oli satakertaisesti laimennettu verrattuna BBP-A:han.



Kuva 60. Immunoblottauksen nitroselluloosakalvot, joissa avidiininäytteet ovat vasemmalla ja bakteerituotettu BBP-A oikealla (laimennuskertoimet kuvassa). A-kohdassa on käytetty TdaVIII avidiinin polyklonaalista vasta-ainetta, jolla BBP-A erottuu haaleana vyöhykkeenä, ja B-kohdassa Oulun yliopiston avidiinin polyklonaalista vasta-ainetta, jolla avidiinin laimein näyte erottuu huomommin kuin A-kohdassa ja BBP-A eri erotu lainkaan.

### 13.3.2 Deglykosylaatio

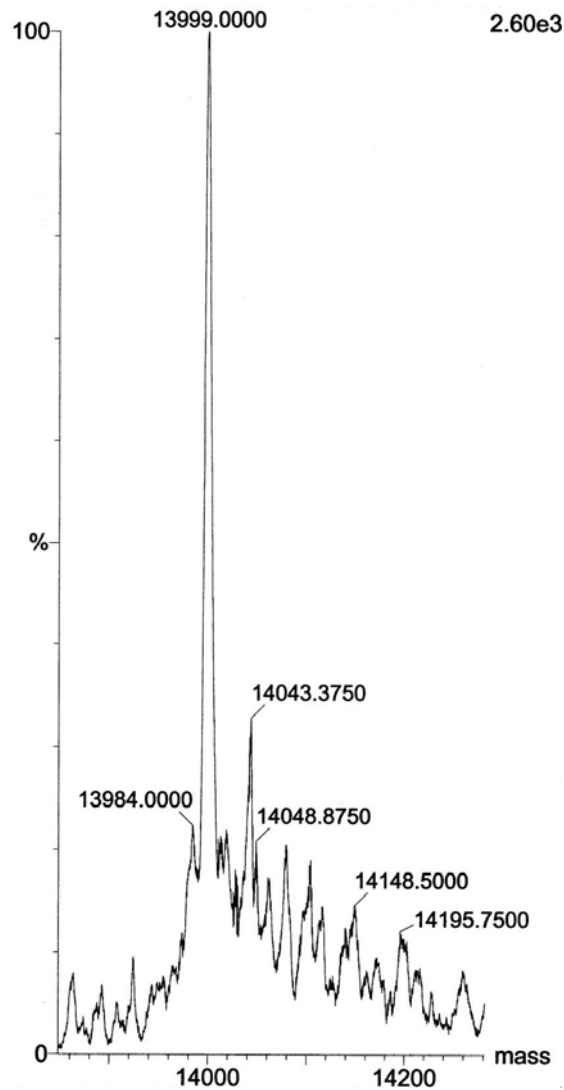
Coomassie-värijäytystä SDS-PAGE-geelistä havaittiin, että hyönteissolussa tuotettu BBP-A jakautui kolmeen vyöhykkeeseen noin 14–16 kDa:n kohdalla (kuva 61). Entsyymikäsitellyllä näytteellä suurin osa proteiinista oli alimmassa vyöhykkeessä, samassa kohdassa kuin bakteerituotetun BBP-A:n vyöhyke. Käsittelemättömällä vertailunäytteellä suurin osa proteiinista oli ylimmässä vyöhykkeessä. Voidaan siis päätellä, että hyönteissolutuotettu BBP-A oli glykosyloitu, ja endoglykosidaasikäsitteily pilkkoi proteiinista sokeriosia pois siten, että lopputuote muistuttaa bakteerisolussa tuotettua BBP-A-proteiinia, joka ei sisällä sokeriosia. Myös vertailunäytteenä käytetyllä avidiinilla havaittiin sokeriosien pilkkoutuminen, niin että entsyymikäsitellyllä näytteellä molekyylipaino oli pienempi kuin käsittelemättömällä näytteellä.



Kuva 61. Deglykosyloitujen proteiininäytteiden SDS-PAGE-geeli. M = markkeri (kDa), +DG = entsyymikäsitelty BBP-A, -DG = käsittelemätön BBP-A ja B = bakteerisolussa tuotettu, käsittelemätön BBP-A.

### 13.3.3 Massaspektrometria

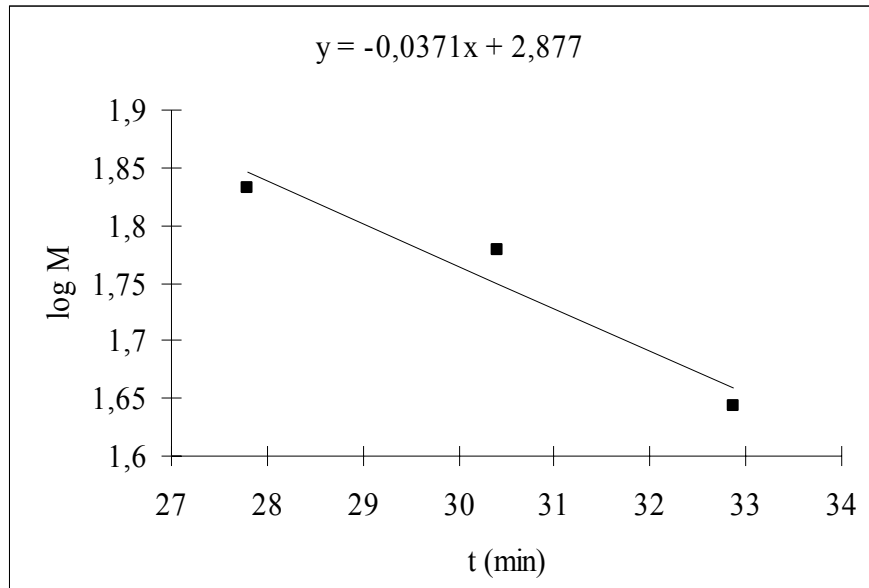
Massaspektrometrilla määritetty bakteerituotetun BBP-A:n monomeerin molekyylipaino oli 13 999 Da (kuva 62). Tetrameerin molekyylipainoksi saadaan tällöin 55 996 Da eli noin 56,0 kDa. Massaspektrometrillä mitattu molekyylipaino vastaa hyvin proteiinin sekvenssin perusteella laskettua teoreettista massaa.



Kuva 62. Kuva MassLynx-ohjelmalla käsitellystä BBP-A:n ESI-MS-spektristä.

#### 13.3.4 Geelisuodatus

Eluutioaikojen perusteella määritettiin graafisesti bakteerituotetun BBP-A:n molekyylipaino. MS Excel -ohjelmalla piirrettiin kuvaaja standardiproteiineille log M eluutioajan funktiona (kuva 63). Näytteen molekyylipaino määritettiin suoran yhtälön avulla. BBP-A:n molekyylipainoksi saatiin 44 kDa pH:ssa 4 ja 52 kDa pH:ssa 11. Taulukossa 8 on esitetty proteiinien molekyylipainot ja eluutioajat pH:ssa 4, ja taulukossa 9 vastaavat arvot pH:ssa 11.



Kuva 63. Geelisuodatuksen standardisuora pH:ssa 4 ( $R^2 = 0,93$ ).

Taulukko 8. Proteiinien molekyylipainot ja eluutioajat pH:ssa 4

Proteiini	Eluutioaika (min)	M (kDa)
BSA	27,8	68
Avidiini	30,4	60
Ovalbumiini	32,9	44
BBP-A	33,4	44

Taulukko 9. Proteiinien molekyylipainot ja eluutioajat pH:ssa 11

Proteiini	Eluutioaika (min)	M (kDa)
BSA	26,3	68
Avidiini	30,4	60
Ovalbumiini	31,6	44
BBP-A	30,6	52

Geelisuodatuksella saadut molekyylipainot ovat jonkun verran pienempiä kuin teoreettinen massa. Mittaustulosten perusteella voidaan päätellä, että BBP-A on tetrameeri. pH:ssa 4 eluutiogrammissa erottui myös monomeerin piikki. Tämän perusteella voidaan arvella että proteiini ei ole stabiili näin happamissa olosuhteissa toisin kuin avidiini. BBP-A:n eluutiogrammit ovat selostuksen liitteenä (liitteet 4–5).

### 13.3.5 Lämpöstabiilisuus

BBP-A:n lämpöstabiilisuuskokeen tulokset on esitetty taulukossa 10. Bakterituotetun BBP-A:n villityyppi ja mutatoitunut muodot hajosivat monomeereiksi jo huoneenlämpötilassa (25 °C) ilman biotiinia. Biotiinin läsnäollessa BBP-A:n villityyppi ja mutatoitunut muodot hajosivat vasta 70–75 °C:een lämpötilassa. BBP-A:n hajoamislämpötila on selvästi alhaisempi kuin avidiinin hajoamislämpötila (60 °C ilman biotiinia ja 90 °C biotiinin kanssa).

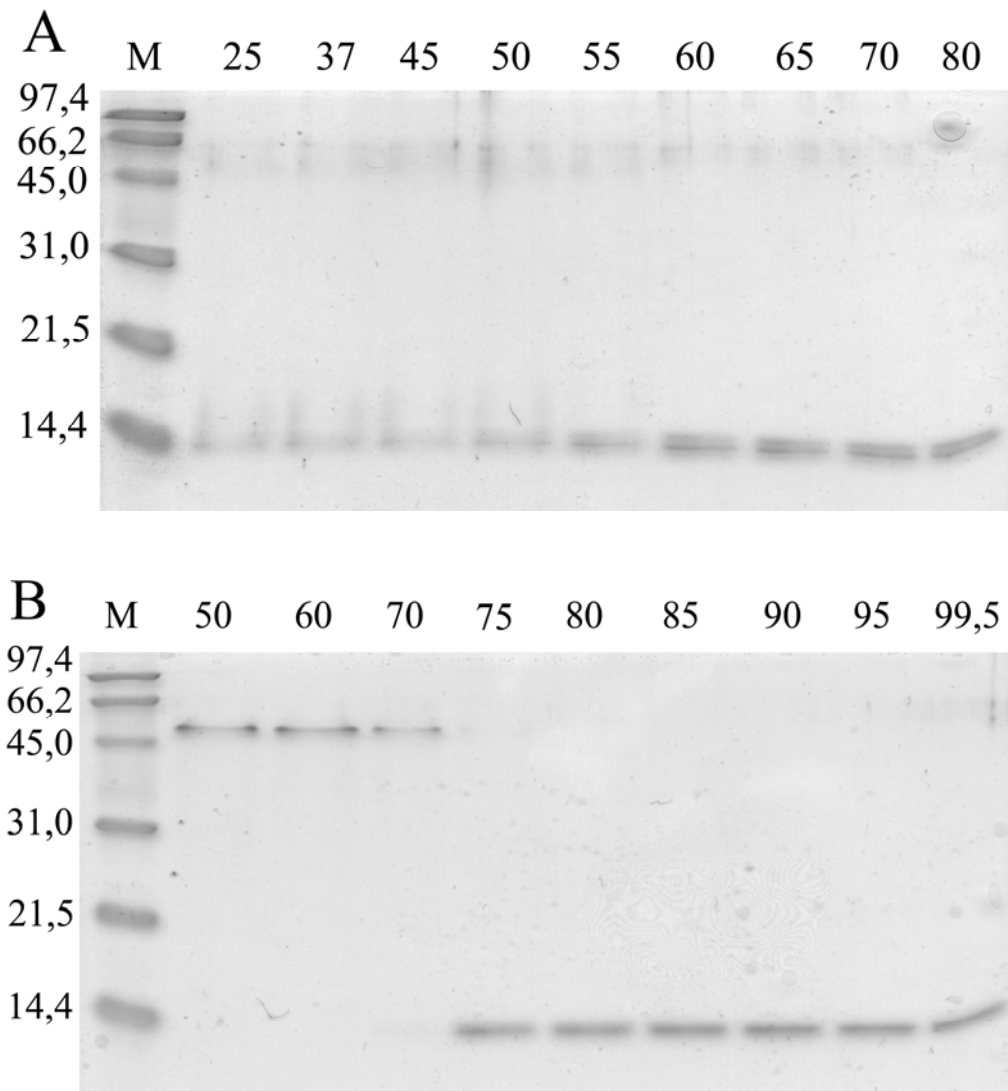
Taulukko 10. Lämpöstabiilisuuskokeen tulokset. Tetrameerin hajoamislämpötilat ilman biotiinia ja biotiinin kanssa.

Proteiini	Hajoamislämpötila T (°C)	
	- Biotiini	+ Biotiini
BBP-A	25	70,0 ± 2,5
BBP-A(A74S)	25	75,0 ± 2,5
BBP-A(T118F)	25	70,0 ± 2,5
Avidiini <sup>a</sup>	60	90

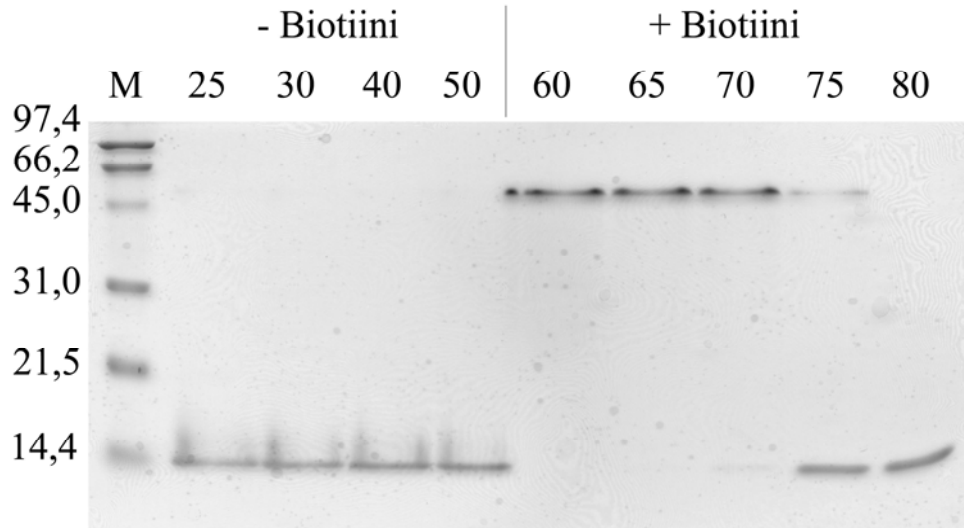
<sup>a</sup> 76

Kuvissa 64–66 on esitetty lämpöstabiilisuuskokeiden SDS-PAGE-geelit. Proteiinin tetrameerinen muoto näkyy geeleissä noin 45 kDa:n markkerin kohdalla, ja monomeerinen muoto noin 14,4 kDa:n markkerin kohdalla.

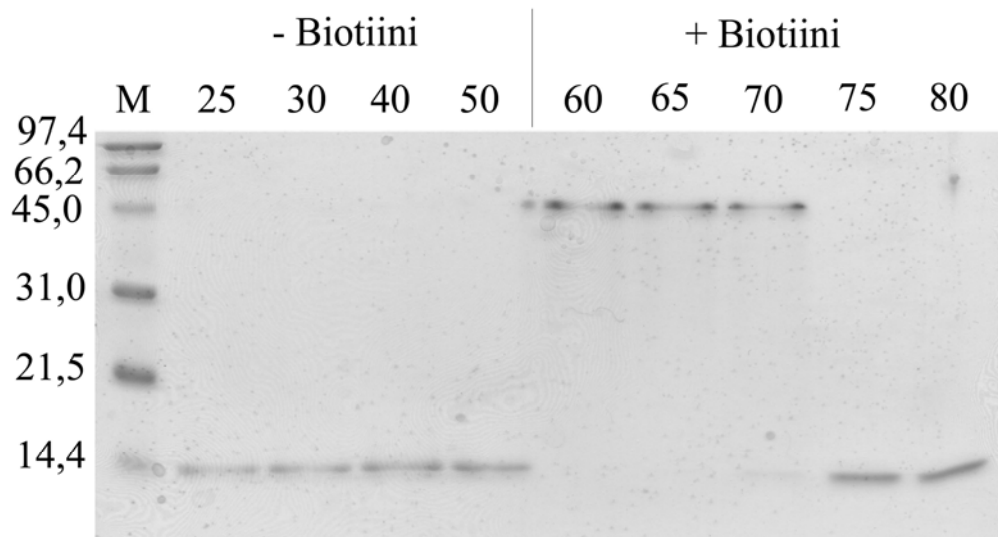




Kuva 64. Lämpöstabiilisuuskokeen SDS-PAGE-geeli A: BBP-A ilman biotiinia, B: BBP-A biotiinin kanssa. Näytteiden käsittelylämpötilat (°C) on merkitty kuvan yläpuolelle ja molekyylipainomarkkerit (kDa) vasemmalle.



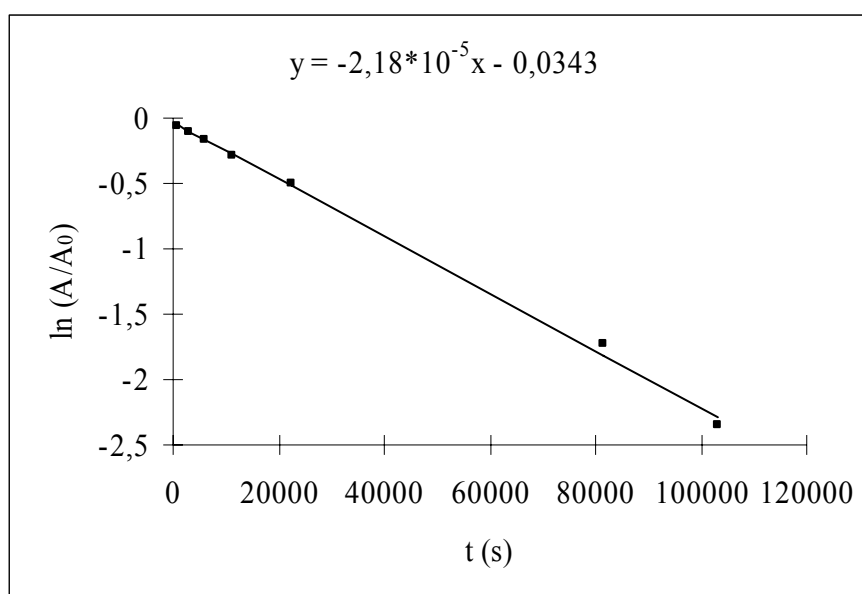
Kuva 65. Lämpöstabiilisuuskokeen SDS-PAGE-geeli BBP-A(A74S):lle. Vasemmalla ovat ilman biotiinia käsitellyt näytteet ja oikealla biotiinilla kyllästetyt näytteet. Näytteiden käsittelylämpötilat (°C) on merkitty kuvan yläpuolelle ja molekyylipainomarkkerit (kDa) vasemmalle.



Kuva 66. Lämpöstabiilisuuskokeen SDS-PAGE-geeli BBP-A(T118F):lle. Vasemmalla ovat ilman biotiinia käsitellyt näytteet ja oikealla biotiinilla kyllästetyt näytteet. Näytteiden käsittelylämpötilat (°C) on merkitty kuvan yläpuolelle ja molekyylipainomarkkerit (kDa) vasemmalle.

### 13.3.6 Dissosiaationopeusvakiot

Dissosiaationopeusvakiot laskettiin ensimmäisen kertaluvun nopeuslain avulla (kaava 12-2). Mittauksissa määritettiin liuoksessa olevan ligandin pitoisuus ( $B_0$ ) ja vapautuneen ligandin pitoisuus,  $B(t)$ . Kompleksin pitoisuus alkuhetkellä ( $A_0$ ) on yhtä suuri kuin  $B_0$ , koska kaikki ligandit ovat sitoutuneita, ja kompleksin pitoisuus ajanhetkellä  $t$  on  $A(t) = B_0 - B(t)$ . Dissosiaationopeusvakio  $k_{\text{diss}}$  saatiin MS Excel -ohjelmalla suoran kulmakertoimesta piirtämällä kuvaaja  $\ln(A/A_0)$  ajan ( $t$ ) funktiona (kuva 67). Virhearviot laskettiin kulmakertoimen keskihajonnasta.



Kuva 67. Biotiinin dissosiaationopeusvakion määrittäminen  $[^3\text{H}]$ biotiniin avulla BBP-A:lle ( $T = 30\text{ °C}$ ). Dissosiaationopeusvakio  $k_{\text{diss}}$  on suoran kulmakertoimen vastaluku. Samaa menetelmää käytettiin myös fluoresenssispektrofotometrillä mitatuille dissosiaationopeusvakioille.

Taulukossa 11 on esitetty fluoresenssispektrofotometrillä mitatut  $k_{\text{diss}}$ -arvot ja mittauksen aikana vapautuneen leimatun biotiinin osuus.  $25\text{ °C}$ :een lämpötilassa BBP-A:n dissosiaationopeusvakio oli  $(61,53 \pm 0,01) \cdot 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ , kun taas BBP-A(A74S):lla nopeusvakio oli hieman pienempi,  $(47,378 \pm 0,008) \cdot 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ , ja BBP-A(T118F):lla hieman suurempi,  $(70,60 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ . Yhden tunnin mittauksen aikana leimatusta biotiinista vapautui noin 80–90 % kaikilla proteiineilla. Vastaava dissosiaationopeusvakio avidiinille on vain  $2,04 \cdot 10^{-5}\text{ s}^{-1}$  ja vapautumisprosentti 10,7 %<sup>83</sup>, eli biotiinin dissosiaatio BBP-A:sta on noin 30 kertaa nopeampaa kuin avidiinista. Lisäksi BBP-A:n  $k_{\text{diss}}$   $50\text{ °C}$ :een lämpötilassa on  $(1940 \pm 9) \cdot 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ , kun

vastaava arvo avidiinille on  $27,4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , jolloin BBP-A:n dissosiaatio on jo 70 kertaa nopeampaa.

Taulukko 11. Dissosiaationopeusvakiot fluoresenssispektrofotometrillä. Vapautumisprosentti tarkoittaa vapautuneen leimatun biotiinin osuutta tunnin mittauksen jälkeen.

Proteiini	25 °C		50 °C
	$k_{\text{diss}} (\cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1})$	Vapautumis-% (1 h)	$k_{\text{diss}} (\cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1})$
BBP-A	$61,53 \pm 0,01$	89,1	$1940 \pm 9^{\text{b}}$
BBP-A(A74S)	$47,378 \pm 0,008$	82,1	
BBP-A(T118F)	$70,60 \pm 0,03$	93,7	
Avidiini <sup>a</sup>	2,04	10,7	27,4

<sup>a</sup> 83, <sup>b</sup> 100 sekuntia datan alusta

Taulukossa 12 on esitetty [<sup>3</sup>H]biotiinin avulla mitatut  $k_{\text{diss}}$ -arvot virhearvioineen. 40 °C:een lämpötilassa BBP-A:n dissosiaationopeusvakio oli  $(0,89 \pm 0,02) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , kun taas BBP-A(A74S):lla nopeusvakio oli hieman suurempi,  $(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , ja BBP-A(T118F):lla hieman pienempi,  $(0,79 \pm 0,05) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . 50 °C:een lämpötilassa dissosiaationopeusvakiot kasvavat noin viisinkertaisiksi. Suurin arvo on jälleen BBP-A(A74S):lla,  $(5,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , seuraavaksi suurin BBP-A:lla,  $(4,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , ja pienin BBP-A(T118F):lla,  $(4,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

Taulukko 12. Dissosiaationopeusvakiot [<sup>3</sup>H]biotiinin syrjäyttämisen avulla

Proteiini	$k_{\text{diss}} 30 \text{ °C}$ ( $\cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )	$k_{\text{diss}} 40 \text{ °C}$ ( $\cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )	$k_{\text{diss}} 50 \text{ °C}$ ( $\cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )
BBP-A	$0,218 \pm 0,005$	$0,89 \pm 0,02$	$4,5 \pm 0,1^{\text{a}}$
BBP-A(A74S)		$1,2 \pm 0,1^{\text{b}}$	$5,8 \pm 0,2$
BBP-A(T118F)		$0,79 \pm 0,05$	$4,3 \pm 0,3$

<sup>a</sup> viimeinen mittauspiste yli alkuperäisen tason (jätetty pois), <sup>b</sup> viimeinen mittauspiste epäluotettava (jätetty pois)

Fluoresenssispektrofotometrisesti määritetyissä dissosiaationopeusvakioissa suurin arvo on BBP-A(T118F):lla, ja radiobiotiinin avulla määritetyissä nopeusvakioissa suurin arvo on BBP-A(A74S):lla. Kuitenkin nopeusvakioiden erot eri proteiinien välillä ovat merkityksettömän pieniä, eli mutaatiot eivät aiheuta merkittävää muutosta BBP-A:n biotiiniaffiniteettiin.

## 14 YHTEENVETO

### 14.1 Käsivarrellinen HABA

Työn ensimmäisessä osassa tavoitteena oli syntetisoida käsivarrellista HABA:a ja liittää se sopivaan proteiiniin. Tavoitteeseen päästiin, vaikka työ osoittautui ennakoitua vaikeammaksi. Synteesin viimeisessä vaiheessa käytettiin Juha Määtän aiemmin valmistamaa tuotetta **8**, jota ei ollut puhdistettu pylväskromatografialla. NHS-esteröinti saatiin tehtyä pienillä ainemäärillä (25 mg). Yritys tehdä NHS-esteröinti suuremmalle määrälle (358 mg) tuotetta **8** epäonnistui, minkä vuoksi tuotetta **8** syntetisoitiin lisää lähtien 3-(2-hydroksifenyyl)propanihapposta. Synteesin eri vaiheissa havaittiin, että tuotteiden lisäksi reaktioissa saatiin epäpuhtauksia, mahdollisia sivutuotteita ja synteesituotteen joukkoon jääneitä reagoimattomia lähtöaineita. Diatsotointireaktio osoittautui tässä suhteessa ongelmalliseksi, koska <sup>13</sup>C-spektrin perusteella reaktiossa syntyi runsaasti sivutuotteita. Aiemmin on havaittu, että hydroksiatsobentseeni-karboksyylihappojen *orto*-muodot, joissa happoryhmä on *orto*-asemassa diatso-sidokseen nähden, kuten HABA:ssa, ovat vaikeampia syntetisoida kuin *meta*- tai *para*-muodot.<sup>63</sup> Todennäköistä onkin, että NHS-esteröinti suuremmalle määrälle puhdistamatonta tuotetta **8** epäonnistui ainakin osittain diatsotointivaiheessa tuotteen joukkoon syntyneiden epäpuhtauksien vuoksi.

Työssä onnistuttiin puhdistamaan tuotetta **8** pylväskromatografialla. Mielenkiintoista olisikin selvittää, kuinka NHS-esteröinti onnistuu puhdistetulle tuotteelle, ja kuinka lähtöaineen puhtaus vaikuttaa lopputuotteen **9** puhtauteen.

Kuten etukäteen oli arveltu, lopputuotteen epäpuhtaudet eivät estäneet sen käyttöä. Tuote **9** onnistuttiin kiinnittämään BSA-proteiiniin ja puhdistamaan dialysoimalla. HABA-BSA-konjugaatille tehty ELISA-koe osoitti, että konjugaatti sitoutui avidiiniin spesifisesti. ELISA:ssa käytettiin avidiinia ja avidiinin N118M-mutanttia, jonka HABA-affiniteetti on suurempi kuin avidiinin<sup>63</sup>. Kokeessa havaittiin pieni ero 0,05 µg proteiinia sisältävien kuoppien signaalissa, niin että mutatoituneen muodon antama signaali oli suurempi. Ero kuitenkin hävisi suuremmilla pitoisuuksilla. Lisäkokeilla voitaisiin varmistaa, mittaako HABA-BSA-konjugaatilla tehty ELISA-koe proteiinien HABA-affiniteettiä, kuten oli suunniteltu eli riippuko signaalin suuruus ainoastaan proteiinin HABA-affiniteetista. Lisäksi koetta voitaisiin muokata kiinnittämällä käsivarrellinen

HABA entsyymiin ja tutkittavat proteiinit mikrotiitterilevyyn, jolloin välttyttäisiin vasta-aineiden käytöltä.

ELISA:ssa havaittiin myös biotiinia sisältävien kuoppien signaalin kasvu avidiinin pitoisuuden funktiona. Biotiinin tarkoitus oli estää avidiinin kiinnittyminen HABA-BSA-konjugaattiin, koska avidiinin affiniteetti biotiiniin on huomattavasti suurempi kuin HABA:an. Koejärjestelyssä biotiini lisättiin mikrotiitterilevyille yhtä aikaa avidiinin kanssa, jolloin HABA ja biotiini kilpailivat sitoutumisesta avidiiniin. Huolimatta avidiinin suuremmasta biotiiniaffiniteetista jonkin verran avidiinia ilmeisesti sitoutui HABA:an, mikä selittää kontrollikuoppien signaalin. Koejärjestelyä voitaisiin parantaa inkuboimalla avidiinia biotiinin kanssa ennen avidiinin lisäämistä levyille, jolloin sitoutumispaikat ehtisivät satureitua biotiinilla, ja avidiinin kiinnittyminen HABA:an estyisi tehokkaammin. Toinen mahdollinen selittävä tekijä signaalin kasvulle on se, että avidiinia sitoutui kuoppiin myös epäspesifisesti.

## 14.2 Uusi biotiinia sitova proteiini BBP-A

Työn toisessa osassa tutkittiin biotiinia sitovaa proteiinia, BBP-A:ta. Aiemmin on havaittu, että BBP-A:n aminohapposekvenssi on hyvin samankaltainen avidiinin aminohapposekvenssin kanssa.<sup>84</sup> Siksi BBP-A:n ominaisuuksia haluttiin kokeellisesti verrata avidiinin ominaisuuksiin. Liitteessä 6 on kuva BBP-A:n röntgenkristallografialla määritetystä rakenteesta.

Sekä BBP-A:lla että avidiinilla on korkea pI, BBP-A:lla 9,75 ja avidiinilla 10<sup>85</sup>. BBP-A:n aminohapposekvenssin mukaan proteiinilla on yksi mahdollinen N-glykosylaatiokohta, <sup>17</sup>Asn-Met-Thr-Ile<sup>20</sup>, joka on identtinen avidiinin glykosylaatiokohdan kanssa.<sup>84</sup> Deglykosylaatiokokeessa havaittiin, että hyönteissolutuotettu BBP-A oli glykosyloitu kuten avidiinikin. Bakteerituotetut proteiinit sen sijaan eivät sisällä sokeriosia, koska bakteerisoluista puuttuvat proteiinien glykosylaatioon tarvittavat rakenteet.

Aminohapposekvenssien ja mallinnuksen perusteella BBP-A:n odotettiin muodostavan samankaltaisen tetrameerirakenteen kuin avidiini.<sup>84</sup> Geelisuodatuksella saatujen tulosten mukaan oletus piti paikkansa. Tuloksista laskettujen standardisuorien korrelaatio-

kertoimet eivät olleet kovin hyviä, pH 4  $R^2 = 0,93$  ja pH 11  $R^2 = 0,73$ . Syytä voidaan lähinnä arvailla. Kenties pylvään matriisi ja proteiinit reagoivat keskenään, jolloin proteiinien eluutioaikaan vaikuttivat muutkin ominaisuudet kuin molekyylipaino. Vaikka geelisuodatuksella mitatut molekyylipainot ovat pienempiä kuin massaspektrometrilla saatu molekyylipaino, voidaan mittaustuloksista kuitenkin päätellä proteiinin olevan todennäköisimmin tetrameeri.

Geelisuodatuksessa havaittiin myös, että matalassa pH:ssa BBP-A ei ole yhtä stabiili kuin avidiini. BBP-A hajosi osittain alayksiköihin jo pH:ssa 4, kun avidiinin on todettu olevan stabiili pH-alueella 2–13, ja vasta tämän alueen ulkopuolella menettävän aktiivisuuttaan ja hajoavan alayksiköihin<sup>85</sup>. Myös lämpöstabiilisuuskokeen tulokset kertovat, että BBP-A:n tetrameerirakenteen kestävyys on huomattavasti heikompi kuin avidiinilla, sillä hajoamislämpötila avidiinilla on 90 °C ja BBP-A:lla 70 °C biotiinin läsnä ollessa. Ero johtunee kvaternäärirakenteessa monomeerien väliseen sitoutumiseen osallistuvien aminohappojen eroista varsinkin 1–3 ja 1–4 rajapinnoissa tai BBP-A:n heikommasta  $\beta$ -tynnyrirakenteesta.<sup>84</sup> Vasta-ainetunnistuksen perusteella laskostuneen BBP-A:n ulkopinnan rakenteet eivät ole samanlaisia kuin avidiinilla, koska antiavidiini tunnisti BBP-A:n vain heikosti.

BBP-A:n T118F- tai A74S-mutaatioiden ei havaittu aiheuttavan merkittävää muutosta tetrameerirakenteen lämpöstabiilisuuteen tai biotiiniaffiniteettiin. BBP-A:n sekvenssissä 1–3 rajapinnassa olevaa <sup>118</sup>treoniinia vastaa avidiinilla isoleusiini, joka on hydrofobinen aminohappo. Treoniini on polaarinen aminohappo, joka sisältää OH-ryhmän, ja sen tilalle pistemutaation avulla vaihdettu fenyylialaniini sisältää aromaattisen ryhmän. Aminohapposekvenssin ja mallituksen perusteella BBP-A:n biotiinin sitomistaskun muodostavat aminohapot ovat samoja kuin avidiinilla, ainoastaan <sup>74</sup>alaniinin sijaan avidiinissa on OH-ryhmän sisältävä seriini.<sup>84</sup> Olisi voinut olettaa, että seriinin vaihtaminen alaniiniin olisi vahvistanut biotiinin sitoutumista BBP-A:han, mutta mittaustulosten perusteella näin ei käynyt, vaan dissosiaationopeusvakiot olivat hyvin lähellä toisiaan.

BBP-A:n biotiiniaffiniteetti on selvästi heikompi kuin avidiinilla. Fluoresenssispektrometrimittauksessa BBP-A:n  $k_{diss}$  oli 30 kertaa suurempi kuin avidiinilla 25 °C:ssa ja 70 kertaa suurempi 50 °C:ssa. BBP-A:han sitoutuneesta

biotiinista noin 90 % irtosi tunnin aikana 25 °C:ssa. Avidiinilla dissosiaatio on niin hidasta, että vain 10 % sitoutuneesta biotiinista irtoaa tunnin aikana.<sup>76</sup>

Avidiinin ominaisuuksiin vertaamisen lisäksi työssä haluttiin selvittää, oliko uusi BBP-A sama proteiini kuin joku aiemmin kananmunan keltuaisesta tai valkuaisesta eristetty BBP.

Bakteerisoluisissa tuotetun BBP-A:n tetrameerinen molekyylipaino on 56 kDa. Proteiini koostuu neljästä samanlaisesta alayksiköstä. Kananmunan keltuaisesta on löydetty kaksi eri BBP:tä, joista BBP-II on homotetrameeri, jonka molekyylipaino on 74,3 kDa, ja BBP-I monomeeri, jonka molekyylipaino on 68 kDa.<sup>64,65</sup> On esitetty, että BBP-I on pseudotetrameeri, jonka osittaisesta proteolyysistä syntyy BBP-II.<sup>65</sup> Kumpikaan näistä proteiineista ei molekyylipainon perusteella ole BBP-A. Lisäksi BBP-II:n, joka tetrameerirakenteensa puolesta olisi lupaavampi ehdokas, isoelektrinen piste on huomattavan matala, 4,6<sup>64</sup>, kun BBP-A:n isoelektrinen piste on 9,75.

Keltuaisen BBP:n biotiiniaffiniteettia on tutkittu radioaktiivisen [<sup>14</sup>C]biotiinin avulla. Biotiinin vapautumisen on todettu olevan 1000 kertaa nopeampaa kuin avidiinilla. BBP-A:n  $k_{\text{diss}}$  arvoihin verrattuna BBP:lle mitatut arvot ovat noin 2–4 kertaa suurempia. Esimerkiksi 50 °C:ssa BBP:n<sup>64</sup>  $k_{\text{diss}} = 1,8 \cdot 10^{-3}$  ja BBP-A:n  $k_{\text{diss}} = 0,45 \cdot 10^{-3}$ .

Kananmunan valkuaisesta eristetystä BBP:stä tiedetään ainoastaan, että proteiini on monomeeri, jonka molekyylipaino on 67 kDa.<sup>66</sup> Näiden tietojen perusteella valkuaisen BBP ei ole sama proteiinin kuin BBP-A.

Edellä mainitun perusteella ei voida osoittaa, että BBP-A olisi joku aiemmin tutkituista BBP:stä, vaan tutkimuksen perusteella kyseessä on uusi biotiinia sitova proteiini. Jatkotutkimusten avulla voitaisiin selvittää, mikä on BBP-A:n biologinen tehtävä muiden biotiinia sitovien proteiinien rinnalla. Kuitenkin vielä mielenkiintoisempaa on selvittää, kuinka BBP-A:n biotiiniaffiniteettia voidaan hyödyntää erilaisissa molekyylibiologian sovelluksissa. Avidiinin biotiiniaffiniteetti on joihinkin käytännön sovelluksiin liian vahva erittäin hitaan dissosiaation vuoksi. Siksi avidiinille on kehitetty uusia ligandeja, joiden sitoutuminen olisi heikompaa kuin biotiinilla, ja toisaalta avidiinin affiniteettia tunnetuun ligandiin, HABA:an, on pyritty parantamaan mutaatioiden avulla<sup>63</sup>. Työn ensimmäisessä osassa kehitettiin työkalua avidiinin



mutatoidujen muotojen seulontaan HABA-affiniteetin suhteen. BBP-A tarjoaa uuden tien kohti samaa päämäärää: vahva, mutta avidiinia heikompi biotiiniaffiniteetti.

## 15 KIRJALLISUUSLUETTELO

1. C. Bieniarz, M. Husain, G. Barnes, C.A. King and C.J. Welch, Extended length heterobifunctional coupling agents for protein conjugations, *Bioconjug. Chem.* **1996**, 7(1), 88-95.
2. S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, Y. Niitsu, I. Urushizaki, M. Nishiura, R. Kanazawa, H. Kurosaki, S. Tachibana, N. Nakazawa and H. Ogawa, Mild and efficient conjugation of rabbit Fab' and horseradish peroxidase using a maleimide compound and its use for enzyme immunoassay, *J. Biochem.* **1982**, 92(5), 1413-1424.
3. T.H. Ji, Bifunctional reagents, *Methods Enzymol.* **1983**, 91, 580-609.
4. G.E. Means, R.E. Feeney, Chemical modifications of proteins: history and applications, *Bioconjug. Chem.* **1990**, 1(1), 2-12.
5. G.A. Pietersz, The linkage of cytotoxic drugs to monoclonal antibodies for the treatment of cancer, *Bioconjug. Chem.* **1990**, 1(2), 89-95.
6. M. Brinkley, A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents, *Bioconjug. Chem.* **1992**, 3(1), 2-13.
7. S.S. Ghosh, P.M. Kao, A.W. McCue and H.L. Chappelle, Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes, *Bioconjug. Chem.* **1990**, 1(1), 71-76.
8. Cross-linking reagents,  
<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=0203> (21.11.2005).
9. <http://www.sigmaaldrich.com> (15.2.2006).
10. K. Martinek, V.P. Torchilin, Stabilization of enzymes by intramolecular cross-linking using bifunctional reagents, *Methods Enzymol.* **1988**, 137, 615-626.
11. B.J.-M. Thevenin, Z. Shahrokh, R.L. Williard, E.K. Fujimoto, J.J. Kang, N. Ikemoto and S.B. Shoheit, A novel photoactivatable cross-linker for the functionally-directed region-specific fluorescent labeling of proteins, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 206(2), 471-477.
12. J.R. Coggins, E.A. Hooper and R.N. Perham, Use of dimethyl suberimidate and novel periodate-cleavable bis(imido esters) to study the quaternary structure of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*, *Biochemistry* **1976**, 15(12), 2527-2533.

13. R. Kluger, A. Alagic, Chemical cross-linking and protein-protein interactions - a review with illustrative protocols, *Bioorg. Chem.* **2004**, 32(6), 451-472.
14. C.L. Jaffe, H. Lis and N. Sharon, New cleavable photoreactive heterobifunctional cross-linking reagents for studying membrane organization, *Biochemistry* **1980**, 19(19), 4423-4429.
15. P.A.S. Smith, B.B. Brown, The reaction of aryl azides with hydrogen halides. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2438-2441.
16. T.H. Ji, A novel approach to the identification of surface receptors. The use of photosensitive hetero-bifunctional cross-linking reagent, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252(5), 1566-1570.
17. D.J. Kiehm, T.H. Ji, Photochemical cross-linking of cell membranes. A test for natural and random collisional cross-links by millisecond cross-linking, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252(23), 8524-8531.
18. R.J. Fessenden, J.S. Fessenden and M.W. Logue, *Organic Chemistry*, 6. Pains, Brooks/Cole, Pacific Grove CA, 1998.
19. C.K. Huang, F.M. Richards, Reaction of a lipid-soluble, unsymmetrical, cleavable, cross-linking reagent with muscle aldolase and erythrocyte membrane proteins, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252(15), 5514-5521.
20. E.F. Vanin, T.H. Ji, Synthesis and application of cleavable photoactivable heterobifunctional reagents, *Biochemistry* **1981**, 20(24), 6754-6760.
21. R.V. Lewis, M.F. Roberts, E.A. Dennis and W.S. Allison, Photoactivated heterobifunctional cross-linking reagents which demonstrate the aggregation state of phospholipase A<sub>2</sub>, *Biochemistry* **1977**, 16(25), 5650-5654.
22. R.B. Mikkelsen, D.F. Wallach, Photoactivated cross-linking of proteins within the erythrocyte membrane core, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251(23), 7413-7416.
23. R.R. Traut, A. Bollen, T.T. Sun, J.W. Hershey, J. Sundberg and L.R. Pierce, Methyl 4-mercaptopbutyrimidate as a cleavable cross-linking reagent and its application to the *Escherichia coli* 30S ribosome, *Biochemistry* **1973**, 12(17), 3266-3273.
24. T.H. Ji, I. Ji, Macromolecular photoaffinity labeling with radioactive photoactivable heterobifunctional reagents, *Anal. Biochem.* **1982**, 121(2), 286-289.
25. G.W. Fleet, J.R. Knowles and R.R. Porter, The antibody binding site. Labelling of a specific antibody against the photo-precursor of an aryl nitrene, *Biochem. J.* **1972**, 128(3), 499-508.

26. L.C. Lutter, F. Ortanderl and H. Fasold, The use of a new series of cleavable protein-crosslinkers on the *Escherichia coli* ribosome, *FEBS Lett.* **1974**, 48(2), 288-292.
27. F. Wold, Bifunctional reagents, *Methods Enzymol.* **1972**, 25, 623-651.
28. F.C. Hartman, F. Wold, Cross-linking of bovine pancreatic ribonuclease A with dimethyl adipimidate, *Biochemistry* **1967**, 6(8), 2439-2448.
29. G.E. Davies, G.R. Stark, Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1970**, 66(3), 651-656.
30. J.V. Staros, *N*-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(*N*-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers, *Biochemistry* **1982**, 21(17), 3950-3955.
31. R.A. Smiley, C. Arnold, Aliphatic nitriles from alkyl chlorides, *J. Org. Chem.* **1960**, 25, 257-258.
32. S.M. McElvain, J.P. Schroeder, Orthoesters and related compounds from malono- and succinonitriles, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 40-46.
33. K. Wang, F.M. Richards, The behavior of cleavable crosslinking reagents based on the disulfide group, *Isr. J. Chem.* **1974**, 12, 375-389.
34. T.P. Johnston, A. Gallagher, 3-Mercaptopropionamidine and S-2-amidinoethyl thiosulfuric acid. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 1436-1437.
35. J.V. Staros, D.G. Morgan and D.R. Appling, A membrane-impermeant, cleavable cross-linker. Dimers of human erythrocyte band 3 subunits cross-linked at the extracytoplasmic membrane face, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256(11), 5890-5893.
36. T.H. Ji, Cross-linking of glycolipids in erythrocyte ghost membrane, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249(24), 7841-7847.
37. J. Carlsson, H. Drevin and R. Axén, Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent, *Biochem. J.* **1978**, 173(3), 723-737.
38. G.W. Anderson, J.E. Zimmerman and F.M. Callahan, The use of esters of *N*-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86(9), 1839-1842.
39. R.J. Smith, R.A. Capaldi, D. Muchmore and F. Dahlquist, Cross-linking of ubiquinone cytochrome *c* reductase (complex III) with periodate-cleavable bifunctional reagents, *Biochemistry* **1978**, 17(18), 3719-3723.

40. F. Yan, L. Chen, Q. Tang and R. Wang, Synthesis and characterization of a photocleavable cross-linker and its application on tunable surface modification and protein photodelivery, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*(5), 1030-1036.
41. Y. Arano, H. Matsushima, M. Tagawa, M. Koizumi, K. Endo, J. Konishi and A. Yokoyama, A novel bifunctional metabolizable linker for the conjugation of antibodies with radionuclides, *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*(2), 71-76.
42. J.K. Inman, P.F. Highet, N. Kolodny and F.A. Robey, Synthesis of  $N^{\alpha}$ -(*tert*-butoxycarbonyl)- $N^{\epsilon}$ -[*N*-(bromoacetyl)- $\beta$ -alanyl]-L-lysine: its use in peptide synthesis for placing a bromoacetyl cross-linking function at any desired sequence position, *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*(6), 458-463.
43. P.F. Pilch, M.P. Czech, Interaction of cross-linking agents with the insulin effector system of isolated fat cells. Covalent linkage of  $^{125}\text{I}$ -insulin to a plasma membrane receptor protein of 140,000 daltons, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*(9), 3375-3381.
44. D.H. Rich, P.D. Gesellchen, A. Tong, A. Cheung and C.K. Buckner, Alkylating derivatives of amino acids and peptides. Synthesis of *N*-maleoylamino acids, [1-(*N*-maleoylglycyl)cysteinyl]oxytocin, and [1-(*N*-maleoyl-11-aminoundecanoyl)cysteinyl]oxytocin. Effects on vasopressin-stimulated water loss from isolated toad bladder, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*(10), 1004-1010.
45. A.I. Vogel, B.S. Furniss, A.J. Hannaford, V. Rogers, P.W.G. Smith and A.R. Tatchell, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry : Including qualitative organic analysis*, 4. Painos, Longman, London, 1984.
46. Y.Y. Cheng, H.C. Chang, G. Hoops and M. Su, Stabilization of yeast cytochrome *c* covalently immobilized on fused silica surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(35), 10828-10829.
47. R. Aggeler, K. Chicas-Cruz, S.X. Cai, J.F. Keana and R.A. Capaldi, Introduction of reactive cysteine residues in the  $\epsilon$  subunit of *Escherichia coli*  $F_1$  ATPase, modification of these sites with tetrafluorophenyl azide-maleimides, and examination of changes in the binding of the  $\epsilon$  subunit when different nucleotides are in catalytic sites, *Biochemistry* **1992**, *31*(11), 2956-2961.
48. J.F.W. Keana, S.X. Cai, New reagents for photoaffinity labeling: synthesis and photolysis of functionalized perfluorophenyl azides. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*(11), 3640-3647.
49. P. Pietroni, M.C. Young, G.J. Latham and P.H. von Hippel, Structural analyses of gp45 sliding clamp interactions during assembly of the bacteriophage T4 DNA

- polymerase holoenzyme. I. Conformational changes within the gp44/62-gp45-ATP complex during clamp loading, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272(50), 31666-31676.
50. T.H. Ji, D.J. Kiehm and C.R. Middaugh, Presence of spectrin tetramer on the erythrocyte membrane, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255(7), 2990-2993.
  51. M. Behforouz, J.E. Kerwood, Alkyl and aryl sulfenimides. *J. Org. Chem.* **1969**, 34(1), 51-55.
  52. R.E. Galardy, L.C. Craig, J.D. Jamieson and M.P. Printz, Photoaffinity labeling of peptide hormone binding sites, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249(11), 3510-3518.
  53. I. Ji, T.H. Ji, Macromolecular photoaffinity labeling of the lutropin receptor on granulosa cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, 77(12), 7167-7170.
  54. I. Ji, T.H. Ji, Both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of human choriogonadotropin photoaffinity label the hormone receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78(9), 5465-5469.
  55. V. Witzemann, D. Muchmore and M.A. Raftery, Affinity-directed cross-linking of membrane-bound acetylcholine receptor polypeptides with photolabile  $\alpha$ -bungarotoxin derivatives, *Biochemistry* **1979**, 18(24), 5511-5518.
  56. Active group reaction schemes,  
<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=020305> (20.1.2006).
  57. Y.Z. Li, J.P. Kirby, M.W. George, M. Poliakoff and G.B. Schuster, 1,2-Didehydroazepines from the photolysis of substituted aryl azides: analysis of their chemical and physical properties by time-resolved spectroscopic methods, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110(24), 8092-8098.
  58. C.L. Wood, M.S. O'Dorisio, Covalent cross-linking of vasoactive intestinal polypeptide to its receptors on intact human lymphoblasts, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260(2), 1243-1247.
  59. M. Schmitt, R.G. Painter, A.J. Jesaitis, K. Preissner, L.A. Sklar and C.G. Cochrane, Photoaffinity labeling of the N-formyl peptide receptor binding site of intact human polymorphonuclear leukocytes. A label suitable for following the fate of the receptor-ligand complex, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258(1), 649-654.
  60. A. Schmidt, S. Kalkhof, C. Ihling, D.M.F. Cooper and A. Sinz, Mapping protein interfaces by chemical cross-linking and fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: application to a calmodulin/adenylyl cyclase 8 peptide complex, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2005**, 11(5), 525-534.
  61. A.J. Cumber, J.A. Forrester, B.M.J. Foxwell, W.C.J. Ross and P.E. Thorpe, Preparation of antibody-toxin conjugates, *Methods Enzymol.* **1985**, 112, 207-225.

62. M. Darder, K. Takada, F. Pariente, E. Lorenzo and H.D. Abruña, Dithiobissuccinimidyl propionate as an anchor for assembling peroxidases at electrodes surfaces and its application in a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor, *Anal. Chem.* **1999**, *71*(24), 5530-5537.
63. T. Paldanius, *Diatsobentseenit. Nimeäminen, synteesi ja sovellutukset*, Jyväskylä, 2004.
64. H.W. Meslar, S.A. Camper and H.B. White 3rd, Biotin-binding protein from egg yolk. A protein distinct from egg white avidin, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*(19), 6979-6982.
65. L. Bush, H.B. White 3rd, Conversion of domains into subunits in the processing of egg yolk biotin-binding protein I, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*(10), 5741-5745.
66. P.B. Seshagiri, P.R. Adiga, Identification and molecular characterisation of a biotin-binding protein distinct from avidin of chicken egg white and comparison with yolk biotin-binding protein, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *926*(3), 321-330.
67. V.P. Hytönen, J.A.E. Määttä, E.A. Niskanen, J. Huuskonen, K.J. Helttunen, K. Halling, J.P. Slotte, H.R. Nordlund, K. Rissanen, M.S. Johnson, T.A. Salminen, M.S. Kulomaa, O.H. Laitinen ja T.T. Airene, käsikirjoitus.
68. M. Morpurgo, H. Hofstetter, E.A. Bayer and M. Wilchek, A chemical approach to illustrate the principle of signal transduction cascades using the avidin-biotin system, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(49), 12734-12739.
69. P.W. Atkins, J. De Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, 7. Painos, Oxford University Press, Oxford, 2002.
70. D.A. Skoog, F.J. Holler and T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5. Painos, Harcourt Brace College, Philadelphia PA, 1998.
71. D.L. Nelson, M.M. Cox and A.L. Lehninger, *Lehninger principles of biochemistry*, 3. Painos, Worth, New York, 2000.
72. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel and A. Bairoch, Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *Proteomics Protocols Handbook* **2005**, 571-607.
73. J.D. Bendtsen, H. Nielsen, G. von Heijne and S. Brunak, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*(4), 783-795.
74. H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng.* **1997**, *10*(1), 1-6.

75. P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold and M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*(21), 7413-7417.
76. V.P. Hytönen, O.H. Laitinen, T.T. Airene, H. Kidron, N.J. Meltola, E.J. Porkka, J. Hörhä, T. Paldanius, J.A. Määttä, H.R. Nordlund, M.S. Johnson, T.A. Salminen, K.J. Airene, S. Ylä-Herttuala and M.S. Kulomaa, Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*, *Biochem. J.* **2004**, *384*(Pt 2), 385-390.
77. K.J. Airene, C. Oker-Blom, V.S. Marjomäki, E.A. Bayer, M. Wilchek and M.S. Kulomaa, Production of biologically active recombinant avidin in baculovirus-infected insect cells, *Protein Expr. Purif.* **1997**, *9*(1), 100-108.
78. O.H. Laitinen, K.J. Airene, V.P. Hytönen, E. Peltomaa, A.J. Mähönen, T. Wirth, M.M. Lind, K.A. Mäkelä, P.I. Toivanen, D. Schenkwein, T. Heikura, H.R. Nordlund, M.S. Kulomaa and S. Ylä-Herttuala, A multipurpose vector system for the screening of libraries in bacteria, insect and mammalian cells and expression in vivo, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*(4), e42.
79. T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2. Painos, Freeman, New York, 1993.
80. M.S. Kulomaa, H.A. Elo and P.J. Tuohimaa, A radioimmunoassay for chicken avidin. Comparison with a [<sup>14</sup>C]biotin-binding method, *Biochem. J.* **1978**, *175*(2), 685-690.
81. E.A. Bayer, S. Ehrlich-Rogozinski and M. Wilchek, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic method for assessing the quaternary state and comparative thermostability of avidin and streptavidin, *Electrophoresis* **1996**, *17*(8), 1319-1324.
82. L.A. Klumb, V. Chu and P.S. Stayton, Energetic roles of hydrogen bonds at the ureido oxygen binding pocket in the streptavidin-biotin complex, *Biochemistry* **1998**, *37*(21), 7657-7663.
83. V.P. Hytönen, J.A.E. Määttä, T.K.M. Nyholm, O. Livnah, Y. Eisenberg-Domovich, D. Hyre, H.R. Nordlund, J. Hörhä, E.A. Niskanen, T. Paldanius, T. Kulomaa, E.J. Porkka, P.S. Stayton, O.H. Laitinen and M.S. Kulomaa, Design and construction of highly stable, protease-resistant chimeric avidins, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*(11), 10228-10233.



84. E.A. Niskanen, V.P. Hytönen, A. Grapputo, H.R. Nordlund, M.S. Kulomaa and O.H. Laitinen, Chicken genome analysis reveals novel genes encoding biotin-binding proteins related to avidin family, *BMC Genomics* **2005**, 6(1), 41.
85. N.M. Green, Avidin, *Adv. Protein Chem.* **1975**, 29, 85-133.

**LIITTEET**

- LIITE 1 Homobifunktionaaliset reagenssit
- LIITE 2 Heterobifunktionaaliset reagenssit
- LIITE 3 Työssä käytetyt liuokset ja reagenssit
- LIITE 4 Geelisuodatuksen eluutiogrammi BBP-A:lle (pH 4)
- LIITE 5 Geelisuodatuksen eluutiogrammi BBP-A:lle (pH 11)
- LIITE 6 Kuva BBP-A:n röntgenkristallografisesti määritetystä rakenteesta

**Homobifunktionaaliset reagenssit**

Lyhenne	Nimi	Ominaisuudet	Luku	Viite
BS <sup>3</sup>	bis(sulfosukkinimidyyl)-suberaatti	aminospesifinen, vesiliukoinen, kalvoa läpäisemätön	5.2	30
CMDT	<i>N,N'</i> -bis(2-karboksi-imido-etyyli)tartarimididimetyyliesteri	aminospesifinen, vesiliukoinen, lohkeaa perjodaatilla	4.2	12
DABP	4,4'-diatsidobifenyyl	valoaktivoituva, rasvaliukoinen	3.1	22
DAN	1,5-diatsidonaftaleeni	valoaktivoituva, rasvaliukoinen	3.1	22
DIDIT	di-isetionyyli-3,3'-ditiobis-propionimidaatti	aminospesifinen, vesiliukoinen, kalvoa läpäisemätön, lohkeaa DTT:lla	4.2	35
DMA	dimetyyliadipimidaatti	aminospesifinen, vesiliukoinen, 8,6 Å	4.1	36
DMM	dimetyylimalonimidaatti	aminospesifinen, vesiliukoinen, 4,9 Å	4.1	36
DMS	dimetyylisuberimidaatti	aminospesifinen, vesiliukoinen, 11 Å	4.1	36
DMSC	dimetyylisukkinimidaatti	aminospesifinen, vesiliukoinen, 6,1 Å	4.1	36
DST	disukkinimidyylitartraatti	aminospesifinen, erittäin niukasti vesiliukoinen, lohkeaa perjodaatilla, 6 Å	5.1	39
DTBP	dimetyyli-3,3'-ditiobis-propionimidaatti	aminospesifinen, vesiliukoinen, lohkeaa DTT:lla	4.2	33
DTSSP	3,3'-ditiobis(sulfosukkinimidyylipropionaatti)	aminospesifinen, vesiliukoinen, kalvoa läpäisemätön, lohkeaa DTT:lla	5.2	30
NHS-SA	suberihapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen, erittäin niukasti vesiliukoinen	5.1	43
SPT	<i>N,N'</i> -bis(3-sukkinimidyyloksi-karbonyylipropyyl)tartaramidi	aminospesifinen, erittäin niukasti vesiliukoinen, lohkeaa perjodaatilla, 18 Å	5.1	39

Huom. vesiliukoinen = liukenee puskuriliuokseen riittävään pitoisuuteen; erittäin niukasti vesiliukoinen = liuotetaan orgaaniseen liuottimeen ennen puskuriliuokseen sekoittamista

Lyhenne	Nimi	Ominaisuudet	Luku	Viite
TDA	viinihapon diatsidi eli tartryylidiatsidi	aminospesifinen, vesiliukoinen, lohkeaa perjodaatilla, 6 Å	3.2	26
TDCA	tartryylidi( $\epsilon$ -aminokaprooyliatsidi)	aminospesifinen, vesiliukoinen, lohkeaa perjodaatilla, 23 Å	3.2	26
TDGA	tartryylidi(glysyyliaatsidi)	aminospesifinen, vesiliukoinen, lohkeaa perjodaatilla, 13 Å	3.2	26
	4,4'-ditiobisfenyyliatsidi	valoaktivoituva, rasvaliukoinen, lohkeaa DTT:lla	3.1	22

Huom. vesiliukoinen = liukenee puskuriliuokseen riittävään pitoisuuteen; erittäin niukasti vesiliukoinen = liuotetaan orgaaniseen liuottimeen ennen puskuriliuokseen sekoittamista

**Heterobifunktionaaliset reagenssit**

Lyhenne	Nimi	Ominaisuudet	Luku	Viite
ANB-AI	etyyli- <i>N</i> -5-atsido-2-nitro-bentsoyyliaminoasetimidaatti	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, vesiliukoinen	7.3	21
ANB-NOS	<i>N</i> -5-atsido-2-nitrobentsoyylisukkinimidi	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, erittäin niukasti vesiliukoinen	8.1	21
DNCO	di- <i>N</i> -(2-nitro-4-atsidofenyyl)kystamiini- <i>S,S</i> -dioksidi	tiolispesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, rasvaliukoinen	3.1	19
EABI	etyyli-4-atsidobentsoimidaatti	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, vesiliukoinen	7.1	17,21
EADB	etyyli-4-[(4-atsidofenyyliditio)butyrimidaatti	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, vesiliukoinen, lohkeaa DTT:lla	7.2	17
LC-SMCC (3)	pitkäketjuinen sukkinimidyyl-4-( <i>N</i> -maleimidometyyli)sykloheksaani-1-karboksylaatti	amino- ja tiolispesifinen ryhmä, pitkä käsivarsi	6.3, 9.5	1
MABI	metyyli-4-atsidobentsoimidaatti	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, vesiliukoinen	7.1	16
MADP	metyyli-3-(4-atsidofenyyliditio)propionimidaatti	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, vesiliukoinen, lohkeaa DTT:lla	7.2	20,50
MESS	<i>N</i> -[[4-(2-maleimidoetoksi)sukkinyyli]-oksi]sukkinimidi	amino- ja tiolispesifinen ryhmä, erittäin niukasti vesiliukoinen, lohkeava esterisidos	6.1, 9.5	41
NHS-ABA	4-atsidobentsoehapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, 7 Å	8	50,52
NHS-ABG	4-atsidobentsoyyliglysiinin <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, 10 Å	8	53,54
NHS-ABGG	4-atsidobentsoyyliglysyylisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, 13 Å	8	53
NHS-ABGT	4-atsidobentsoyyliglysyylityrosiinin <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä	8	24
NHS-ADPA	2-[(4-atsidofenyyliditio)etikahapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, lohkeaa DTT:lla	8.2.1	20

Huom. vesiliukoinen = liukenee puskuriliuokseen riittävään pitoisuuteen; erittäin niukasti vesiliukoinen = liuotetaan orgaaniseen liuottimeen ennen puskuriliuokseen sekoittamista

Lyhenne	Nimi	Ominaisuudet	Luku	Viite
NHS-APDP tai SADP	3-[(4-atsidofenyyliditio)propionihapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, erittäin niukasti vesiliukoinen, lohkeaa DTT:lla	8.2.1	20
NHS-ASA	4-atsidosalisyylihapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä	8.1	24
NHS-ASC	<i>N</i> -(4-atsidosalisyyli)-6-aminoheksaanihapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä	8.1	24
SAED	sulfosukkinimidyli-2-(7-atsido-4-metyylikumariini-3-asetamido)etyyli-1,3'-ditiopropionaatti	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, vesiliukoinen, lohkeaa DTT:lla, sisältää fluoresoivan ryhmän, 18 Å	8.2.1	11
SBAP	sukkinimidyli-3-(bromi-asetamido)propionaatti	amino- ja tiolispesifinen ryhmä	5.3.2	42
SPDP	<i>N</i> -sukkinimidyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaatti	amino- ja tiolispesifinen ryhmä, erittäin niukasti vesiliukoinen, lohkeaa DTT:lla	5.3.3, 9.5	37
SSTN	meripihkahapon 3-nitro-5-(5-[1,2]ditiolan-3-yyli-pentanyylioksi)bentsyyliesteri 2,5-diokso-pyrrolidin-1-yyli ester	amino- ja tiolispesifinen ryhmä, lohkeaa UV-säteilyllä	5.3.1, 9.4	40
TFPAM-3	<i>N</i> -(4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyli)-3-maleimido-propionamidi	tiolispesifinen ja valoaktiivinen ryhmä	6.4, 9.3	47
TFPAM-6	<i>N</i> -(4-atsido-2,3,5,6-tetrafluorobentsyyli)-3-maleimidoheksanamidi	tiolispesifinen ja valoaktiivinen ryhmä	6.4	47
	4'-atsidoatsobentseeni-4-karboksylihapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, lohkeaa ditioniitilla	8.2.2	14
	<i>N</i> -[4-( <i>p</i> -atsidofenyylia)so)-bentsoyyli]-3-aminopropyli- <i>N</i> '-oksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, lohkeaa ditioniitilla	8.2.2	14
	<i>N</i> -[4-( <i>p</i> -atsidofenyylia)so)-bentsoyyli]-6-aminoheksyyli- <i>N</i> '-oksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, lohkeaa ditioniitilla	8.2.2	14
	<i>N</i> -[4-( <i>p</i> -atsidofenyylia)so)-bentsoyyli]-11-aminoundekyyli- <i>N</i> '-oksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä, lohkeaa ditioniitilla	8.2.2	14
	<i>N</i> -(4-atsido-2-nitrofenyyli)-dodekaanihapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidiesteri	aminospesifinen ja valoaktiivinen ryhmä	8.1	55

Huom. vesiliukoinen = liukenee puskuriliukseen riittävään pitoisuuteen; erittäin niukasti vesiliukoinen = liuotetaan orgaaniseen liuottimeen ennen puskuriliukseen sekoittamista

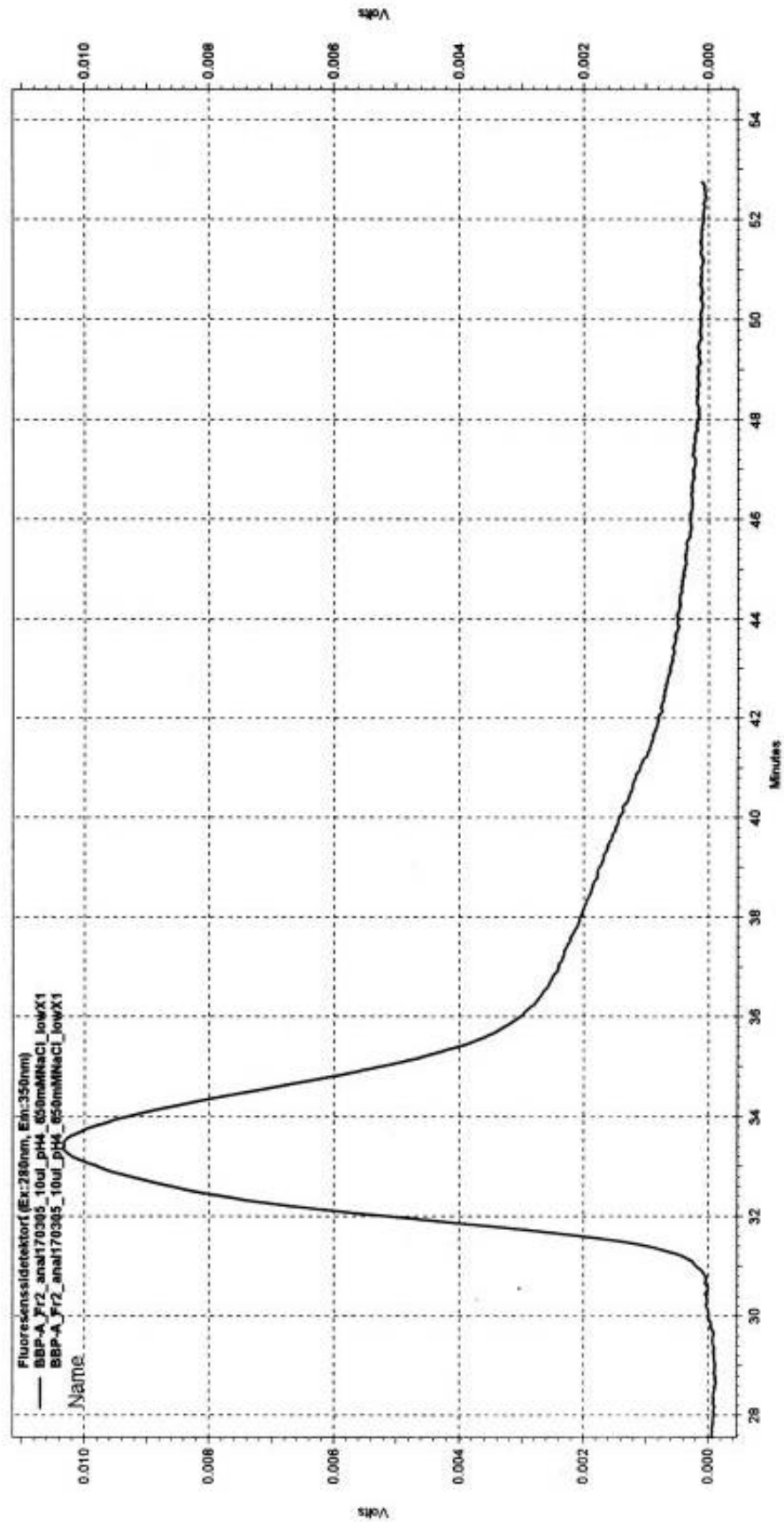
Liuos/Reagenssi	Sisältö	Valmistaja
Ajogeelipuskuri	18,15 g Trizma-emästä liuotetaan veteen. Säädetään pH 8,8:aan väkevällä suolahapolla. Lisätään vettä, kunnes tilavuus 100 ml.	
Akryyliamidi	30 %	Bio-Rad
Ammoniumpersulfaatti	Säilytys 4 °C	Bio-Rad
Apa-puskuri	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> 1mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O Säädetään pH 9,8:aan 10 M NaOH:lla.	
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolyylifosfaatti 15 mg/ml DMF:ssa, säilytys -20 °C	Sigma
Biosafe Coomassie	Coomassie G-250	Bio-Rad
<i>d</i> -Biotiini		Sigma
[ <sup>3</sup> H]Biotiini		Amersham
Blokkausliuos	5 % (w/v) rasvaton maitojauhe TBS-puskurissa	
BSA	naudan seerumialbumiini	Roche
1 % BSA-liuos	1 % BSA (w/v) PBS-puskurissa	
Cellfectin <sup>®</sup> -reagenssi	Cellfectin <sup>®</sup> transfektioreagenssi	Invitrogen
DEA-puskuri	100 mg MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 300 ml:aan H <sub>2</sub> O 97 ml dietanoliamiini Säädetään pH 9,8:aan 2 M suolahapolla. Täytetään vedellä 500 ml:ksi. Seisotetaan yön yli 25 °C. Suodatetaan 0,45 µm filtlerin läpi. Säilytys 4 °C.	
DMF	dimetyyliformamidi	Baker
DMSO	dimetyylisulfoksidi	Merck
EA-puskuri (5x)	15 g Trizma-emäs 72 g glysiini 5 g SDS Täytetään 1000 ml H <sub>2</sub> O. Käyttöliuos laimennetaan 1/5 veteen.	
Endo H <sub>f</sub>	endoglykosidaasi H -entsyymi	New England Biolabs

Liuos/Reagenssi	Sisältö	Valmistaja
GAR-AP	vuohessa tuotettu anti-kani vasta-aine, jossa alkalinen fosfataasi	Bio-Rad
HilloI-puskuri	50 mM Tris-HCl 2 mM EDTA 150 mM NaCl 1 % Triton X-100	
HyQ SFX-Insect - medium	biotiiniton kasvatusmediumi	HyClone
Insect-Xpress	kasvatusmediumi	Cambrex Bioscience Walkersville Inc.
Kodak-puskuri kantaliuos (10x)	30,3 g Tris 144 g glysiini tilavuus vedellä litraksi	
Kodak-puskuri käyttöliuos	200 ml kantaliuosta 400 ml metanolia 1400 ml H <sub>2</sub> O:a Säilytys 4 °C	
LW-molekyylipaino- markkeri	Fosforylaasi B            97400 Da BSA                            66200 Da Ovalbumiini                45000 Da Hiili-anhydraasi           31000 Da Trypsiini-inhibiittoori   21500 Da Lysotsyymi                 14400 Da	Bio-Rad
NA100-puskuri	50 mM CH <sub>3</sub> COONa 100 mM NaCl Säädetään etikkahapolla pH:ksi 4.	
NA650-puskuri	50 mM CH <sub>3</sub> COONa 650 mM NaCl Säädetään etikkahapolla pH:ksi 4.	
NaCl		Riedel de-Haën
NaHCO <sub>3</sub>		Riedel de-Haën
NaOH		Riedel de-Haën
NBT	Nitro Blue Tetrazolium 30 mg/ml 70 % DMF:ssa Säilytys -20 °C	Sigma

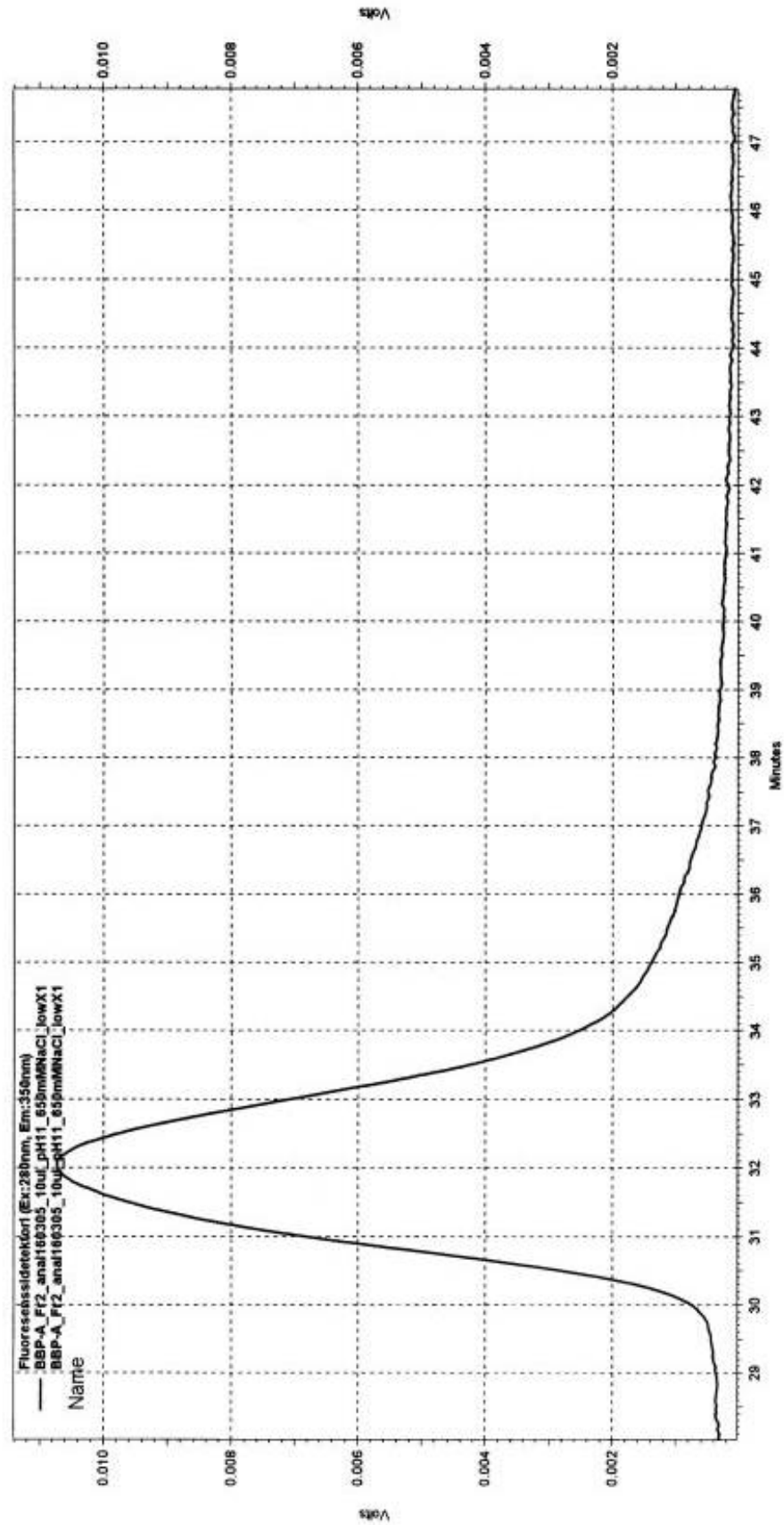


Liuos/Reagenssi	Sisältö	Valmistaja
NF100-puskuri	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -liuos 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -liuos Lisätään molempiin 100 mM NaCl Sekoitetaan sopivassa suhteessa, niin että saadaan pH 7.	
NF650-puskuri	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -liuos 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -liuos Lisätään molempiin 650 mM NaCl Sekoitetaan sopivassa suhteessa, niin että saadaan pH 7.	
NHS-etikkahappoesteri	etikkahapon <i>N</i> -hydroksisukkinimidyli-esteri 5 mg/ml DMF:ssa	Sigma
NK100-puskuri	50 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 100 mM NaCl pH 11	
NK650-puskuri	50 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 650 mM NaCl pH 11	
NK1000-puskuri	50 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1 M NaCl pH 11	
PBS-puskuri	16 g NaCl 0,4 g KCl 0,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,87 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O Liuotetaan 2 l:aan vettä ja säädetään pH 7,4:ään.	
PBS-Tween	1000 ml PBS-puskuria 0,5 ml Tween 20	
PNPP	paranitrofenyylifosfaatti alkalisen fosfataasin substraatti	Sigma
PNPP-liuos	Liuotetaan PNPP-tabletti 5 ml:aan DEA-puskuria valolta suojattuna.	
Ponceau-värjäysliuos	0,2 % Ponceau S 3 % trikloorietikkahappo vesiliuoksessa	Sigma

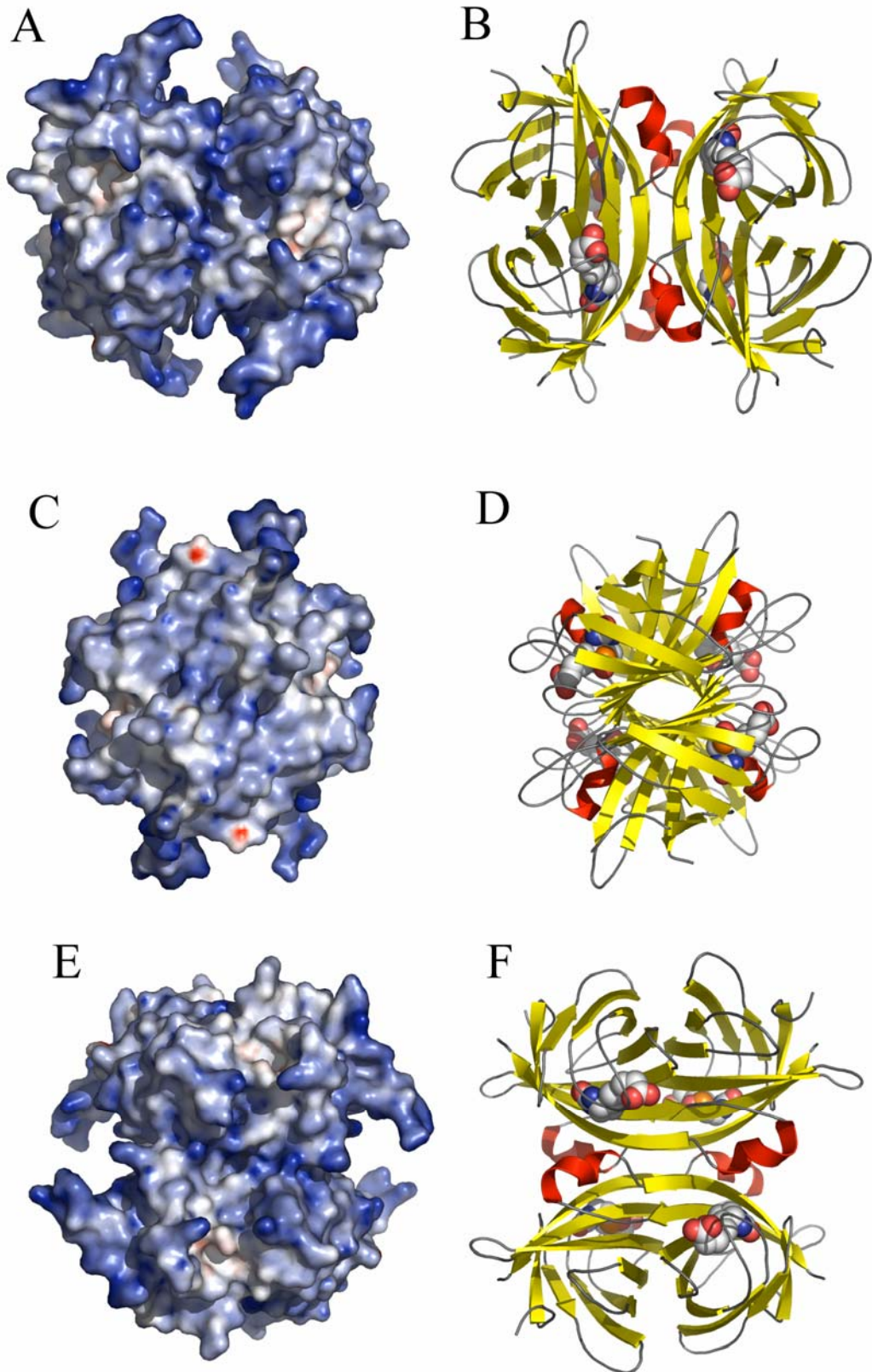
Liuos/Reagenssi	Sisältö	Valmistaja
SDS (10 %)	10g SDS:a 100 ml:aan vettä Lämmitetään 68 °C ja säädetään pH 7,2:een 0,1 M HCl:lla.	
SDS-PAGE alageeli	1,8 ml H <sub>2</sub> O 1,9 ml ajogeelipuskuri 3,75 ml 30 % akryyliamidi 75 µl 10 % SDS 75 µl 10 % ammoniumpersulfaatti 3,75 µl TEMED	
SDS-PAGE- näytepuskuri	2,5 ml ylägeelipuskuria (0,5 M Tris- HCl pH 6,8) 4,0 ml 10 % SDS 2,0 ml glyseroli 0,2 ml 0,2 % bromifenolisininen 0,3 ml H <sub>2</sub> O 1,0 ml 2-merkapttoetanoli	
SDS-PAGE ylägeeli	3,05 ml H <sub>2</sub> O 1,25 ml ylägeelipuskuri 0,65 ml 30 % akryyliamidi 50 µl 10 % SDS 30 µl 10 % ammoniumpersulfaatti 5 µl TEMED	
TBS-puskuri	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 M NaCl	
TBS-Tween	1000 ml TBS-puskuria 2,0 ml Tween 20	
TEMED	N, N, N', N' – tetrametyylietyleeniamiini	Bio-Rad
Triton X-100		Sigma
Trizma-emäs	Trizma® base C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma
Väripoistoliuos	800 ml metanoli 200 ml etikkahappo 1000 ml H <sub>2</sub> O	
Ylägeelipuskuri	6,0 g Trizma-emästä liuotetaan 40 ml:aan vettä. Säädetään pH 6,8:aan 1 M suolahapolla. Lisätään vettä, kunnes tilavuus 100 ml.	



Bakteerisoluissa tuotetun BBP-A:n geelisuodatuksen elutiogrammi pH:ssa 4. Tetrameerimuodon piikin (33 minuutin kohdalla) lisäksi elutiogrammissa näkyy pieni monomeerisestä proteiinista aiheutuva ”olkapää”.



Bakteerisoluissa tuotetun BBP-A:n geelisuodatuksen elutiogrammi pH:ssa 11. Tetrameerimuodon piikki näkyy 30 minuutin kohdalla.



Kuva BBP-A:n röntgenkristallografisesti 1,75 Å:n resoluutiolla määritetystä tetrameerirakenteesta.<sup>67</sup> Elektrostaattinen pintapotentiaali (A) ja nauha-malli, jossa sitoutunut biotiinisulfoksidi esitetty pallomallina (B). A- ja B-kohdan rakennetta on kierretty 90° y-akselin ympäri (C–D) ja –90° z-akselin ympäri (E–F). Kuvat on valmistettu PyMOL-ohjelmalla (<http://www.pymol.org>) ja käsitelty Corel Daw11-ohjelmistolla. Kuvat Tomi Airene.