

Peptidoglykaanihydrolaasin siirtymätila- analogin synteesi

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

1.7.2023

Eveliina Kankkunen

TIIVISTELMÄ

Tutkielmassa tutustutaan bakteerien rakenteeseen ja niiden kasvuun ja hajoamiseen vaikuttaviin tekijöihin. Aluksi perehdytään peptidoglykaanin rakenteeseen ja synteesiin, minkä jälkeen käsitellään peptidoglykaania hajottavia entsyymejä eli peptidoglykaanihydrolaaseja ja antibiootteja. Lopuksi tutustutaan siirtymätila-analogeihin, niiden suunnitteluun ja käyttömahdollisuuksiin. Siirtymätila-analogien avulla voidaan tutkia entsyymien reaktiomekanismeja ja substraatin sitoutumiseen osallistuvia aminohappoja. Lisäksi niiden pohjalta on onnistuttu kehittämään inhibiittoreita erilaisille entsyymeille, ja tulevaisuudessa mahdollisesti uusia antibiootteja.

Kokeellisessa osassa tarkoituksena oli valmistaa siirtymätila-analogi lysostafiini entsyymin substraatin sitoutumistutkimuksia varten. Työssä käytettiin lähtöaineina kahta aiemmin valmistettua yhdistettä. Synteesi ei kuitenkaan onnistunut, vaan suurimmaksi osaksi reaktiokolvista löytyi liuottimena käytettyä *N*-metyylimorfoliinia ja mahdollisesti sen suolaa *N*-metyylimorfolinium kloridia.

ESIPUHE

Pro gradu -tutkielma tehtiin 2022 syksyn ja 2023 kevään aikana Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella. Työn ohjaajina olivat professori Perttu Permi ja dosentti Elina Sievänen. Työhön liittyvä kirjallisuus löytyi pääosin Jyväskylän yliopiston kirjaston e-kirjoista tai verkkosivujen kansainvälisten artikkelien haulla.

Erityiset kiitokset haluan osoittaa työn ohjaajille mielenkiintoisesta aiheesta ja avusta työn aikana. Lisäksi kiitos kuuluu perheelleni kannustuksesta ja tuesta, ja opiskelukavereille vertaistuesta.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	iii
ESIPUHE	iv
SISÄLLYSLUETTELO	v
LYHENTEET	vii
1 JOHDANTO	1
2 BAKTEERIEN PEPTIDOGLYKAANI.....	2
3 PEPTIDOGLYKAANIN SYNTEESIN SÄÄTELY JA RAJOITTAMINEN	7
3.1 Entsyymit	7
3.2 Peptidoglykaanin biosynteesi.....	8
3.3 Peptidoglykaanihydrolaasit	10
3.3.1 Lysostafiini	11
3.4 Antibiootit	13
3.4.1 Antibioottien kehitys.....	17
4 PEPTIDOGLYKAANIEN ANALYYSIMENETELMIÄ.....	19
4.1 Lämpäiselektronimikroskopia	19
4.2 Atomivoimamikroskopia.....	20
4.3 Röntgenkristallografia.....	21
4.4 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	22
4.5 Massaspektrometria.....	22
4.6 NMR-spektroskopia	23
5 SIIRTYMÄTILA-ANALOGIT	25
5.1 Siirtymätila-analogien suunnittelu	26
5.2 Siirtymätila-analogien sovelluskohteita	28
5.3 Sitoutumistutkimukset.....	34

6	TYÖN TARKOITUS.....	37
7	KÄYTETYT LAITTEET JA REAGENSIT	38
8	TYÖN TOTEUTUS.....	40
8.1	Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus	41
8.2	Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja <i>N</i> -akryloyylylglysiinaatin Michael-additio.....	41
8.3	Tetraglysiinihypofosforihapokkeen valmistus	42
8.4	Liukenemattoman sakan käsittely	43
9	TYÖN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	44
9.1	Lähtöaineiden (3 ja 2) tarkistus	44
9.2	Suojattu aminometyylihypofosforihapoke (1)	45
9.3	Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen (1) ja <i>N</i> -akryloyylylglysiinaatin (3) Michael-additio	45
9.4	Tetraglysiinihypofosforihapoke (5).....	46
9.5	Liukenematon sakka.....	47
10	YHTEENVETO	50
11	SYNTEESIOHJEET	52
11.1	Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus	52
11.2	<i>N</i> -akryloyylylglysiinaatin esteröinti	52
11.3	Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja <i>N</i> -akryloyylylglysiinaatin Michael-additio.....	53
11.4	Tetraglysiinihypofosforihapokkeen valmistus	54
11.5	Liukenemattoman sakan käsittely	55
	KIRJALLISUUSLUETTELO	57
	LIITTEET	62

LYHENTEET

AFM	atomivoimamikroskopia
BATSI	boorihapon siirtymätila-analogi inhibiittori
CAP	kovalenttisesti sitoutuneet proteiinit
CAT	katalyyttinen domeeni
CBD	soluseinän sitova domeeni (<i>cell-wall binding domain</i>)
Cbz-Gly-OH	<i>N</i> -bentsyylioksykarbonyyliyglysiini
CPB	karboksipeptidaasi B
CWT	soluseinän sitova domeeni (<i>cell-wall targeting domain</i>)
D-Ala	D-alaniini
DFT	tiheysfunktionaaliteoria
D-Glu	D-glutamaatti
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	[(2 <i>S</i> ,3' <i>S</i>)-{[(3'-amino-3'-karboksipropyli)-hydroksifosfinoyli]metyyli}-
EPE	pentaanidihappo
FBDD	fragmentteihin perustuva lääkeainesuunnittelu
FRET	fluoresenssienergian siirtotesti
GCPII	glutamaattikarboksipeptidaasi II
GlcNAc	<i>N</i> -asetyyliyglukosamiini
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HTS	korkean suorituskyvyn seulonta
IMP	integraalinen kalvoproteiini
ITC	isoterminen titrauskalorimetria
KIE	kineettinen isotooppiefekti

L-Ala	L-alaniini
LFER	lineaarisen Gibbsin vapaan energian suhteet
LP	lipoproteiini
LPS	lipopolysakkaridi
LTA	lipoteikkohappo
LU	kytkentäyksikkö
MD	molekyylidynamiikka
mDAP	meso-diaminopimelaatti
MS	massaspektrometria
MurNAc	<i>N</i> -asetyylimuramiinihappo
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
OMP	ulkokalvon proteiini
PBP	penisilliiniä sitova proteiini
PDB	Protein Data Bank
PNP	puriininukleosidifosforylaasi
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAR	rakenne-aktiivisuussuhde
SBDD	rakenteeseen perustuva lääkesuunnittelu
SP	pintapolymeeri
TEM	läpäisyelektronimikroskopia
TGaasi	transglykosylaasi
TPaasi	transpeptidaasi
TSAD	siirtymätila-analogi suunnittelu
UDP	uridiinidifosfaatti
UndPP	undekaprenyylipyrofosfaatti

UTP	uridiinitrifosfaatti
WTA	seinän teikkohappo

1 JOHDANTO

Tämän tutkielman tarkoituksena on tutustua entsyymien toiminnan tutkimiseen siirtymätila-analogien avulla. Kirjallisessa osuudessa perehdytään bakteerien peptidoglykaaniin ja sen kasvuun vaikuttaviin tekijöihin. Erityisesti perehdytään peptidoglykaania hajottaviin entsyymeihin ja antibiootteihin. Lisäksi tutustutaan siirtymätila-analogeihin, niiden tutkimiseen ja käyttömahdollisuuksiin. Työosuudessa tarkoituksena oli syntetisoida kahdesta valmiista lähtöaineesta siirtymätila-analogi, jonka avulla voitaisiin tutkia substraatin sitoutumista lysostafiini-entsyymiin.

Laaja antibioottien käyttö on johtanut antibioottiresistenttien bakteerien muodostumiseen. Tämän seurauksena tutkimus uusien antibioottien kehittämiseksi on tärkeää. Bakteereille spesifisten antibioottien kehittämistä auttaa bakteerien rakenteiden ja synteesien tunteminen. Erityisesti bakteerien soluseinän peptidoglykaanin synteesi ja sitä edistävät entsyymit ovat olleet tutkimuksien kohteina. Koska nisäkässolut eivät sisällä soluseinää, bakteerien soluseinän synteesiin osallistuvat entsyymit ovat bakteereille ominaisia, joten ne ovat hyviä antibioottien kohteita.

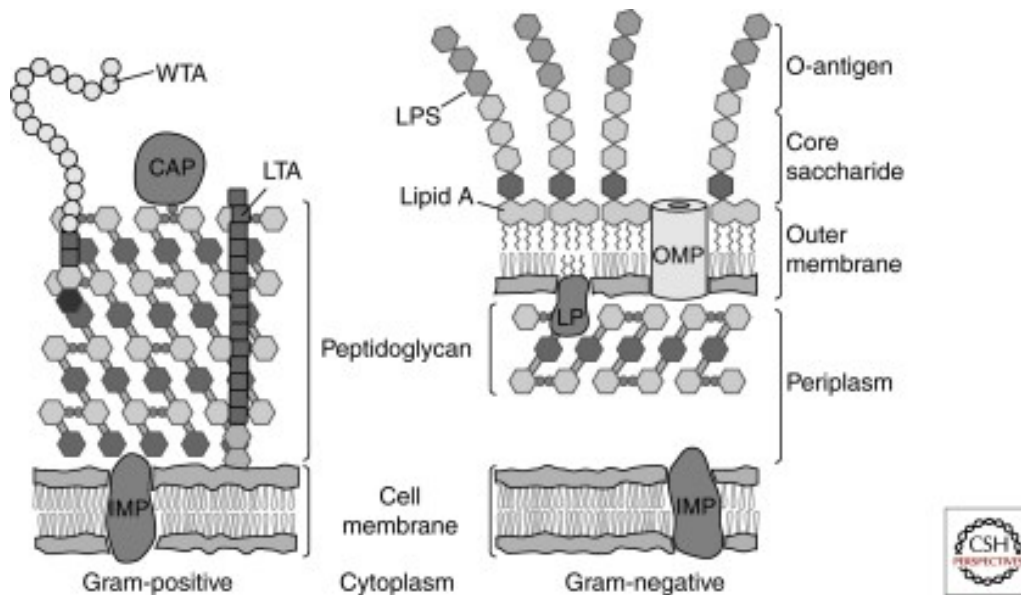
Monet antibiootit toimivat entsyymien inhibiittoreina, joko sitoutumalla substraattiin tai entsyymiin estäen synteesin etenemisen. Entsyymiin sitoutuvat inhibiittorit on usein suunniteltu jäljittelemään entsyymien substraatteja. On kuitenkin havaittu, että entsyymien katalysoimien reaktioiden siirtymätiloja jäljittelevät inhibiittorit sitoutuisivat entsyymiin substraatteja paremmin, minkä takia niin kutsuttuja siirtymätila-analogeja on alettu tutkia enemmän.

2 BAKTEERIEN PEPTIDOGLYKAANI

Bakteerien soluseinä on monimutkainen kokonaisuus. Sen tehtävänä on suojata solua samalla päästään läpi ravinteita solun ulkopuolelta ja poistaa jätteitä solun sisältä. Suuri osa soluseinän sytoplasmakalvoa ympäröivästä osiosta on peptidoglykaania. Peptidoglykaani koostuu glykaaniketjuista, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa peptidisivuketjujen avulla. Peptidoglykaanilla on useita tärkeitä tehtäviä, joista tärkein on kestää solun nestejännitystä. Lisäksi se antaa solulle muodon ja toimii alustana muille solukalvon osille, kuten proteiineille.^{1,2}

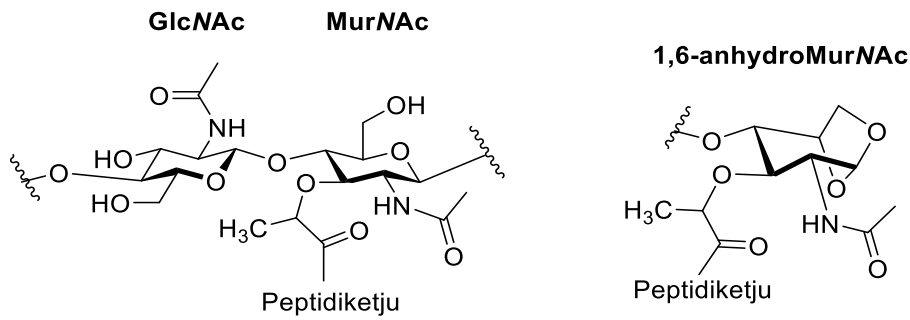
Gram-negatiiviset ja -positiiviset bakteerit eroavat toisistaan niiden soluseinän rakenteen perusteella. Gram-negatiivisilla bakteereilla on ohut muutaman nanometrin paksuinen peptidoglykaanista koostuva soluseinä. Sen ympärillä on vielä lipidi-kaksoiskerroksesta koostuva ulkokalvo, joka suojaa bakteeria esimerkiksi myrkyllisiltä yhdisteiltä. Ulkokalvo sisältää myös esimerkiksi lipopolysakkarideja (LPS) ja lipoproteiineja (LP).²

Gram-positiivisilla bakteereilla ei ole vastaavanlaista ulkokalvoa kuin gram-negatiivisilla bakteereilla, vaan niillä on paksu, 30–100 nanometrin paksuinen, peptidoglykaanikerros uloimpana kerroksena. Kerros sisältää myös pitkiä polymeerejä, teikkohappoja, joihin kuuluu seinän teikkohapot (*wall teichoic acids*, WTA) ja lipoteikkohapot (*lipoteichoic acids*, LTA). Näistä WTA:t ovat kiinnittyneet kovalenttisesti peptidoglykaaniin ja LTA:t solukalvon lipideihin. Teikkohapot vaikuttavat paljon gram-positiivisen bakteerin soluseinän muotoon ja toimintaan. Gram-positiiviset bakteerit sisältävät myös erilaisia proteiineja, joiden koostumus vaihtelee kasvuolosuhteiden ja ympäristön vaikutuksien perusteella. Gram-positiivisten ja -negatiivisten bakteerien rakenteelliset erot on havainnollistettu kuvassa 1.^{2,3}



Kuva 1. Gram-negatiivisen ja -positiivisen solun rakenteet. CAP = kovalenttisesti sitoutuneet proteiinit; IMP = integraaliset kalvoproteiinit (integral membrane proteins); LP = lipoproteiinit; LPS = lipopolysakkaridit; LTA = lipoteikkohapot; OMP = ulkokalvon proteiinit; WTA = seinän teikkohapot.²

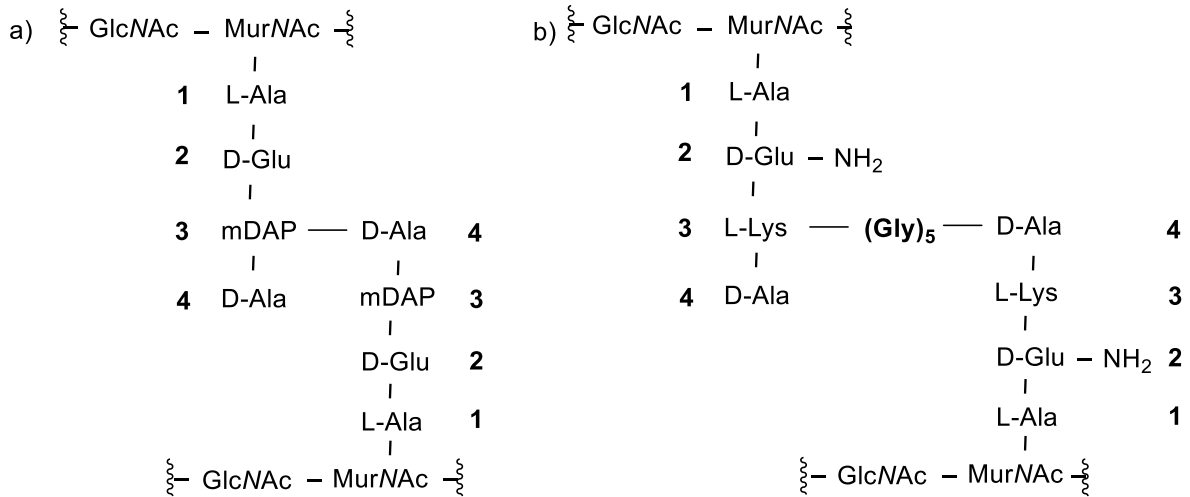
Glykaaniketju koostuu *N*-asetyyli-glukosamiinista (GlcNAc) ja *N*-asetyyli-muramiinihaposta (MurNAc), jotka ovat sitoutuneet toisiinsa β -(1-4)-glykosididoksin. Glykaaniketju loppuu gram-positiivisilla bakteereilla pääasiassa MurNAc- tai GlcNAc-yksikön muodostamaan pelkistävään päähän. Gram-negatiivisilla bakteereilla ja osalla gram-positiivisista bakteereista ei kuitenkaan ole vastaavaa pelkistävää päätä, vaan ketju päättyy MurNAc-yksikön C1- ja C6-hiilien väliseen molekyyllinsisäiseen renkaaseen. Sitä kutsutaan 1,6-anhydroMurNAc-yksiköksi. Bakteerin glykaaniketjua pilkkovien entsyymien aktiivisuus vaikuttaa siihen, millaisia pääteryhmiä peptidoglykaani sisältää.¹ Kuvassa 2 on esitetty GlcNAc ja MurNAc perusrakenteet ja 1,6-anhydroMurNAc-yksikön rakenne.



Kuva 2. GlcNAc-, MurNAc- ja 1,6-anhydroMurNAc-yksiköiden rakenteet.

MurNAc-yksikön D-laktoyyli-ryhmä on korvautunut peptidiketjulla, joka on kahdesta viiteen aminohappoa pitkä.^{1,4} Peptidiketjun kaksi ensimmäistä aminohappoa ovat useimmiten L-alaniini (L-Ala) ja D-glutamaatti (D-Glu), ja neljäntenä ja viidentenä on dipeptidinä lisätty D-alaniini (D-Ala). Kolmannessa aminohapossa on havaittu eniten vaihtelua. Gram-positiivisilla kolmas peptidi on usein L-lysiini (L-Lys) ja gram-negatiivisilla mesodiaminopimelaatti (mDAP). Osassa gram-positiivisista bakteereista, kuten *Bacillus*, kolmas aminohappo voi olla gram-negatiivisessäkin bakteerissa esiintyvä mDAP. Joillakin lajeilla on havaittu vaihtelua myös ensimmäisessä ja viidennessä aminohapossa. Ensimmäinen aminohappo, L-Ala, voi korvautua osittain tai kokonaan glysiinillä tai seriinillä, ja viides aminohappo, D-Ala, voi korvautua D-laktaatilla tai D-seriinillä.¹

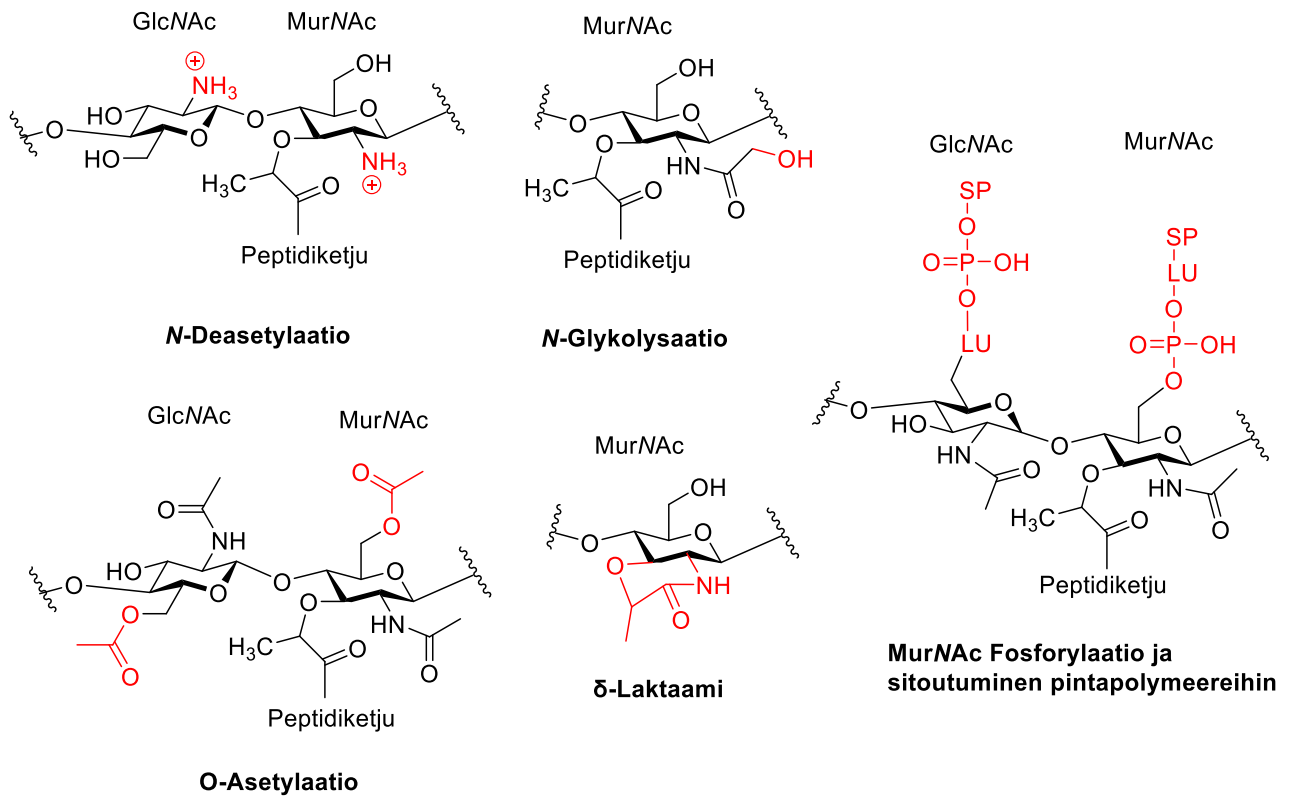
Peptidiketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa suoraan tai ristisilloilla. Gram-negatiivisten bakteerien peptidit ovat usein kiinnittyneet toisiinsa suoralla sidoksella, kun taas gram-positiivisten bakteerien peptidit ristisillalla. Sidos muodostuu usein kolmannessa asemassa olevan peptidiyksikön aminoryhmän ja neljännessä asemassa olevan D-Ala karboksyyli-ryhmän välille (3–4-ristisilta). Joissakin tapauksissa sidos voi muodostua myös kolmansissa asemassa olevien peptidiyksiköiden välille (3–3-ristisilta). Peptidiristisillan pituus on yhdestä seitsemään aminohappoa, ja se voi koostua esimerkiksi viidestä glysiinistä, kahdesta L-alaniinista tai se voi olla kokonaan erillinen peptidiketju. Kuvassa 3 on esitetty *Escherichia coli* (*E. coli*) ja *Staphylococcus aureuksen* (*S. aureus*) peptidoglykaanien perusrakenteet. *E. coli* peptidiketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa suoralla sidoksella ja *S. aureuksen* pentaglysiini-ristisillalla.¹



Kuva 3. Peptidoglykaanin perusrakenne a) *E. coli* ja b) *S. aureus*.

Peptidiketjujen erilaisten sitoutumistapojen lisäksi bakteereilla vaihtelee niiden sitoutumisaste, eli ristosidosten määrä. Sitoutumisaste vaihtelee noin 20 prosentista yli 90 prosenttiin, josta *E. coli*n sitoutumisaste on yksi matalimmista ja *S. aureuksen* yksi korkeimmista. Tämä tarkoittaa, että *E. coli*n peptidoglykaaniyksiköistä suurin osa on mono- ja dimeereinä, mutta *S. aureuksen* peptidoglykaaniyksiköt ovat suurimmaksi osaksi oligomeereinä. Peptidoglykaanikerroksen paksuus ei kuitenkaan korreloi ketjujen pituuksien kanssa, vaan lyhyitä ja pitkiä peptidoglykaaniketjuja löytyy sekä gram-negatiivisista että gram-positiivisista lajeista, vaikka gram-positiivisilla lajeilla peptidoglykaanikerros on paksumpi.¹

Peptidoglykaanin rakenteessa voi tapahtua muutoksia kypsymisen ja uudistumisen aikana entsyymien vaikutuksesta ja mutaatioiden kautta. Glykaaniketjussa tapahtuvia mahdollisia muutoksia ovat sokerien O-asetylaatio, N-deasetylaatio tai peptidi substituenttien puuttuminen ja MurNAc:n korvautuminen sen N-glykolyyli johdannaisella. MurNAc-yksikön hydroksyyli ryhmä voi myös fosforyloitua, minkä avulla peptidoglykaani pystyy sitoutumaan bakteerin soluseinän polymeereihin. Myös GlcNAc voi sitoutua polymeereihin, mutta sidos eroaa hieman MurNAc-yksikön muodostamasta sidoksesta.^{1,4,5} Lisäksi MurNAc-yksikön kolmannessa asemassa olevan karboksyyli ryhmän ja toisessa asemassa olevan aminoryhmän välille voi muodostua molekyyllinsisäinen amidisidos, jota kutsutaan δ -laktaami MurNAc-yksiköksi.⁵ Mahdolliset muutokset glykaaniketjussa on esitetty kuvassa 4. Muutokset tapahtuvat pääasiassa polymerisoituneessa peptidoglykaanissa, mutta MurNAc-yksikön N-glykolysaation on havaittu tapahtuvan jo prekursorien synteesin aikana.⁵



Kuva 4. Peptidoglykaaniketjun mahdollisia muutoksia merkitty punaisella. LU = kytkentäyksikkö (*linkage unit*) ja SP = pintapolymeeri (*surface polymer*).

3 PEPTIDOGLYKAANIN SYNTEESIN SÄÄTELY JA RAJOITTAMINEN

Bakteerien peptidoglykaaniin kohdistuu dynaamisia muutoksia glykaaniketjujen, peptidiketjujen ja ristosidosten katketessa ja muodostuessa uudelleen entsyymien katalysoimana. Sidosten katkeaminen ja uudelleen muodostuminen ovat edellytyksenä peptidoglykaanin kasvulle ja uudistumiselle, jota kutsutaan myös kypsymiseksi. Sidoksia katkovat useat erilaiset peptidoglykaanihydrolaasit. Hydrolaasit ovat siis solun kasvulle välttämättömiä, sillä ne mahdollistavat uusien syntetisoitujen rakenneosien liittämisen jo olemassa olevaan peptidoglykaaniin. Sidosten katketessa irtoavat fragmentit pääasiassa kierrätetään ja hyödynnetään uuden peptidoglykaanin valmistuksessa.⁴

Soluseinä ei ole muuttumaton kokonaisuus, vaan se sisältää jatkuvasti tasapainon peptidoglykaanin synteesin ja hydrolyysin välillä. Siksi biosynteesin aikana tapahtuvat häiriöt voivat johtaa solun hajoamiseen. Häiriöitä synteesissä voivat aiheuttaa esimerkiksi antibiootit. Solun hajoaminen antibioottien vaikutuksesta johtuu siitä, että peptidoglykaanin synteesi estyy, mutta hydrolyysi jatkuu. Antibioottien tehoa kuitenkin heikentää se, että monet bakteerit ovat onnistuneet kehittämään antibioottiresistenssin uusien geenien ja mutaatioiden avulla.^{3,4,6}

3.1 Entsyymit

Entsyymit ovat proteiinipolymeerejä, jotka ovat pääosin erilaisia kokonaisuuksia luonnossa esiintyvistä 20 aminohaposta. Aminohappojen lisäksi entsyymit voivat sisältää pienimolekyylisiä orgaanisia kofaktoreita ja metalli-ioneja. Entsyymit voivat olla yksinkertaisia ja koostua vain yhdestä domeenista, tai erittäin laajoja ja koostua useasta erilaisesta osasta ja rakenteellisesta domeenista. Entsyymien domeenit voivat olla katalyyttisiä tai ei-katalyyttisiä sekä sitovia.⁷

Entsyymien tehtävänä on katalysoida biologisia reaktioita fysiologisissa olosuhteissa. Kuten muutkin katalyytit, entsyymit helpottavat reaktioiden korkeenergisten siirtymätilojen saavuttamista, jolloin reaktio etenee nopeammin. Siirtymätilan saavuttamista edistää esimerkiksi siirtymätilan tiukka sitoutuminen entsyymiin, mikä stabiloi epävakaa tilaa ja tekee reaktiosta suotuisamman.⁷⁻⁹ Reaktioiden katalysoinnin lisäksi entsyymit vastaavat

ihmiskehossa erilaisten kemikaalien ja epäpuhtauksien talteenotosta, synteisistä ja hajottamisesta.⁷

Entsyymit ovat oleellinen osa myös peptidoglykaanien biosynteesissä, johon osallistuu useita erilaisia entsyymejä, joilla on tarkat tehtävät. Esimerkiksi pelkästään sytoplasmassa tapahtuvan synteisin, jossa uridiinidifosfaattiin liittynyt GlcNAc (UDP-GlcNAc) muutetaan UDP-MurNAc-pentapeptidiksi, aikana on mukana muun muassa MurA-, MurB-, MurC-, MurD-, MurE- ja MurF-entsyymit.⁴ Koska entsyymit mahdollistavat useita välttämättömiä reaktioita bakteerien biosynteesissä, ne ovat hyvä kohde erilaisille lääkeaineille, kuten antibiooteille.⁷

3.2 Peptidoglykaanin biosynteesi

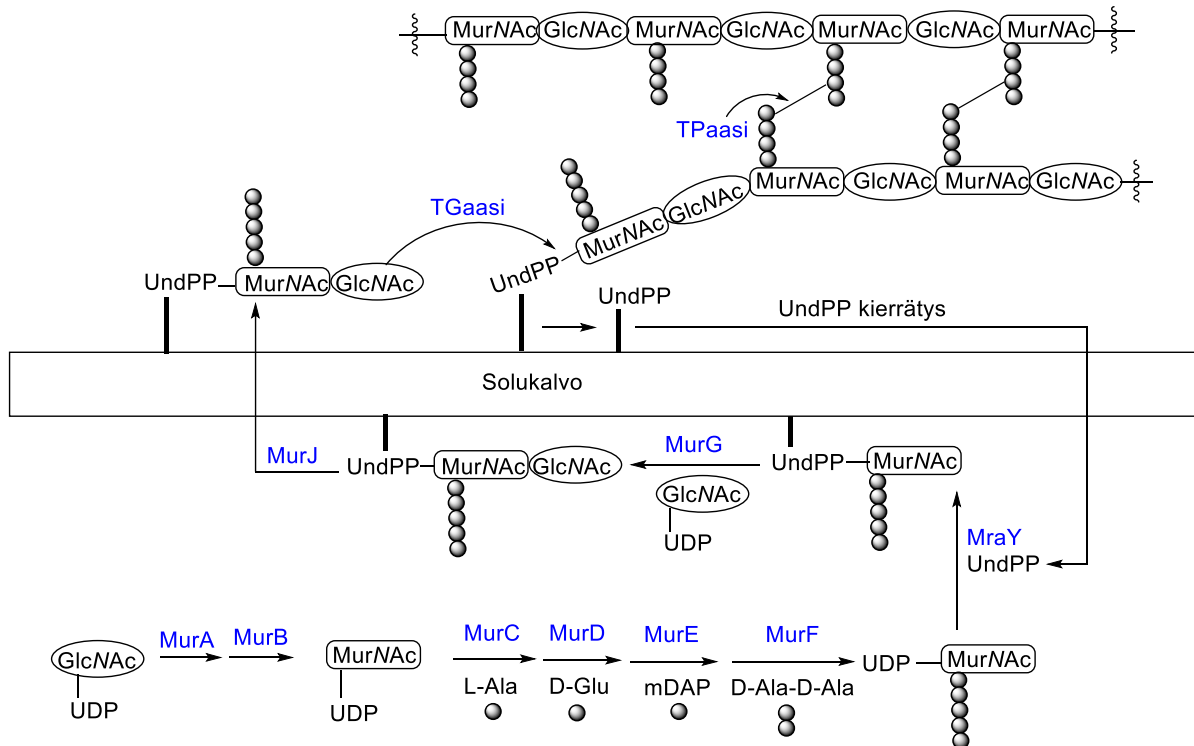
Peptidoglykaanin biosynteesi tapahtuu usean välivaiheen kautta sytoplasmassa, sisäkalvolla ja periplasmassa. Ensin sytoplasmassa muodostuvat nukleotidiaktivoidut sokerit ja aminohapot, jotka muodostavat sisäkalvon pinnalla monomeeriprekursoreita. Prekursorien muodostumisen jälkeen ne siirtyvät sisäkalvon läpi periplasmaan, jossa monomeerit polymerisoituvat muodostaen glykaaniketjuja, jotka edelleen sitoutuvat toisiinsa peptidirisistisilloin.⁴

Yksityiskohtaisemmin synteesi alkaa sytoplasmassa UDP-GlcNAc:n muodostumisella fruktoosi-6-fosfaatista, L-glutamiinista ja uridiinitrifosfaatista (UTP) entsyymien GlmS, GlmM ja GlmU avustuksella. Tämän jälkeen MurA- ja MurB-entsyymit muuntavat UDP-GlcNAc:n ja fosfoenolipuryvaatin UDP-MurNAc:ksi. Usean eri Mur-entsyymin katalysoiman reaktion avulla peptidiketjun aminohapot liitetään UDP-MurNAc:iin, jolloin muodostuu UDP-MurNAc-pentapeptidi. Seuraavassa synteesivaiheessa entsyymi MraY katalysoi reaktiota, jossa UDP-MurNAc-pentapeptidi kiinnittyy defosforyloituun sisäkalvon lipidikantajaan (*lipid carrier*), undekaprenyylipyrofosfaattiin (UndPP), muodostaen lipidi I:n. Tämän jälkeen UDP-GlcNAc yksikkö liitetään lipidi I:n MurNAc yksikköön MurG-entsyymin vaikutuksesta, jolloin muodostuu UndPP-GlcNAc-MurNAc-pentapeptidi eli lipidi II.⁴

Lipidi II:n muodostumisen jälkeen se kuljetetaan periplasmaan, jossa sen polymerisoituminen tapahtuu disakkaridien transglykosylaation ja peptidiketjujen transpeptidaation kautta. Polymerisoitumisen aikana UndPP irtoaa ja palautuu sytoplasmaan uutta lipidin siirtoa varten. Uusien syntetisoitujen peptidoglykaaniketjujen liittäminen olemassa olevaan ketjuun vaatii

peptidoglykaanin sidoksien katkeamisen. Sidoksia katkovat erilaiset peptidoglykaanihydrolaasit, minkä jälkeen transglykosylaasit (TGaasi) ja transpeptidaasit (TPaasi) luovat uusia sidoksia sokeryyksiköiden ja peptidiketjujen välille.^{1,4} Sidoksien katketessa vapautuvia peptidoglykaaniketjun osia kutsutaan muropeptideiksi, ja suurin osa niistä kierrätetään soluseinän synteesin uusiksi lähtöaineiksi.^{4,10} Kuvassa 5 on esitetty havainnollistava kuva biosynteesin vaiheista.

Synteesin jälkeen uusi peptidoglykaani käy läpi vielä erilaisia muutoksia yhtenäisen ja joustavan soluseinän muodostamiseksi, joista sokerosan mahdollisia muutoksia esitettiin jo kuvassa 4. Lisäksi peptidiketjun lyhentyminen, sitoutumisasteen muuttuminen ja aminohappojen vaihtuminen ovat mahdollisia muutoksia. Peptidiketjun lyhentyminen tarkoittaa esimerkiksi D-Ala-D-Ala-päätteisen pentapeptidin lyhentymistä D-Ala-päätteiseksi tetrapeptidiksi. Myös 4–3-ristisidoksen vaihtuminen 3–3-ristisidokseksi on mahdollinen muutos peptidoglykaanin uudistumisen aikana tai ulkoisen kuormituksen vaikutuksesta.^{1,4}

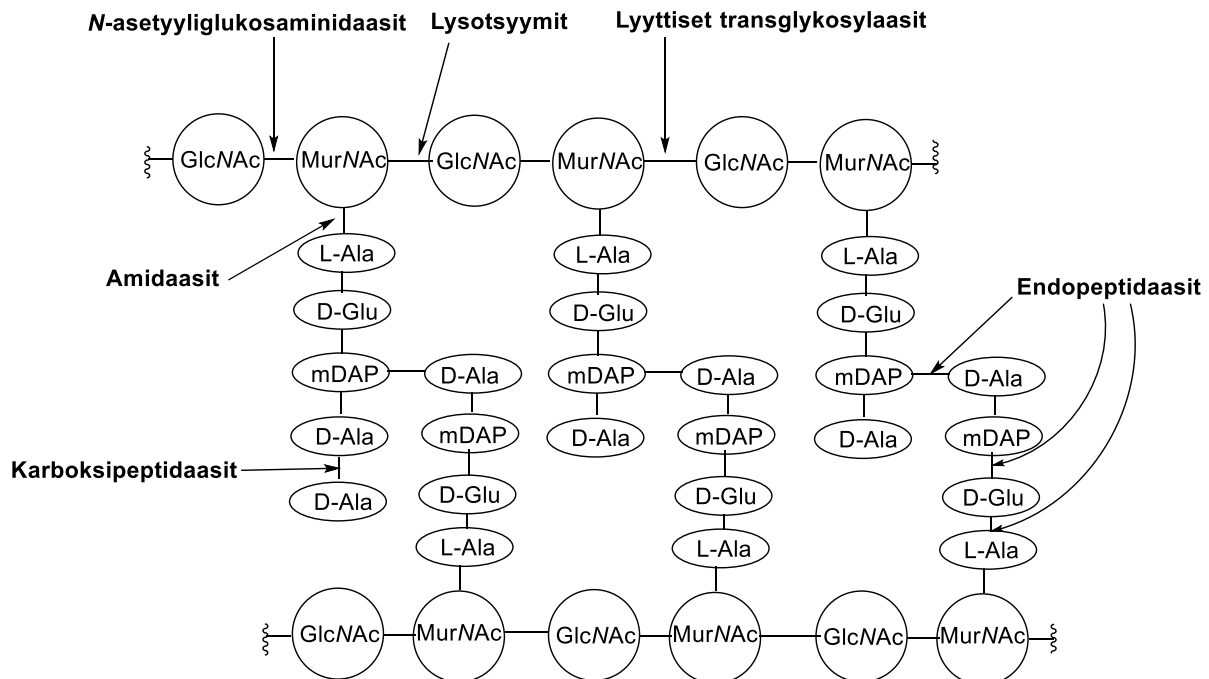


Kuva 5. Biosynteesin vaiheet UDP-GlcNAc:sta peptidoglykaaniksi. Sinisellä on merkitty biosynteesin vaiheisiin osallistuvat entsyymit.

3.3 Peptidoglykaanihydrolaasit

Peptidoglykaanihydrolaasit ovat entsyymejä, jotka hajottavat peptidoglykaaniketjujen sidoksia sekä polymeerisessä peptidoglykaanissa että sen liukoisissa osissa. Niillä on tärkeä osa bakteerien soluseinän kasvussa ja säätelyssä, mutta huonosti säädeltyinä ne voivat aiheuttaa myös soluseinän hajoamisen. Lisäksi hydrolaasit osallistuvat solunjakautumiseen tytärsolujen erottuessa, ja poistavat vahingoittuneita soluja hajottamalla ne. Jokaisella hydrolaasilla on tarkat tehtävät, mutta kaikkia niitä on ollut vaikea määrittää, sillä bakteerit sisältävät suuren määrän erilaisia hydrolaaseja, ja yhdellä hydrolaasilla voi olla useita tehtäviä.^{11,12}

Peptidoglykaanihydrolaasit voidaan jakaa glykosidaaseihin, amidaaseihin ja peptidaaseihin. Näistä glykosidaasit katkovat glykaanin pääketjua, amidaasit katkovat sidoksia peptidin ja sokerin väliltä, ja peptidaasit katkovat aminohappojen välisiä sidoksia peptidiketjussa.¹¹ Hydrolaasit jakautuvat alaryhmiin tarkemman pilkkomiskohdan mukaan. Esimerkiksi peptidaasit jakautuvat karboksi- ja endopeptidaaseihin, ja glykosidaasit *N*-asetyyli-glukosaminidaaseihin, lysotsyymeihin ja lyyttisiin transglykosylaaseihin. Näistä kaksi viimeisempää katkovat samaa sidosta, mutta reaktiomekanismit ovat erilaiset.¹² Eri hydrolaasien pilkkomiskohdat peptidoglykaanissa on havainnollistettu kuvassa 6.



Kuva 6. Eri peptidoglykaanihydrolaasien pilkkomiskohdat.

Odottamattoman solulyysin, eli solun hajoamisen ehkäisemiseksi, hydrolaasien tulee olla bakteereissa hyvin säädeltyjä. Bakteerit voivat säädellä hydrolaasien aktiivisuutta esimerkiksi pH:n avulla, sillä matala pH inhiboi bakteerin hajoamista. Lisäksi soluseinän polymeerit, kuten teikkohapot, rajoittavat hydrolaasien toimintaa gram-positiivissa bakteereissa. Monissa tapauksissa ei kuitenkaan osata vielä sanoa, mikä estää hydrolaaseja hajottamasta bakteerisoluja normaaleissa olosuhteissa.¹²

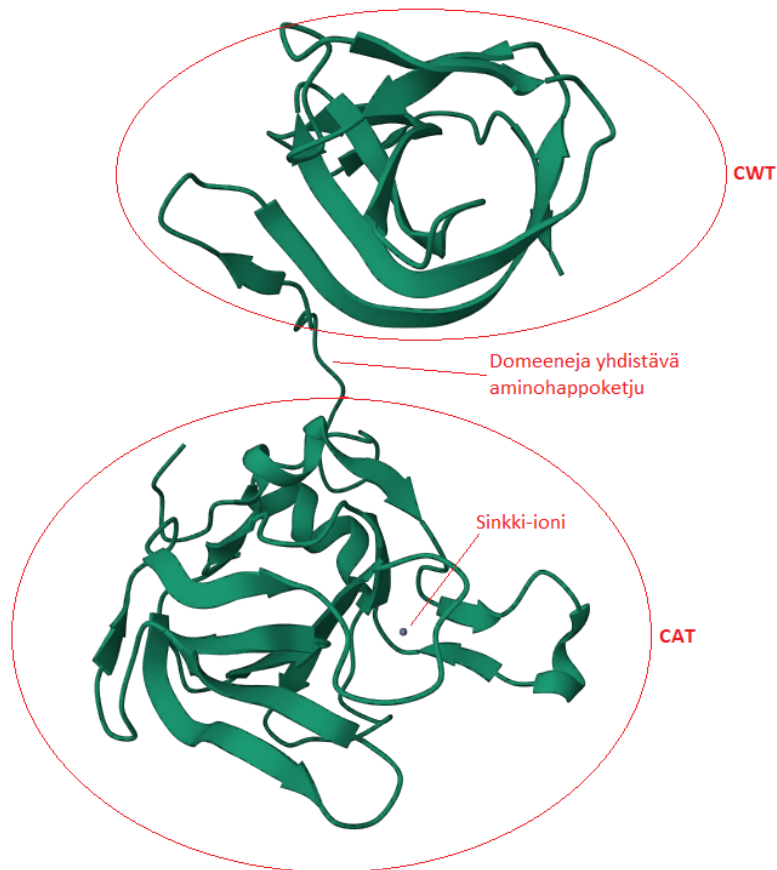
Entsyymeinä peptidoglykaanihydrolaasit sisältävät erilaisia domeeneja. Katalyyttisen domeenin lisäksi useat peptidoglykaanihydrolaasit sisältävät soluseinän sitovan domeenin (*cell-wall binding domain*, CBD), joka parantaa substraatin sitoutumista ja lisää siten katalyyttistä aktiivisuutta. Tällaisia domeenien luokkia ovat esimerkiksi SH3-domeenit, FtsN-peptidoglykaania sitovat domeenit, ja LysM CBD:t.¹²

3.3.1 Lysostafiini

Lysostafiini on yksi paljon tutkituista peptidoglykaanihydrolaaseista. Se on sinkkiä sisältävä metalloendopeptidaasi-entsyymi, jota tuottavat *Staphylococcus simulans*-suvun bakteerit, ja joka pystyy pilkkomaan *Staphylococci*-suvun bakteerien peptidoglykaaniketjua. Lysostafiini katkoo peptidoglykaanin pentaglysiinisiltaa useimmiten kolmannen ja neljännen glysiinin väliltä.^{11,13,14}

Lysostafiini koostuu 246 aminohaposta, ja se sisältää N-terminaalisen peptidaasi-domeenin ja C-terminaalisen domeenin, jotka ovat yhteydessä toisiinsa 14 aminohapon ketjulla. N-terminaalinen domeeni vastaa lysostafiinin katalyyttisestä aktiivisuudesta (*catalytic domain*, CAT) ja C-terminaalinen domeeni osallistuu substraatin sitomiseen (*cell-wall targeting domain*, CWT). Lysostafiinin CWT kuuluu SH3-domeenien luokkaan.^{14,15}

Lysostafiinin teho *Staphylococci*-suvun bakteereja vastaan johtuu siitä, että sen aktiivinen alue tunnistaa pentaglysiini-ristisillat. Lisäksi peptidiketjun tunnistaminen ja sitoutuminen on lysostafiinin aktiivisuuden kannalta tärkeää, sillä tetrapeptidiketjun on todettu sitoutuvan paremmin lysostafiiniin kuin pentaglysiini-ristisillan.¹⁶ Kuvassa 7 on Protein Data Bank (PDB)-tietokannasta¹⁷ otettu kuva lysostafiinin rakenteesta (PDB ID: 5NMY), ja siihen on merkitty CAT- ja CWT-domeenit, niitä yhdistävä aminohappoketju ja katalyyttisen keskuksen sinkki-ioni.



Kuva 7. Lysostafiinin rakenne. Kuvaan on merkitty katalyyttinen domeeni (CAT), substraattia sitova domeeni (CWT), domeeneja yhdistävä aminohappoketju ja katalyyttisen keskuksen sinkki-ioni.

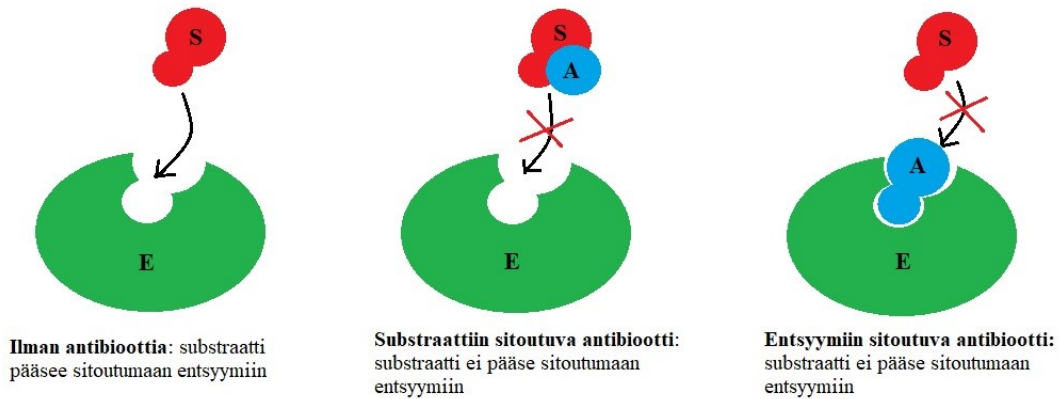
Lysostafiinia on tutkittu paljon, sillä sitä uskotaan voivan tulevaisuudessa käyttää potentiaalisena terapeuttisena aineena *S. aureuksen* aiheuttamien infektioiden hoidossa. Sen on todettu olevan tehokas sekä jakautuvia että ei-jakautuvia soluja vastaan. Lääkeaineiden kehitys lysostafiinista on kuitenkin haasteellista, sillä lysostafiinille resistenttejä *S. aureuksen* mutaatioita on jo havaittu.¹⁴ Tästä syystä esimerkiksi Grabowska *et al.*¹⁸ ovat tutkineet lysostafiinin ja sen kaltaisten entsyymien reaktiomekanismia ja substraattispesifisyyteen vaikuttavia tekijöitä. He ovat käyttäneet tutkimuksissa apuna siirtymätila-analogia, joka on esitetty tarkemmin luvussa 5.2. He uskovat, että tarkoin harkituilla substraattispesifisyyteen vaikuttavilla muutoksilla voitaisiin saada aikaan entsyymi, jolla on bakteriolyttinen vaikutus myös resistenttejä bakteerilajeja vastaan.

S. aureuksella mutaatiot johtuvat usein *femA*- tai *femB*-geenien muutoksista. FemA- ja FemB-entsyymit vastaavat glysiinien liittämistä pentaglysiini-ristisiltaan, joten niiden häiriöt johtavat lysostafiinille resistentteihin monoglysiini- tai tetraglysiini-ristisiltoihin. Mutaatiot voivat aiheuttaa myös sen, että osa glysiineistä on korvautunut seriinillä. Tällaista mutaatiota aiheuttaa *lif*-geeni, jolla on yhtäläisyyksiä FemA- ja FemB-entsyymien kanssa, mutta glysiinien sijaan *lif*-geenin vaikutuksesta ristosiltaan liittyy seriinejä.¹⁴ On myös havaittu, että seinän teikkohapot voivat Dlt-entsyymien vaikutuksesta muuntua niin, että negatiivisen varauksen sijaan niille syntyy positiivinen varaus. Positiivinen varaus aiheuttaa positiivisen varauksen omaavan lysostafiinin repulsiota, jolloin entsyymien ja substraatin välillä on vähemmän mahdollisia kontakteja.¹⁶

3.4 Antibiootit

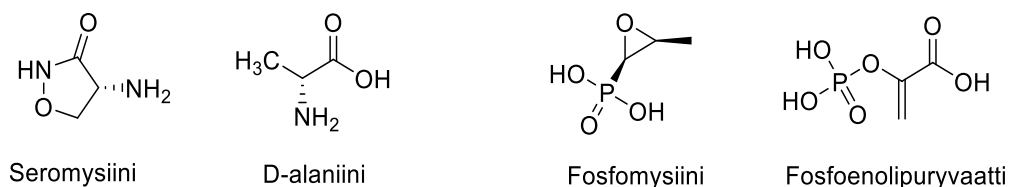
Antibiootit ovat lääkeaineita, jotka voivat toimia bakteereita tappavasti tai niiden lisääntymistä estämällä. Niiden toiminta voi kohdistua DNA:n kahdentumiseen, metabolisiin prosesseihin, proteiinien synteesiin tai soluseinän synteesiin. Näistä DNA:han ja proteiinisynteesiin kohdistuvien antibioottien selektiivisyys perustuu vain pieniin ribosomien eroihin prokaryoottien ja eukaryoottien välillä. Metabolisissa prosesseissa bakteerien ja ihmissolujen väliltä löytyy selkeämpiä eroja, kuten se, että bakteerit syntetisoivat foolihappoa, koska ne eivät pysty hyödyntämään ravinnosta saatavaa foolihappoa kuten nisäkkäät. Myös bakteerien soluseinän synteesi on sopiva kohde antibakteerisille aineille, sillä nisäkkäiden solut eivät sisällä soluseinää.³

Bakteerien soluseinän biosynteesiä estävät antibiootit voivat vaikuttaa sitoutumalla biosynteesin välituotteisiin, jolloin substraatit eivät pääse sitoutumaan entsyymeihin. Toinen vaihtoehto on, että antibiootti sitoutuu entsyymiin substraatin sijasta. Molemmissa vaihtoehdoissa antibiootti toimii inhibiittorina, joka estää entsyymien toiminnan, ja siten biosynteesin etenemisen.⁶ Kuvassa 8 on tiivistetty antibioottien toiminta entsyymejä vastaan.



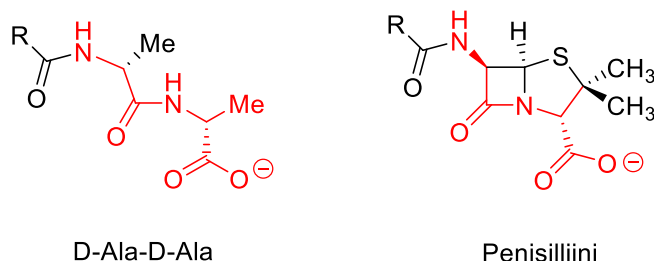
Kuva 8. Antibioottien toiminta yksinkertaistettuna. S = substraatti, E = entsyymi ja A = antibiootti.

Antibiootteja on kehitetty useille eri entsyymeille niiden toiminnan estämiseksi. Seromysiini ja fosfomysiini ovat antibiootteja, jotka estävät sytoplasmassa tapahtuvan biosynteesin kannalta olennaisten entsyymien toimintaa. Seromysiini jäljittelee D-alaniinia, ja siten rajoittaa D-Ala-D-Ala-ligaasin ja alaniini-rasemaasin toimintaa. Fosfomysiini jäljittelee fosfoenolipuryvaattia, joka sitoutuu MurA-entsyymiin. Fosfomysiinin sitoutuessa entsyymiin fosfoenolipuryvaatin sijaan, entsyymi ei voi katalysoida soluseinän biosynteesin etenemiseen vaadittavaa reaktiota. Fosfomysiiniä on käytetty esimerkiksi *E. coli* ja *Enterococcus faecalis* bakteerien aiheuttamien virtsatieinfektioiden hoidossa.⁶ Kuvassa 9 on esitetty seromysiinin, D-alaniinin, fosfomysiinin ja fosfoenolipuryvaatin rakenteet.



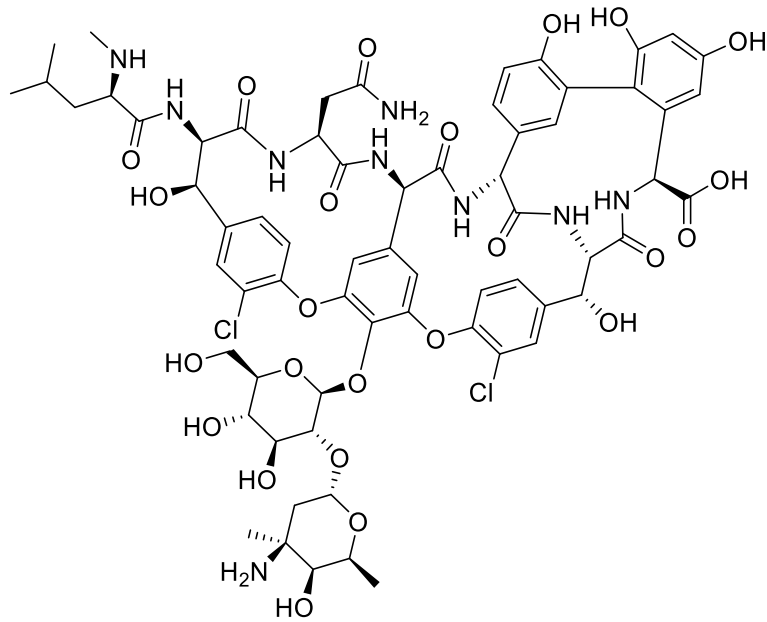
Kuva 9. Seromysiinin, fosfomysiinin ja niiden jäljittelemien yhdisteiden rakenteet.

Muita peptidoglykaanin biosynteesiä inhiboivia antibiootteja ovat esimerkiksi penisilliiniä sitoviin proteiineihin (*penicillin-binding proteins*, PBP) kohdistuvat antibiootit eli β -laktaamit. PBP:itä esiintyy sekä gram-negatiivisissa että -positiivisissa bakteereissa, ja ne voivat sisältää esimerkiksi transglykosylaasi- tai transpeptidaasi-domeenin tai molemmat.^{4,6} β -laktaamien toiminta ja sitoutuminen PBP:ihin perustuu siihen, että niiden rakenteessa on TPaasi-entsyymien substraattia, D-Ala-D-Ala, jäljittelevä osio.³ PBP aktiivisen alueen seriini reagoi β -laktaamirenkaan karbonyylin kanssa muodostaen pitkäikäisen asyyli-entsyymin, mikä estää aktiivisen alueen toiminnan ja tekee entsyymeistä tehottomia.^{4,6} Yhden β -laktaami antibioottiryhmän, penisilliinien, ja D-Ala-D-Ala-dipeptidin rakenteet on esitetty kuvassa 10, jossa punaisella on merkitty rakenteiden yhtäläisyydet.



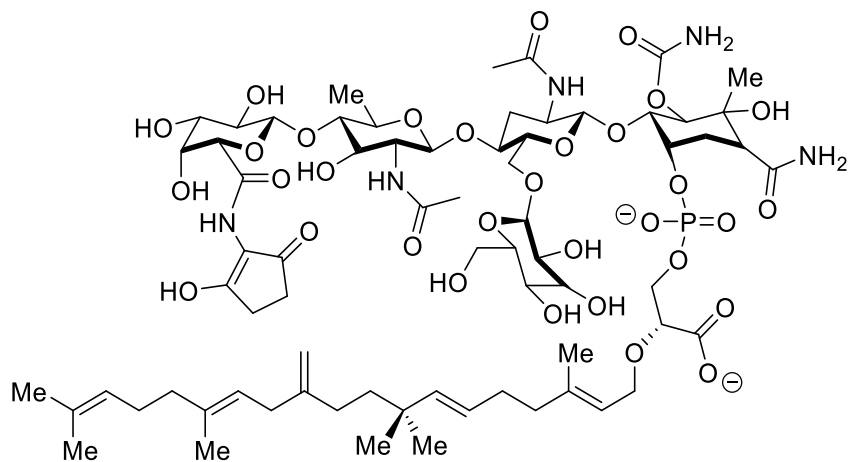
Kuva 10. TPaasi substraatin D-Ala-D-Ala:n rakenne ja penisilliinien perusrakenne. Punaisella on merkitty rakenteiden yhtäläisyydet.

Lisäksi on kehitetty esimerkiksi lipidi II välituotteeseen sitoutuvia antibiootteja, eli glykopeptidejä, sekä erilaisien entsyymien, kuten TGAasin ja MraY:n, inhibiittoreita. Vankomysiini on yksi esimerkki glykopeptidi antibiooteista. Se sitoutuu lipidi II:n C-terminaaliseen D-Ala-D-Ala-yksikköön, jolloin se estää kyseisen välituotteen sitoutumisen entsyymiin ja biosynteesin etenemisen.⁶ Kuvassa 11 on esitetty vankomysiinin rakenne.



Kuva 11. Vankomysiinin rakenne.

β -laktaami-antibiootit inhiboivat TPaasi-entsyymien toimintaa, mutta TPaasi-entsyymeille ei ole onnistuttu kehittämään yhtä laajaa valikoimaa inhibiittoreita. Moenomysiinit ovat tällä hetkellä yksi ainoista TPaasi-inhibiittoreista. Niitä ei kuitenkaan käytetä lääkeaineena ihmisille, koska niillä on heikot farmakokineettiset ominaisuudet ja huonot biologiset hyötyosuudet. Moenomysiini inhiboi TPaasi-entsyymien toimintaa sitoutumalla entsyymin aktiiviseen alueeseen lipidi II:n sijasta.¹⁹ Kuvassa 12 on esitetty moenomysiini A:n rakenne.



Kuva 12. Moenomysiini A:n rakenne.

Antibioottien tehoa on heikentänyt antibioottiresistenttien bakteerien kehittyminen. Antibioottien laajan käytön, ja erityisesti antibioottien käyttö kasvu edistävinä aineina rehussa, on todettu olevan antibioottiresistenttien bakteerien nopean kehittymisen syy.³ Antibioottiresistenssin muodostumista käsittelevissä tutkimuksissa resistenssin on huomattu kehittyvän hitaammin tapauksissa, joissa antibiootti sitoutuu substraattiin entsyymien sijasta. Entsyymit ovat alttiita mutaatioille, ja resistenssi entsyymiin sitoutuvaa antibioottia vastaan vaatii mutaation vain kyseisessä entsyymissä. Substraatin mutaatio taas vaatii muutoksia useammassa entsyymissä, joten resistenssi substraattiin sitoutuvaa antibioottia vastaan kehittyi hitaammin. Kuitenkin myös substraattiin sitoutuvia antibiootteja vastaan on kehittynyt antibioottiresistenssi, joka siirtyi resistentin sisältävien geenien välityksellä bakteerista toiseen. Esimerkiksi vankomysiinille on muodostunut resistenttejä bakteereita peptidiketjun D-Ala-D-Ala-päätteen toisen D-alaniinin korvautuessa D-laktaatilla tai D-seriinillä.⁶

Antibioottiresistenttien bakteerien kehittymisen myötä uusia antibiootteja on pyritty kehittämään. Uusien antibioottien kehityksessä on otettava huomioon tekijät, jotka nyt vaikuttavat antibioottiresistenssiin, jotta samat mutaatiot ja muutokset bakteereissa eivät estäisi myös uusien antibioottien toimintaa. On tärkeää tutkia ja tuntea nykyisten antibioottien toimintamekanismeja ja entsyymien toimintaa hyvin, jotta voidaan kehittää tehokkaita ja mahdollisesti kokonaan uudentlaisella mekanismilla toimivia antibiootteja.⁶

3.4.1 Antibioottien kehitys

Antibioottien kehityksessä on käytetty apuna esimerkiksi jo olemassa olevia lääkeaineita, halutun kohteen luonnollisia reaktiotuotteita tai ligandeja, ja kombinatoriaalisen kemian avulla muodostettuja yhdisteitä. Tutkimuksissa on käytetty erilaisia tietokoneavusteisia ja laskennallisia menetelmiä, kuten rakenne-aktiivisuussuhdetta (SAR), rakenteeseen (SBDD) tai fragmentteihin (FBDD) perustuvaa lääkesuunnittelua ja korkean suorituskyvyn seulontaa (HTS).^{20,21}

SBDD- ja FBDD-menetelmät perustuvat proteiinien röntgenkristallografialla selvitettyihin rakenteisiin. Niissä optimointi alkaa pienistä ja hyvin sitoutuvista fragmenteista, joissa jokainen atomi osallistuu sitoutumiseen tarvittavien vuorovaikutuksien muodostamiseen. Yksittäisiä fragmentteja voidaan lähteä kehittämään niin, että niille saadaan muodostettua lisää suotuisia vuorovaikutuksia proteiinin kanssa. Myös useita eri fragmentteja voidaan yhdistellä,

mikä usein parantaa sitoutumista verrattuna yksittäisiin fragmentteihin.^{20,22} Myös HTS-menetelmä perustuu useiden erilaisten yhdisteiden seulontaan erilaisista tietokannoista ja kokoelmista, mutta tutkitut yhdisteet ovat pääasiassa suurempikokoisempia kuin esimerkiksi FBDD-menetelmässä käsiteltävät yhdisteet. Menetelmien tarkoituksena on nopeuttaa erilaisten ja uusien yhdisteiden sitoutumisen arviointia tutkittuihin proteiineihin. Esimerkiksi HTS-menetelmä voi käydä läpi jopa useita tuhansia yhdisteitä päivässä.^{20,21}

Tässä työssä käsitellään entsyymien aktivoimien reaktioiden siirtymätiloihin perustuvaa menetelmää, siirtymätila-analogi suunnittelua (TSAD, *transition state analogue design*). Useiden erilaisten fragmenttien sijaan menetelmässä keskitytään reagoivien aineiden geometriaan ja elektrostaattiseen potentiaaliin reaktion siirtymätilassa.^{8,22} Tarkempi kuvaus siirtymätila-analogien suunnittelusta on esitetty luvussa 5.1.

4 PEPTIDOGLYKAANIEN ANALYYSIMENETELMIÄ

Peptidoglykaanien rakennetta on tutkittu useiden erilaisten kuvantamismenetelmien avulla, kuten transmissioelektronimikroskopialla (TEM), atomivoimamikroskopialla (AFM) ja röntgenkristallografialla.^{4,9} Lisäksi peptidoglykaanien tutkimuksessa paljon käytettyjä analysointimenetelmiä ovat korkean erotuskyvyn nestekromatografia (*high-performance liquid chromatography*, HPLC), massaspektrometria (MS) ja ydinmagneettinen resonanssi spektroskopia (*nuclear magnetic resonance*, NMR).^{10,23}

Peptidoglykaanin liukenemattomuuden vuoksi se usein muutetaan liukoiseen muotoon ennen mittauksia. Liukoisuutta voidaan lisätä esimerkiksi hydrolysoimalla ja osittain hajottamalla sen rakennetta. Rakennetta voidaan hajottaa peptidoglykaanihydrolaasien avulla muropeptideiksi, joista amidaasit ovat useimmiten käytettyjä. Käytetyt hydrolaasit valitaan sen perusteella, mitä peptidoglykaanista halutaan tutkia ja miten sitä halutaan hajottaa.¹⁰

4.1 Lämpäisielektronimikroskopia

TEM eli lämpäisielektronimikroskopiassa mikroskoopin elektronitykki muodostaa katodilla elektroneja, jotka kiihdytetään korkean jännitteen avulla elektronisuihkuksi. Elektronisuihku kohdistetaan näytteeseen sähkömagneettisten linssien avulla, ja elektronit siroavat näytteessä sen paksuuden ja tiheyden mukaan elektronien osuessa atomiytimiin. Elektronien siroaminen vaikuttaa läpimenneiden elektronien intensiteettiin, jonka mukaan näytteestä saadaan muodostettua kuva useimmiten fluoresenssinäytölle.²⁴

TEM-analyysiä varten näytteen tulee olla ohut, mielellään alle 100 nm paksuinen, sillä sen tulee läpäistä elektroneja. Hiottu ohut näyte kiinnitetään näytepidikkeeseen, ja se voidaan tarvittaessa päällystää ohuella amorfisella hiilikerroksella, joka pitää näytteen paremmin paikallaan. Joskus resoluution ja kontrastin parantamiseksi tutkittavan materiaalin tiheyttä voidaan lisätä raskasmetallien avulla.²⁴ Tukikalvolle asetettu näyte värjätään tiputtamalla pisara raskasmetalleja sisältävää värjäysreagenssia näytteen päälle, minkä jälkeen ylimäärä liuosta poistetaan ja näyte kuivataan. Esimerkiksi uranyyliasettaattia on käytetty värjäysreagenssina. Raskasmetallivärjäystä on käytetty esimerkiksi kuvantaessa viruksia, missä hiilikantoaine (*carbon support*) vaikeuttaa kuvantamista, sillä riittävää kontrastia niiden

välille on vaikea saada viruksien pienen koon vuoksi. Elektronit siroavat paremmin raskasmetalleilla värjätystä viruksesta, jolloin kuvantaminen onnistuu paremmin.²⁵

Biologisten näytteiden kuivaaminen, värjääminen ja päällystäminen saattaa vääristää näytettä, jolloin kuvantamalla saatu rakenne ei vastaa täysin näytteen luonnollista rakennetta. Vääristymien ehkäisemiseksi on kehitetty kryoelektronimikroskopia (cryo-EM). Siinä pieni tippa näytettä asetetaan näytepidikkeeseen, ylimäärä liuotinta poistetaan ja näyte jäähdytetään hyvin nopeasti jäähdytysseoksen avulla. Nopea jäähdytys on olennaista, jotta liuotin saadaan lasimaiseen tilaan, eikä siihen muodostu jääkiteitä. Näyte mitataan TEM:n kaltaisesti, mutta se pidetään nestetyypen lämpötilassa sulamisen estämiseksi.²⁶

4.2 Atomivoimamikroskopia

Atomivoimamikroskopia eli AFM on nanotason kvantitatiivinen määrittäminen, jolla on mahdollista saada kolmiulotteisia kuvia esimerkiksi proteiineista ja soluista, ja tutkia molekyylien välisiä ja sisäisiä vuorovaikutuksia. Mikroskoopin kärki skannaa näytteen pintaa, jolloin muutokset tutkittavan pinnan ja kärjen välisissä vuorovaikutuksissa aiheuttavat muutoksia tukivarren asennossa. Mikroskooppi seuraa tukivarren asentojen muutoksia ja muuttaa sen voimaksi, jonka avulla muodostuu topografinen kuva näytteen pinnasta. AFM:n avulla voidaan saada selville esimerkiksi näytteessä olevia korkeuseroja ja karheutta.^{24,27}

Näytteen valmistelemissä on tärkeää saada se kiinnitettyä näytepidikkeeseen (*substrate*) niin, että kuvantamisen aikana se ei irtoa kärjen vaikutuksesta. Näytepidikkeen materiaaleina on käytetty esimerkiksi lasia, piioksidia ja kiillettä (*mica*). Pidike voidaan myös käsitellä esimerkiksi hiilellä tai polymeereillä, jotta pinnasta saadaan tarvittaessa hydrofobinen. Myös näyte voidaan päällystää adheesioproteiineilla, kuten kollageenilla, tai muilla sitouttamisaineilla (*cross-linking agents*) liikkumisen estämiseksi. Mikrobisoluja, toisin kuin nisäkässoluja, ei pystytä yhtä helposti sitomaan pidikkeeseen adsorboimalla, sillä ne pitävät hyvin muotonsa eivätkä leviä kiinteällä pinnalla. Mikrobisolujen kiinnittämiseksi pidike voidaan käsitellä polykationeilla tai solu voidaan kiinnittää kovalenttisesti tai mekaanisesti suodatinpapereihin.²⁷

4.3 Röntgenkristallografia

Röntgenkristallografia on diffraktiomenetelmä, jonka avulla voidaan selvittää yhdisteen kiderakennetta, mutta ei tarkkaa kemiallista rakennetta. Kuvantamista varten näytepinnan tulee olla yhtäläinen ja tasainen, joten usein näytteet jauhetaan. Mittaus voidaan tehdä jauhetun näytteen lisäksi yksittäiselle kiteelle.^{24,28}

Röntgensäteily saadaan aikaan röntgenputkessa kiihdyttämällä elektroneja korkean jännitteen kentässä, jossa ne törmäävät metalliin. Elektronien nopea hidastuminen mahdollistaa niiden kineettisen energian muuntumisen röntgensäteilyksi. Säteily siroaa osuessaan näytteen atomien elektroneihin, ja sironnut säteily havaitaan detektorilla. Diffraktometri havaitsee näytteiden röntgendiffraktion ja mittaa diffraktiointensiiteettiä eri diffraktiokulmissa (2θ) ja muodostaen niistä spektrin.^{24,28}

Saatua spektriä voidaan sen jälkeen verrata tietokantojen spektreihin, joiden avulla voidaan selvittää näytteessä olevat kiteiset aineet. Tämä perustuu siihen, että jokainen kiteinen aine muodostaa kuvantamisen aikana tietynlaisen säteilykuvion, ja sama aine muodostaa aina saman kuvion. Seoksessa jokainen eri aine muodostaa itselleen ominaisen kuvion muista aineista riippumatta. Röntgenkristallografiolla voidaan selvittää esimerkiksi näytteen kiderakenne, kiteisyysaste, kiteiden koko ja atomien väliset etäisyydet. Kuvantamismenetelmää käytetään esimerkiksi nanomateriaalien ja geokemiallisten materiaalien tutkimiseen ja oikeuslääketieteellisiin tutkimuksiin.^{24,28}

Kiteiden kuvantamista varten proteiineja ja peptidejä voidaan kiteyttää erilaisten menetelmien avulla, joista yksi yleinen on höyrydiffuusio (*vapor diffusion*). Höyrydiffuusiassa saostusainetta ja proteiinia sisältävä pisara suljetaan astiaan, joka sisältää puhdasta saostusainetta, niin että pisara ei osu astian saostusaineeseen. Vesihöyryn annetaan diffundoitua ulos pisarasta, kunnes pisaran ja astiassa olevan saostusaineen osmolariteetit ovat yhtä suuret. Veden diffundoituessa ulos pisarasta, pisaran proteiinikonsentraatio kasvaa, mikä mahdollistaa kiteytymisen.²⁹

4.4 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia eli HPLC on analyttinen erotusmenetelmä, jonka avulla voidaan erottaa erilaisia yhdisteitä toisistaan. Nestemäinen näyte injektoidaan kolonniin, joka on pakattu huokoisilla partikkeleilla. Liikkuva faasi, eli liuottimesta ja näytteestä koostuva neste, liikkuu kolonnissa, stationaarifaasia, pitkin, jossa yksittäiset komponentit liikkuvat eri vauhtia riippuen niiden suhteellisesta liukoisuudesta faasien välillä. Korkeapaine auttaa kaikkia yhdisteitä poistumaan kolonnista. Detektorina voidaan käyttää esimerkiksi UV-detektoria, joka muodostaa yhdisteiden absorbanssista kromatogrammin ajan funktiona. Aikaa, joka eri komponenteilla kestää kulkea kolonnin läpi, kutsutaan retentioajaksi. Siihen vaikuttaa yhdisteen koostumuksen lisäksi faasien ominaisuudet, kuten ajoliuottimen seossuhde.²³

Peptidoglykaanien tutkimista varten bakteerit pitää käsitellä niin, että ne saadaan sopivaan muotoon. Yleisesti käsittelyyn kuuluu peptidoglykaanin hajottaminen kuumalla denaturoivalla SDS-liuoksella, proteiinien erottaminen, peptidoglykaanin pilkkominen muropeptideiksi ja niiden pelkistäminen, sekä pH:n säätäminen isoelektriseen pisteeseen ja suodatus.²³

HPLC-analyysin avulla voidaan saada selville, mitä muropeptideitä näyte sisältää, mitkä niiden kemialliset koostumukset ovat sekä mahdollisesti myös millaisia ovat peptidoglykaanin ristositoutuminen ja glykaaniketjujen pituudet. Useille muropeptideille tunnetaan niille karakteristiset piikit, mutta niiden tunnistamista voidaan parantaa yhdistämällä HPLC massaspektrometrin kanssa.²³

4.5 Massaspektrometria

Massaspektrometrian (MS) avulla voidaan määrittää tutkitun yhdisteen massa/varaus suhde ja molekyylikaavaa.³⁰ Massaspektrometristä mittausta varten peptidoglykaanin on oltava liukoisessa muodossa. Hydrolaasien avulla muodostuneet muropeptidit erotellaan usein esimerkiksi neste- tai kaasukromatografian avulla, jonka jälkeen ne siirretään massaspektrometrillä analysoitavaksi.^{10,31} Massaspektrometrissä molekyylit haihdutetaan ja ionisoidaan. Ionisoituneet molekyylit hajoavat usein fragmenteiksi, eli pienemmiksi paloiksi. Massaspektrometri erottelee muodostuneet fragmentit toisistaan niiden massan ja varauksen suhteen (m/z) ja analysoi erimassaiset ionit erikseen, jolloin niiden kaikkien signaalit näkyvät massaspektrissä.³⁰

Fragmenttien m/z arvoja voidaan verrata erilaisista tietokannoista löytyviin tuloksiin, minkä avulla eri muropeptidien rakenteet saadaan määritettyä ja niiden avulla voidaan päätellä myös koko peptidoglykaanin rakenne.³¹ Yhdisteen rakenteen selvittämiseksi myös typpiatomien määrää voidaan arvioida typpisäännön avulla. Typpisäännön mukaan yhdiste, jonka molekyyli-ionin massa on pariton, sisältää parittoman määrän typpiä. Vastaavasti parillisen määrän typpiä sisältävät yhdisteet tuottavat parillisen massan omaavan molekyyli-ionin. Parilliseen lukuun sisältyy myös 0.³⁰

4.6 NMR-spektroskopia

NMR-spektroskopia eli ydinmagneettinen resonanssi -spektroskopia perustuu ytimien käyttäytymiseen magneettikentässä. Pyörivät ytimet luovat ympärilleen magneettikentän, ja ne suuntautuvat sattumanvaraisesti eri suuntiin ilman ulkoisen magneettikentän vaikutusta. Ulkoisen magneettikentän vaikutuksessa ytimet suuntautuvat joko magneettikentän suuntaisesti tai sitä vastaan. Suurin osa suuntautuu magneettikentän suuntaisesti, sillä se on alempienerginen tila, kun taas magneettikentän vastaisesti suuntautuvat ytimet ovat korkeammalla energiatilalla. Kun ytimiin kohdistetaan ulkoista energiaa, joka vastaa matalan ja korkean energiatilan energiaeroa, osa matalalla energiatilalla olevien ytimien spineistä kääntyy ja siirtyy korkeamman energian tilalle.³⁰

Ytimen lähellä olevat elektronit vaikuttavat sen kokeman magneettikentän suuruuteen, mikä taas vaikuttaa ytimen resonanssitaajuuteen. Tämän vaikutuksesta erilaisissa ympäristöissä olevat ytimet resonoivat hieman eri taajuuksilla, ja niiden signaalit erottuvat toisistaan NMR-spektrissä. Kaikki ytimet eivät kuitenkaan ole NMR-aktiivisia. NMR-signaaleja antavat vain ytimet, joilla on pariton massa- tai atomiluku. Yleisiä ytimiä, joita NMR:n avulla tutkitaan, ovat ^1H , ^{13}C , ^{15}N ja ^{31}P .^{10,30}

^1H NMR-spektroskopian avulla saadaan selville molekyylin sisältämien erilaisten protonien määrä sekä signaalien integraalien avulla protonien suhteelliset määrät. ^{13}C NMR-spektroskopian avulla saadaan vastaavasti selville erilaisten hiiliatomien määrä. Erilaisia hiiliä voidaan tarkemmin tutkia DEPT-mittauksella (*distortionless enhancement by polarization transfer*), jossa valitun kulmaparametrin perusteella voidaan erottaa toisistaan primaariset, sekundaariset ja tertiääriset hiiliatomit.^{30,32}

1D-mittausten lisäksi on useita erilaisia 2D-mittauksia, joiden avulla voidaan havaita eri atomien välisiä yhteyksiä. Esimerkiksi ^1H , ^1H COSY-kokeessa (*correlation spectroscopy*) spektrin korrelaatiopiikkien perusteella saadaan selville, mitkä protonit ovat kytkeytyneet toisiinsa kahden tai kolmen sidoksen yli. 2D NOESY-kokeen (*nuclear overhauser enhancement spectroscopy*) avulla puolestaan voidaan havaita protonit, jotka ovat avaruudellisesti toistensa lähellä, vaikka niiden välillä olisi enemmän kuin kolme sidosta.³²

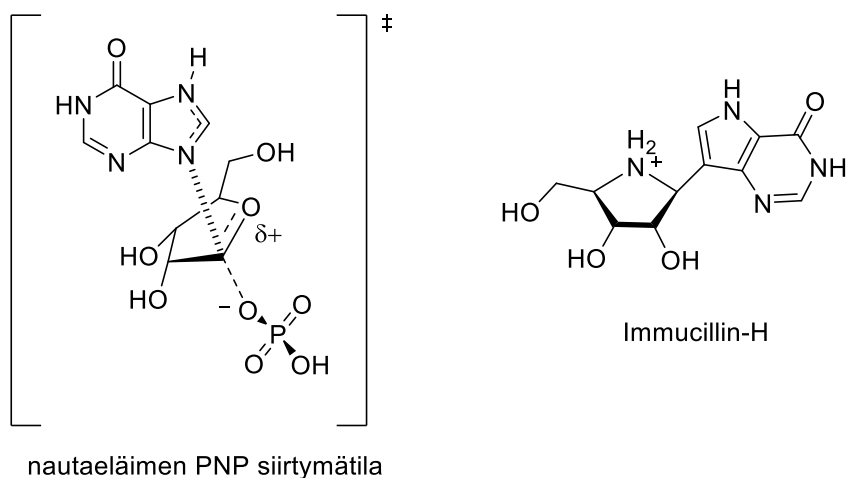
2D NMR-kokeiden avulla voidaan tutkia myös protonien ja heteroytimien, kuten ^{13}C tai ^{15}N , välisiä kytkeytyksiä. HMQC- (*heteronuclear multiple quantum coherence*) ja HSQC- (*heteronuclear single quantum coherence*) kokeiden avulla on mahdollista havaita kytkeytyksiä niiden protonien ja hiilien välillä, jotka ovat suoraan sitoutuneet toisiinsa. HMBC-koetta (*heteronuclear multiple bond coherence*) voidaan puolestaan käyttää havaitsemaan protonin ja heteroytimen välisiä pidemmän kantaman kytkeytyksiä, pääasiassa kahden ja kolmen sidoksen väliltä.³² Erilaisten NMR-mittausten avulla voidaan siis määrittää erityisesti yhdisteen hiilestä ja vedystä koostuvaa rakennetta. Lisäksi voidaan tutkia yhdisteen mahdollisesti sisältämiä muita ytimiä, kuten ^{15}N , ja niiden yhteyksiä protoneihin.^{30,32}

Peptidoglykaanin tutkimiseen voidaan käyttää erilaisia liuos- ja kiinteän tilan NMR-mittauksia. Mittauksissa voidaan selvittää muropeptideiden rakennetta tai havainnollistaa koko peptidoglykaanin 3D rakennetta. NMR-spektroskopian hyvä puoli on se, että mittaus ei hajota tutkittavaa yhdistettä, vaan samaa näytettä voidaan käyttää useita kertoja, ja yhdiste saadaan talteen mittauksien jälkeen. Liuostilan NMR-spektroskopian heikkoutena on kuitenkin peptidoglykaanin liukenemattomuus, sillä useat NMR-mittaukset vaativat näytteen liuottamista johonkin liuottimeen. Kiinteän tilan NMR-spektroskopia ei vaadi näytteen liuottamista, mutta siihen vaaditaan usein suurempi näytemäärä ja pidempi mittausaika.¹⁰

5 SIIRTYMÄTILA-ANALOGIT

Kaikki kemialliset reaktiot sisältävät epästabiilin välivaiheen. Kyseessä on siirtymätila, joka kestää vain noin 10^{-13} sekuntia. Siirtymätila-analogit, tai transitiotila-analogit, ovat stabiileja molekyyliä, jotka on suunniteltu muistuttamaan reaktion siirtymätilaa.^{8,9,33} Kuvassa 13 esitetään nautaeläimen puriininukleosidifosforylaasin (PNP) siirtymätila ja sen perusteella suunniteltu siirtymätila-analogi, Immucillin-H.³³

Inhibiittoreita, jotka perustuvat reaktioiden siirtymätilaan, alettiin tutkia 1970-luvulla. Aluksi suurin osa tutkituista inhibiittoreista oli luonnontuotteita, mutta 1990-luvulla alettiin kehittämään myös synteettisiä siirtymätila-analogeja. Siirtymätila-analogeja käytetään pääasiassa entsyymien inhibiittoreina, sillä siirtymätila-analogin sitoutuessa entsyymiin se ei voi sitoa muita substraatteja. Lisäksi siirtymätiloja tutkimalla voidaan selvittää esimerkiksi reaktioiden mekanismeja ja substraatin sitoutumista entsyymiin.^{8,9,33,34}



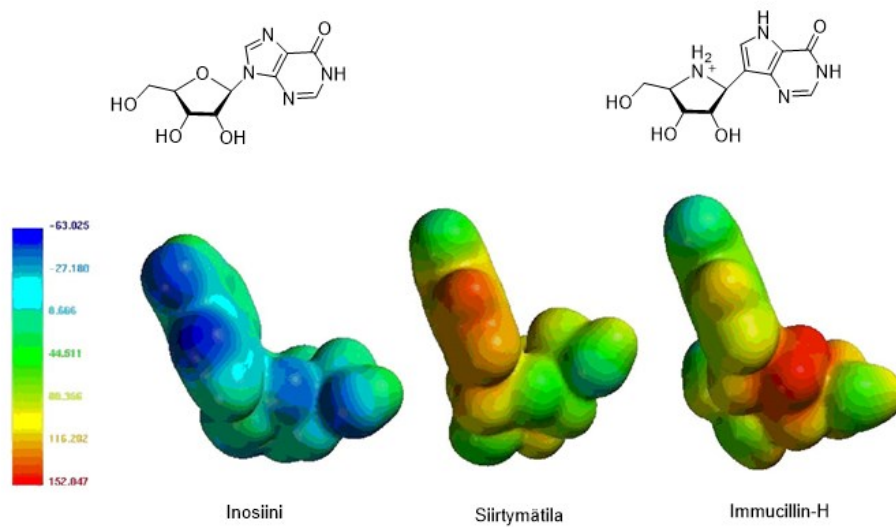
Kuva 13. Nautaeläimen PNP-siirtymätila ja sen perusteella muodostettu siirtymätila-analogi, Immucillin-H.

5.1 Siirtymätila-analogien suunnittelu

Reaktioiden siirtymätila-analogeja voidaan tutkia TSAD-menetelmän avulla, jossa yhdistetään erilaisia laskennallisia menetelmiä *kinetic isotope effect* -menetelmään (KIE), jossa verrataan isotooppimerkittyjen ja merkitsemättömien yhdisteiden reaktionopeuksia. KIE-menetelmässä suoritetaan useita reaktioita, joiden aikana yksittäisten atomien isotooppia vaihdetaan. KIE ilmaisee perustilan ja siirtymätilan sidosten värähtelyjen muutosta reaktion aikana. Primaariset KIE:t havaitaan, kun isotoopin sidos katkeaa tai muodostuu, ja sekundaariset KIE:t, kun isotoopin sidosten määrä pysyy muuttumattomana. KIE-arvoja voidaan määrittää esimerkiksi massaspektrometrialla, NMR-spektroskopiolla, polarimetrialla ja tuikelaskennalla (*liquid scintillation counting*). Saatujen tulosten ja laskennallisten menetelmien avulla voidaan määrittää reaktion mekanismia ja siirtymätilan rakenne.^{8,9}

Siirtymätila-analogin tutkiminen alkaa valmistamalla substraattimolekyylejä, joihin on liitetty isotooppimerkittyjä atomeja sopiviksi valittuihin kohtiin. Tämän jälkeen KIE:t mitataan jokaiselle valmistetulle molekyylille sellaisissa olosuhteissa, joissa reaktion ulkopuoliset tekijät vaikuttavat mahdollisimman vähän KIE-arvoihin. Lopuksi laskennallisten menetelmien avulla luodaan mahdollisia malleja siirtymätilalle, joille voidaan laskea teoreettiset KIE-arvot. Mallin, jonka teoreettiset KIE-arvot täsmäävät parhaiten kokeellisiin tuloksiin, voidaan todeta vastaavan parhaiten kyseisen reaktion siirtymätilaa.⁹

Muita menetelmiä, joita voidaan hyödyntää KIE:n kanssa siirtymätilojen selvittämiseksi, ovat esimerkiksi tiheysfunktionaaliteoria (DFT) ja elektrostaattiset potentiaalikatat.⁹ Siirtymätilan geometrian laskennallinen optimointi alkaa yleensä laskemalla oletettuun rakenteeseen vaikuttavat energiat ja voimat, minkä jälkeen hyödynnetään approksimaatiota potentiaalienergiapinnalle tavoitellen rakennetta, jossa vaikuttavien voimien suuruus on nolla. Tällaisia optimointimenetelmiä ovat esimerkiksi Newton-Raphson ja quasi-Newton.³⁵ Kuvassa 14 on havainnollistettu elektrostaattisten potentiaalikattojen hyödyntäminen. Kuvassa on esitetty nautaeläimen PNP:n substraatin inosiinin ja siirtymätila-analogin Immucillin-H:n elektrostaattiset potentiaalikatat verrattuna siirtymätilan potentiaalikattaan. Elektronirikkaat kohdat on merkitty kartassa sinisellä ja elektronivajaat kohdat punaisella.³³ Kuvasta nähdään, että siirtymätila-analogin geometria ja varauksien jakautuminen vastaa hyvin siirtymätilaa.



Kuva 14. Nautaeläimen PNP:n substraatin, inosiinin, ja siirtymätila-analogin, Immucillin-H:n, elektrostaattiset potentiaalikartat verrattuna siirtymätilan potentiaalikarttaan.³³

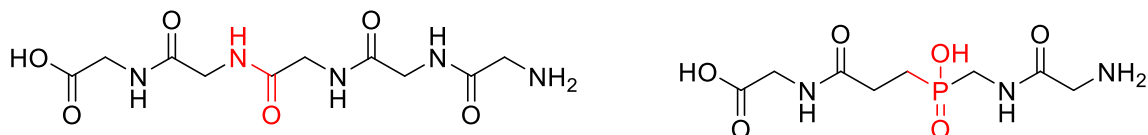
Kokeellisten ja laskennallisten menetelmien tukena voidaan hyödyntää myös atomiresoluutiotason rakennemääritysmenetelmiä, kuten korkean resoluution röntgenkristallografiaa. Sen avulla voidaan tutkia entsyymien ja siirtymätila-analogin muodostamaa kokonaisuutta, ja saada selville kompleksin kolmiulotteinen rakenne. Tämän avulla voidaan lisäksi hahmottaa substraatin sitoutumiskohdan, ja siten myös substraatin, muoto.⁹

TSAD-menetelmän ideana on luoda analogeja, joiden van der Waals geometria ja elektrostaattiset potentiaalipinnat ovat mahdollisimman samankaltaiset siirtymätilan kanssa.⁹ Täysin siirtymätilan kaltaisia yhdisteitä ei pystytä syntetisoimaan, sillä siirtymätilan sidospituudet eivät vastaa stabiilin yhdisteen sidospituuksia.⁸ Siirtymätilassa sidosten katketessa tai muodostuessa sidospituudet ovat 120–150 % pidempiä verrattuna normaaleihin sidospituuksiin. Jotta analogin reaktiokeskuksen sidospituudet vastaisivat paremmin siirtymätilaa, esimerkiksi hiiliatomeja on useissa tapauksissa vaihdettu muiksi atomeiksi, kuten fosforiksi tai rikiksi. Hiilen korvaaminen fosforilla parantaa analogin yhtäläisyyttä siirtymätilan kanssa verrattuna yhdisteeseen ilman fosforia, sillä happi-fosfori ja hiili-fosfori-sidokset ovat pidempiä kuin hiili-hiili ja hiili-happi-sidokset.^{35,36}

Joillekin entsyymeille löytyy kirjallisuudesta valmiiksi siirtymätila-analogeja, mutta joitakin on saatettu virheellisesti kutsua kyseisellä termillä niiden sitoutuessa hyvin entsyymiin, vaikka ne eivät todellisuudessa vastaisikaan siirtymätilaa. Tällaisten yhdisteiden vastaavuutta siirtymätilojen kanssa on tutkittu esimerkiksi selvittämällä Gibbsin vapaan energian suhteita (*linear Gibbs free energy relationships*, LFERs) inhibiittorin ja substraatin välillä. Jos inhibiittorin, substraatin tai entsyymien kemiallisia koostumuksia muutetaan kuitenkin vaikuttamatta katalyysille keskeisiin osiin, tulisi niiden vaikuttaa yhtä paljon entsyymien reaktionopeuden lisääntymiseen ja inhibiittorin affiniteettiin verrattuna substraattiin. Toisin sanoen siirtymätila-analogilla inhibiitiovakion tulisi olla verrannollinen dissosiaatiovakioon, ja linearisoimalla K_M/k_{cat} tulokset K_i suhteen, tuloksista pitäisi muodostua suora, jonka kulmakerroin on noin 1. LFER-menetelmän heikkoutena ovat kuitenkin erityisesti varautuneet yhdisteet. Ne muodostavat energeettisesti tärkeitä vuorovaikutuksia nukleofiilien ja happojen sekä emästen kanssa. Niihin ei kuitenkaan voida tehdä rakenteellisia muutoksia, jotka eivät vaikuttaisi entsyymien aktiivisuuteen huomattavasti.³⁷

5.2 Siirtymätila-analogien sovelluskohteita

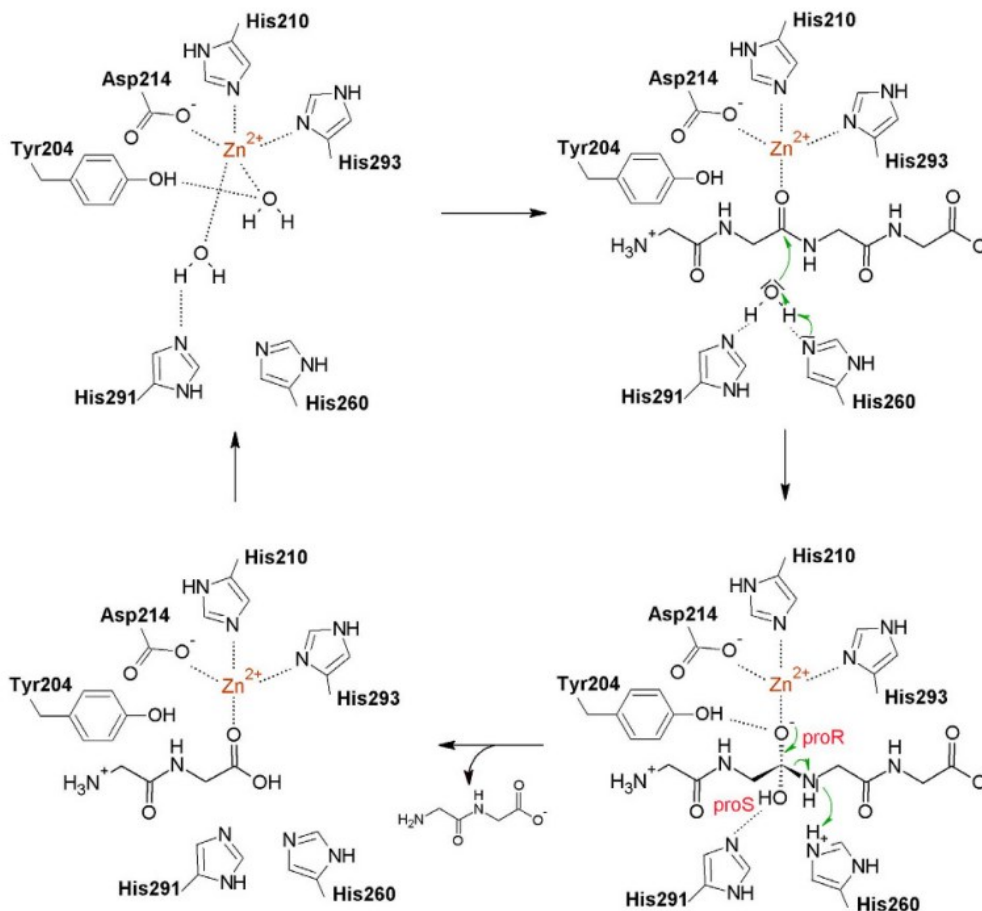
Entsyymien on todettu reagoivan siirtymätila-analogien kanssa paremmin kuin substraattien, ja siksi siirtymätila-analogien avulla voidaan tutkia esimerkiksi substraatin sitoutumista entsyymiin.^{9,33} Esimerkiksi tässä työssä tutkittava tetraglysiinifosfinaatti jäljittelee pentaglysiini-ristisillan hydrolyysireaktion siirtymätilaa.^{13,18} Kuvassa 15 on esitetty tetraglysiinifosfinaatin rakenne verrattuna pentaglysiinin rakenteeseen ja punaisella on merkitty niiden rakenteiden eroava kohta.



Kuva 15. Pentaglysiinin (vasemmalla) ja tetraglysiinifosfinaatin (oikealla) rakenteet.

Punaisella on merkitty rakenteiden merkittävin ero.

Tetraglysiinifosfinaatin avulla on tutkittu esimerkiksi substraattien sitoutumista lysostafiinin kaltaisiin entsyymeihin, kuten LytM.^{13,18} Siirtymätila-analogin avulla on tutkittu myös LytM:n toimintaa ja sen katalysoiman hydrolyysin mekanismia. Grabowska *et al.*¹⁸ tutkivat LytM ja tetraglysiinifosfinaatin muodostamaa kompleksia kiteyttämällä ja analysoimalla sitä, käyttäen apuna laskennallisia menetelmiä. Kuvassa 16 on esitetty heidän ehdottamansa mekanismi pentaglysiinin hydrolyysille LytM-entsyymissä.¹⁸



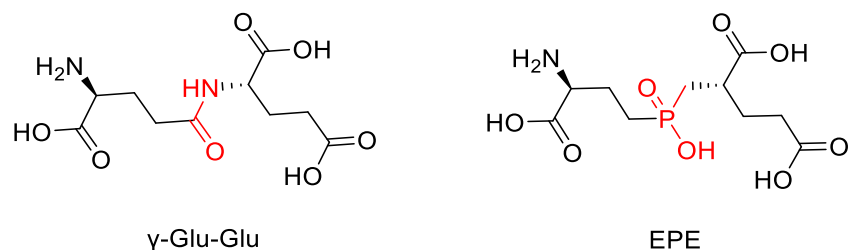
Kuva 16. Grabowska *et al.*¹⁸ ehdottama mekanismi LytM-entsyymissä tapahtuvasta pentaglysiinin hydrolyysiireaktiosta.

Siirtymätila-analogien avulla on onnistuttu tutkimaan myös fosforyylin siirtoa hyödyntävien biologisten moottorien mekanismia. On tutkittu esimerkiksi metallifluoridi-analogeja MgF₃⁻ ja AlF₄⁻, joiden avulla on pystytty tutkimaan molekyyli tapahtumia, jotka yhdistävät fosforyylin

siirron katalyyttiset vaiheet muutoksiin entsyymien konformaatioissa. Kompleksien tutkimisessa on käytetty muun muassa proteiinkristallografiaa, elektronimikroskopiaa, NMR-spektroskopiaa ja laskennallisia menetelmiä, kuten tiheysfunktionaaliteoriaa.³⁸ Analyysiensä avulla Ge *et al.*³⁸ määrittivät uuden Zika-viruksen NS3-helikaasin siirtymätila-analogin, $\text{MgF}_3(\text{H}_2\text{O})^-$, jota voitaisiin mahdollisesti hyödyntää myös muiden vastaavanlaisten biologisten moottoreiden tutkimuksissa.

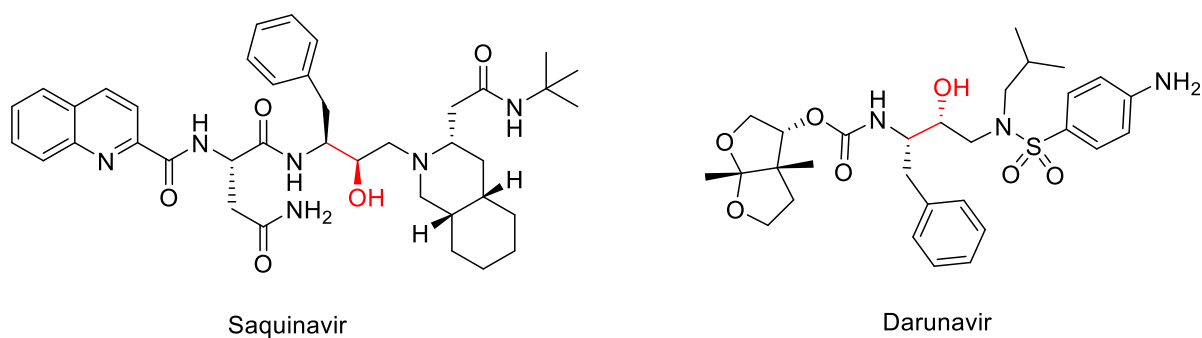
Akparov *et al.*³⁴ käyttivät siirtymätila-analogia apuna entsyymien substraattispesifisyyden tutkimisessa, ja pyrkivät selvittämään, mitkä aktiivisen alueen aminohapot osallistuvat substraatin tunnistamiseen. He tutkivat karboksipeptidaasi B:tä (CPB) yhdessä *N*-sulfamoyyli-L-fenyylialaniini-analogin kanssa. He kiteyttivät kompleksin, tekivät kineettisiä tutkimuksia ja käyttivät apuna röntgenkristallografian avulla saatuja elektronitiheyskarttoja. Kyseistä analogia, joka oli muodostettu epäspesifille substraatille, verrattiin spesifin substraatin siirtymätila-analogiin, jota oli tutkittu aiemmin. Huomattiin, että aiemmin tutkittuun analogiin verrattuna *N*-sulfamoyyli-L-fenyylialaniinilla oli vähemmän suotuisia sähköstaattisia vuorovaikutuksia ja vähemmän vetysidoksia. Siirtymätila-analogin avulla saatiin selville, että ligandin sitoutumiseen vaikuttaa muutos Asp255 aminohapon konformaatioissa ligandin rakenteesta riippuen, ja että Asp255:n lisäksi aminohapot Ser207, Gly253 ja Tyr248 vaikuttavat CPB:n substraatin tunnistamiseen.³⁴

Mekanismien selvittämisen lisäksi siirtymätila-analogeja on tutkittu myös entsyymien inhibiittoreina, ja niiden pohjalta voidaan kehittää esimerkiksi lääkkeitä. Ensimmäiset siirtymätila-analogeista valmistetut inhibiittorit suunniteltiin proteolyttisille entsyymeille. Siirtymätilojen valmistus keskittyi oletukseen, että peptidisidoksen hydrolyysin sp^3 -siirtymätila vastaisi fosfonamidaattien sekä fosfoni- ja fosfiinihappojen siirtymätilaa.⁹ Esimerkiksi Barinka *et al.*³⁹ tutkivat ihmisen glutamaattikarboksipeptidaasi II:n (GCPII) toimintaa ja ligandien sitoutumista käyttäen apuna fosfapeptidi-inhibiittoreita. Inhibiittoreissa tasossa oleva peptidisidos on korvattu fosfinaattiosalla, joka jäljittelee substraatin hydrolyysin epästabiilia tetraedristä siirtymätilaa. Yksi testatuista inhibiittoreista oli [(2S,3'S)-{[(3'-amino-3'-karboksipropyli)-hydroksifosfinoyyli]metyyli}-pentaanidihappo (EPE). EPE jäljittelee GCPII:n substraattia γ -Glu-Glu. Substraatin ja EPE:n rakenteet on esitetty kuvassa 17. EPE:n kaltaisten yhdisteiden, joihin on liitetty erilaisia funktionaalisia ryhmiä, kuten fluoresoivia väriaineita, uskotaan olevan mahdollisia GCPII-inhibiittoripohjaisia kuvantamisaineita tai toimivan lääkkeitä esimerkiksi eturauhassyövän hoidossa.³⁹



Kuva 17. GCPII-entsyymin substraatti γ -Glu-Glu ja sen hydrolyysin siirtymätilaa jäljittelevä analogi EPE. Rakenteiden eroava kohta on merkitty punaisella.

HIV-infektiota vastaan on kehitetty useita erilaisia lääkkeitä, joista jopa 40 % on HIV-proteaasi-inhibiittoreita ja siirtymätila-analogeja. Proteaasien katalysoima peptidisidoksin hydrolyysi sisältää tetraedrisen oksianioni-välituotteen, jota hydroksietyleeni-analogit jäljittelevät. Tällaisia lääkeaineita ovat esimerkiksi Saquinavir ja Darunavir, joiden rakenteet on esitetty kuvassa 18. Kuvaan on merkitty punaisella hydroksietyleeni-yksikkö.⁹

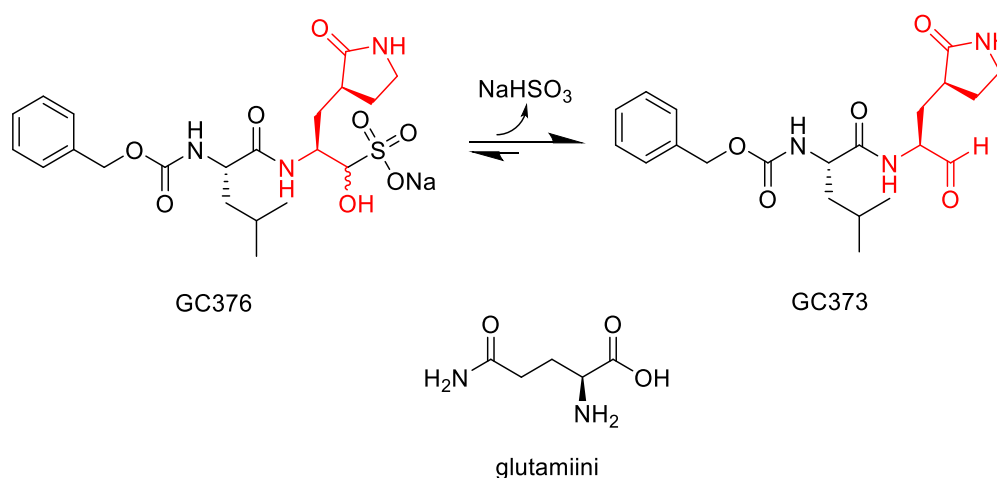


Kuva 18. HIV-proteaasi-inhibiittorit Saquinavir ja Darunavir. Punaisella on merkitty hydroksietyleeni yksiköt, jotka jäljittelevät tetraedristä oksianioni-välituotetta.

Jo aiemmin mainittu Immucillin-H on kehitetty toimimaan inhibiittorina naudan PNP-entsyymille. Tutkimuksissa käytettiin naudan PNP:tä, jonka aminohapposekvenssi on 87 % samankaltainen ihmisen PNP:n kanssa. PNP:tä tutkittiin KIE-analyysien avulla. Suunnittelussa otettiin huomioon analogin kemiallinen stabiilius, jotta se ei reagoisi entsyymissä. Lisäksi haluttiin, että analogissa tietty tyyppi protonoituu fysiologisessa pH:ssa, mikä varmistettiin korvaamalla yksi tyyppi hiilellä. Myös renkaan happiatomi muutettiin typeksi, jolloin analogin

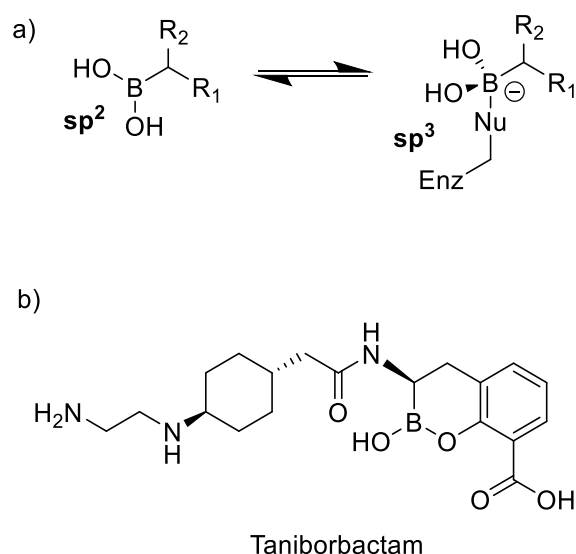
varaus vastasi siirtymätilan oletettua varausta. Immucillin-H:n ja muiden vastaavanlaisten inhibiittorien uskotaan mahdollisesti toimivan esimerkiksi T-solulymfoomien hoidossa.⁸

Uudempina tutkimuksien kohteina ovat olleet GC376:ksi ja GC373:ksi nimetyt analogit, joita on tutkittu SARS-CoV-2 pääproteaasin mahdollisina inhibiittoreina. GC376 on jo aiemmin tunnettu hyvänä ja laajakirjoisena lääkkeenä erilaisia koronaviruksia vastaan, ja siksi sen uskotaan olevan mahdollisesti tehokas myös SARS-CoV-2:a vastaan. Vettä sisältävässä ympäristössä aldehydi bisulfaatti GC376 hajoaa sulfiitti-ioniksi ja aldehydiksi GC373, ja siksi GC376-analogia on pidetty GC373:n mahdollisena aihiolääkkeenä. Niiden affiniteettia ja sitoutumisvakioita on tutkittu esimerkiksi isotermissellä titrauskalorimetrialla ja fluoresenssienergian siirtotestillä (*fluorescence resonance energy transfer assay*, FRET).⁴⁰ Tutkimuksissa on huomattu SARS-CoV-2:n pääproteaasin, M^{pro}, suosivan glutamiinisubstraattia. Siksi useat M^{pro}-inhibiittorit sisältävät glutamiinia jäljittelevän γ -laktaami glutamiiniosan.⁴¹ Kuvassa 19 on esitetty GC376:n, GC373:n ja glutamiinin rakenteet, ja punaisella on merkitty inhibiittorien γ -laktaami glutamiiniosaa.⁴⁰



Kuva 19. GC376- ja GC373-inhibiittorien ja glutamiinin rakenteet. Punaisella on merkitty inhibiittorien glutamiinia jäljittelevä γ -laktaami-glutamiiniosa.

Siirtymätila-analogeja on tutkittu myös yhdessä jo olemassa olevien antibioottien kanssa. Muun muassa Lefurgy *et al.*⁴² ovat tutkineet boorihapon siirtymätila-analogi-inhibiittoreita (*boronic acid transition-state analog inhibitor*, BATSI) yhdessä β -laktaamien kanssa. β -Laktaamien tehoa heikentävät bakteerien tuottamat β -laktamaasit, ja siksi β -laktaamien kanssa käytetään usein β -laktamaasi-inhibiittoreita. β -Laktamaasi-inhibiittoreita on pyritty kehittämään ilman β -laktaamirengasta, jotta ne eivät hajoaisi β -laktamaasien vaikutuksesta.⁹ BATSI:t ovat yksi esimerkki tällaisista inhibiittoreista. Ne lisäävät β -laktaamien tehoa ja efektiivisyyttä sitoutumalla β -laktamaaseihin. Ensimmäisten tutkittujen BATSI:n havaittiin sitoutuvan β -laktamaasien aktiivisen alueen seriini-nukleofiiliin reversiibelillä koordinaatiosidoksella, tehden β -laktamaasista tehottoman.⁴² Boronaatti-inhibiittorien etuna on niiden mahdollisuus esiintyä sekä sp^2 - että sp^3 -muodossa, jolloin ne voivat jäljitellä sekä substraatteja että tetraedrisiä välituotteita. Kuvassa 20 on esitetty boorihappo ja sen toiminta siirtymätila-analogina sekä yhden tutkitun BATSI:n, Taniborbactam:n, rakenne.⁴³



Kuva 20. a) Boorihappojen yleinen rakenne ja niiden toiminta siirtymätila-analogina. Enz = entsyymi, Nu = nukleofiili, joka on metallo- β -laktaamaseissa $(Zn^{II})_n-OH$ ja seriini- β -laktaamaseissa Ser-OH. b) Taniborbactam-BATSI:n rakenne.

5.3 Sitoutumistutkimukset

Entsyymien mekanismien ja siirtymätila-analogien mahdollisten inhibiitio-ominaisuuksien tutkimiseksi tarvitaan tietoa analogin sitoutumisesta entsyymiin. Sitoutumista voidaan seurata muun muassa tutkimalla, kuinka analogit inhiboivat substraattien sitoutumista. Tätä varten on valmistettu seos, joka koostui puskuriliuksesta, substraatista, potentiaalisesta inhibiittorista ja entsyymistä.^{36,44} Reaktion etenemistä ja substraatin muuntumista seurattiin absorbanssin muutoksien avulla UV-VIS-spektrometrillä. Erilaisten inhibiittori- ja substraattikonsentraatioiden avulla selvitettiin esimerkiksi reaktioiden nopeuksia, ekstinktiokertoimia ja vakioita, kuten K_i , IC_{50} , K_M ja V_{max} . Näistä K_i ja IC_{50} ovat inhibiitiovakioita, ja K_M ja V_{max} Michaelis-Menten-yhtälön vakioita. Saatujen tulosten avulla Akparov *et al.*³⁶ määrittivät inhibiitiovakioiden arvot muodostamalla suoran inhibiittorin konsentraatiosta $K_{Mapp}/V_{max} \cdot n$ funktiona. Suoralle muodostettiin yhtälö $y=ax+b$, josta inhibiitiovakiot saatiin laskettua selvittämällä b/a .³⁶

Myös isotermistä titrauskalorimetriaa (ITC) on käytetty useassa tutkimuksessa inhibiittorien sitoutumisen tutkimiseksi.^{37,40} Menetelmässä mitataan lämpöä, jota vapautuu tai absorboituu, kun substraatti sitoutuu entsyymiin. Mittaus voidaan tehdä moni-injektiolla (*multiple injection ITC*) tai kertainjektiolla (*single injection ITC*), jotka eroavat toisistaan injektointien määrän lisäksi käytettyjen substraatti- ja entsyymikonsentraatioiden perusteella. Moni-injektiossa entsyymin konsentraatio on vähäinen, jotta vain osa substraatista muuntuu tuotteeksi. Kertainjektiossa entsyymin määrä on taas suurempi, jotta mahdollisimman paljon injektoitua substraattia muuntuisi tuotteeksi. Inhibitiota tutkiessa moni-injektio on hyvä vaihtoehto. Jos inhibiitio on heikkoa, mutta sitä halutaan silti tarkastella, on kertainjektio parempi valinta. Molemmissa menetelmissä entsyymi on useimmiten valmiina näytesolussa, ja substraattia ja/tai inhibiittoria annostellaan näytesoluun injektioruiskun avulla. Saatujen tulosten avulla voidaan selvittää esimerkiksi kineettisiä vakioita K_M ja K_i , nopeusvakio k_{cat} sekä entalpian muutos ΔH . Erityisesti K_M ja k_{cat} ovat tärkeitä vakioita, koska niiden avulla voidaan havainnoida entsyymien käyttäytymistä ja entsyymien aktiivisuuden muutosta olosuhteiden muuttuessa, kuten esimerkiksi inhibiittorin lisäyksen jälkeen.⁴⁵

Edellä kuvattujen menetelmien lisäksi siirtymätila-analogien sitoutumista voidaan tutkia röntgenkristallografian avulla. Sen avulla voidaan määrittää kiteytyneiden entsyymien kolmiulotteinen rakenne inhibiittorien kanssa, ja selvittää esimerkiksi inhibiittorin asento entsyymissä ja mahdolliset vuorovaikutukset entsyymien ja inhibiittorin välillä.⁴²

Tietokannoista, kuten PDB, löytyy jo monelle erilaiselle proteiinille niiden röntgenkristallografialla, NMR-spektroskopiolla tai cryo-EM:llä selvitetty rakenne, joita voidaan hyödyntää laskennallisissa menetelmissä. Tällöin kokeellisia mittauksia ei tarvitse välttämättä edes itse suorittaa.²⁹ Kuvassa 21 on PDB-tietokannasta¹⁷ otettu Grabowska et al.¹⁸ laatima rakennekuva (PDB ID: 4ZYB) LytM-entsyymistä, johon on lisätty myös sen mahdollisen siirtymätila-analogin sijainti ja asento.

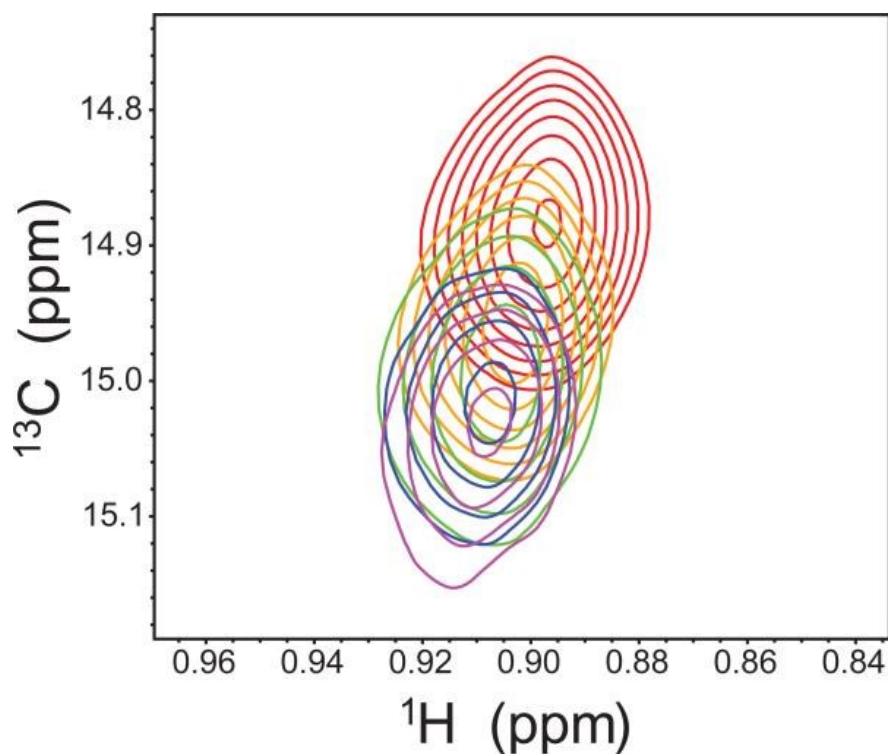


Kuva 21. Röntgenkristallografialla selvitetty LytM-entsyymien ja sen mahdollisen siirtymätila-analogin muodostaman kompleksin rakenne.

Laskennallisia menetelmiä entsyymien ja substraatin välisen sitoutumisen arviointiin on monia erilaisia, ja laskujen suorittamiseksi on suunniteltu monia ohjelmistoja. Yksi molekyyli-simulaatiomenetelmistä on kvanttimekaniikkaa ja molekyyli-mekaniikkaa yhdistävä menetelmä QM/MM, jonka avulla voidaan määrittää mahdolliset sitoutumisenergiat. PDB:stä saatua rakennetta voidaan muokata tarpeen mukaan poistamalla vesimolekyylejä, metallioneja tai kofaktoreita, sekä lisäämällä vetyatomeja. Molekyyli-dynamiikkasimulaatiolla (MD) voidaan poistaa lasketuista rakenteista aiheettomia yhteentörmäyksiä ja vääristymiä sekä

määrittää minimienergiarakenne. Lisäksi substraatille energeettisesti suotuisia asentoja voidaan määrittää telakointimenetelmällä (*docking*), ja liuottimen vaikutus ottaa huomioon käyttämällä Bornin mallia.⁴⁶

Siirtymätila-analogin ja entsyymin välisiä vuorovaikutuksia, kuten sitoutumiseen osallistuvia aminohappoja, voidaan tutkia röntgenkristallografian lisäksi NMR-spektroskopian avulla. Yksi tapa seurata entsyymin ja substraatin välisiä vuorovaikutuksia on mitata ensin NMR-spektri pelkästä proteiinista, esimerkiksi $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-spektri. Tämän jälkeen entsyymistä mitataan NMR-spektrejä vaihtelevissa substraattikonsentraatioissa, jolloin vuorovaikutusten muodostuessa niihin osallistuvien aminohappojen kemialliset siirtymät muuttuvat.⁴⁷ Myös ^1H NMR ja $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HMBC-spektrien avulla voidaan seurata entsyymin ja substraatin välisiä vuorovaikutuksia sekä entsyymiin aiheuttamia muutoksia substraatissa.⁴⁸ Kuvassa 22 on Manleyn ja Lorian⁴⁷ havainnollistama kuva kemiallisen siirtymän muuttumisesta, kun substraatti liittyy entsyymiin. Lähtökohtana on punaisella merkitty pelkän entsyymien kemiallinen siirtymä, josta kemiallinen siirtymä liikkuu saturaation kasvaessa kohti violetilla merkittyä täysin substraatilla saturoidun entsyymien siirtymää.

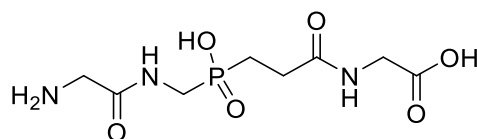


Kuva 22. Kemiallisen siirtymän muuttuminen substraatin saturoidessa entsyymiin.

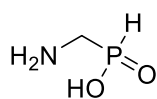
(Uudelleenjulkaistu viitteestä 47 Elsevier-kustantajan luvalla.)

6 TYÖN TARKOITUS

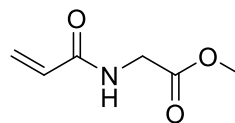
Työn kokeellisen osan tavoitteena oli valmistaa lysostafiinientsyymin siirtymätila-analogi, tetraglysiinihypofosforihapoke (kuva 23), yhdistämällä Ojalan⁴⁹ valmistamat lähtöaineet keskenään. Ojala oli valmistanut aminometyylihypofosforihapoketta ja *N*-akryloyylylglysiinaattia, jotka tässä työssä oli tarkoitus yhdistää Firczuk *et al.*¹³ julkaiseman artikkelin mukaisesti. Lähtöaineiden rakenteet on esitetty kuvassa 24.



Kuva 23. Tetraglysiinihypofosforihapokkeen rakenne.



Aminometyylihypofosforihapoke



N-akryloyylylglysiinaatti

Kuva 24. Ojalan valmistamien lähtöaineiden rakenteet.

Valmistettua siirtymätila-analogia voitaisiin käyttää lysostafiinientsyymin ja lysostafiinientsyymin kaltaisten entsyymien, kuten LytM, toiminnan tutkimiseen. Entsyymien toiminnan ja mekanismien tutkiminen on tärkeää erityisesti uusien lääkeaineiden kehittämistä varten. Grabowska *et al.*¹⁸ uskovat, että lysostafiinista voisi olla mahdollista substraattispesifisyyteen vaikuttavilla muutoksilla valmistaa entsyymi, joka hajottaisi myös antibioottiresistenttejä bakteerikantoja.

7 KÄYTETYT LAITTEET JA REAGENSIT

NMR-spektrit mitattiin käyttäen Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Bruker Avance III HD 300 MHz NMR-spektrometriä ja matemaattis-luonnontieteellisen tiedekunnan Nanotiedekeskuksen Bruker Avance III HD 800 MHz NMR-spektrometriä. Kemiallisen siirtymän ppm-asteikko kiinnitettiin liuottimena käytetyn metanolin jäännösprotonin signaaliin niin, että $\delta(\text{CH}_3\text{OH}) = 4,78$ ppm. ^{31}P NMR-mittauksissa ulkoisena standardina käytettiin H_3PO_4 :n vesiliuosta ja ppm-asteikko kalibroitiin niin, että $\delta(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,0$ ppm.

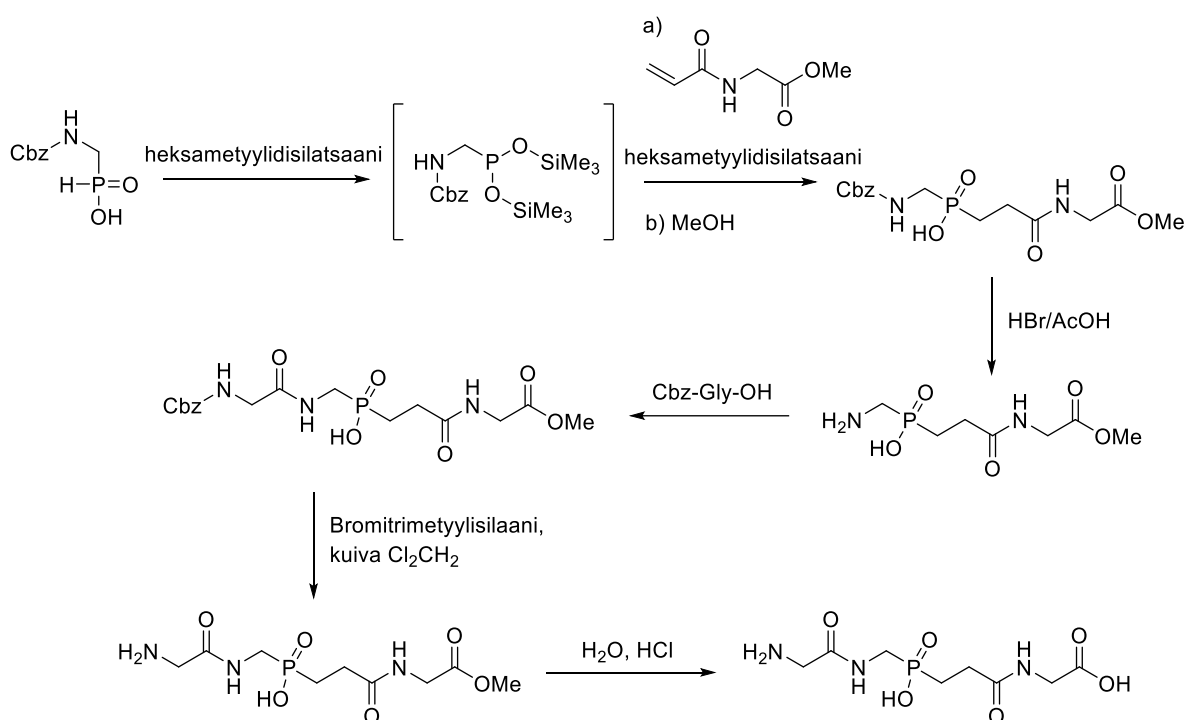
Työssä käytetty massaspektrometri oli Agilent Technologies-yhtiön 6560 Ion Mobility Q-TOF LC/MS ja nestekromatografialaitteisto saman yhtiön 1260 Infinity II. Kolonnina käytettiin Phenomenexin Kinetex 2,6 μm C18 (50 x 2,1 mm) -kolonnia. IR-spektriin mittaukseen käytettiin Bruker Alpha spektrometriä. Taulukossa 1 on esitetty työssä käytetyt reagenssit ja liottimet.

Taulukko 1. Käytetyt reagenssit ja liuottimet

Reagenssi	Valmistaja	Puhtausaste (%)
Aminometyylihypofosforihapoke	Ojala ⁴⁹	
Bentsyliklooriformiaatti	Aldrich	≥95
Bromitrimetyylisilaani	TCI	95
Bromitrimetyylisilaani	Alfa Aesar	97
Cbz-Gly-OH (Z-Gly-OH)	Sigma-Aldrich	99
Dietylieetteri	VWR Chemicals	100
Dikloorimetaani	VWR Chemicals	100
Etyyliasettaatti	VWR Chemicals	99,9
Heksametyylidisilatsaani	abcr GmbH	98,5
Isobutyliklooriformiaatti	Sigma-Aldrich	98
Kaliumkarbonaatti	VWR Chemicals	99,8
Metanoli	Honeywell	≥99,8
N-akryloyyliyglysinaatti	Ojala ⁴⁹	
Natriumkloridi	VWR Chemicals	99,9
Natriumsulfaatti	Fisher Scientific	99
N-metyylimorfoliini	Acros Organics	99,5
Rikkihappo	Honeywell	95,0–97,0
Tetrahydrofuraani	Sigma-Aldrich	≥99,9
Tolueeni	Sigma-Aldrich	≥99,7
Vetybromidihappo etikkahapossa, 33 %	Fluka	
Vetykloridihappo, 37 %	Honeywell	

8 TYÖN TOTEUTUS

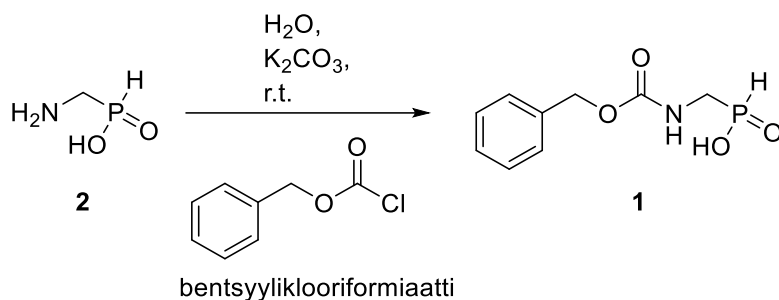
Synteesi oli tarkoitus toteuttaa Firczuk *et al.*¹³ julkaiseman artikkelin mukaisesti. Työ aloitettiin tarkistamalla lähtöaineiden tila NMR- ja IR-spektroskopian avulla. Spektrien perusteella voitiin todeta, että aiemmin valmistetut lähtöaineet eivät olleet muuttuneet tai hajonneet säilytyksen aikana. Tämän jälkeen aminometyylihypofosforihapokkeen aminoryhmä suojattiin karboksibentsyyli (Cbz) suojarahmällä. Tavoitemolekyylin reaktiokaavio esitetään kokonaisuudessaan kaaviossa 1.



Kaavio 1. Tetraglysiinihypofosforihapokkeen valmistus.

8.1 Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus

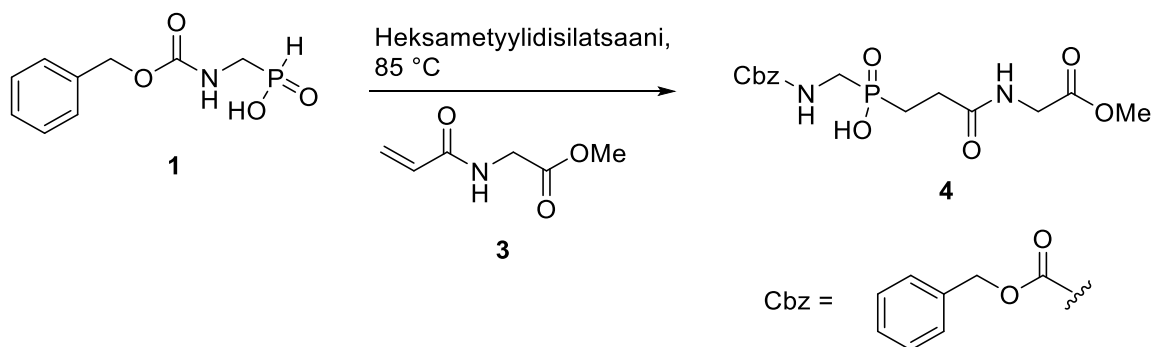
Suojattua aminometyylihypofosforihapoketta (**1**) valmistettiin suojaamalla aminometyylihypofosforihapoke (**2**) bentsyyliklooriformiaatilla. Reaktio esitetään kaaviossa 2. Suojattu aminometyylihypofosforihapoke kuivattiin vakuumissa ennen seuraavia vaiheita.



Kaavio 2. Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistaminen.

8.2 Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja *N*-akryloyylylglysiinin Michael-additio

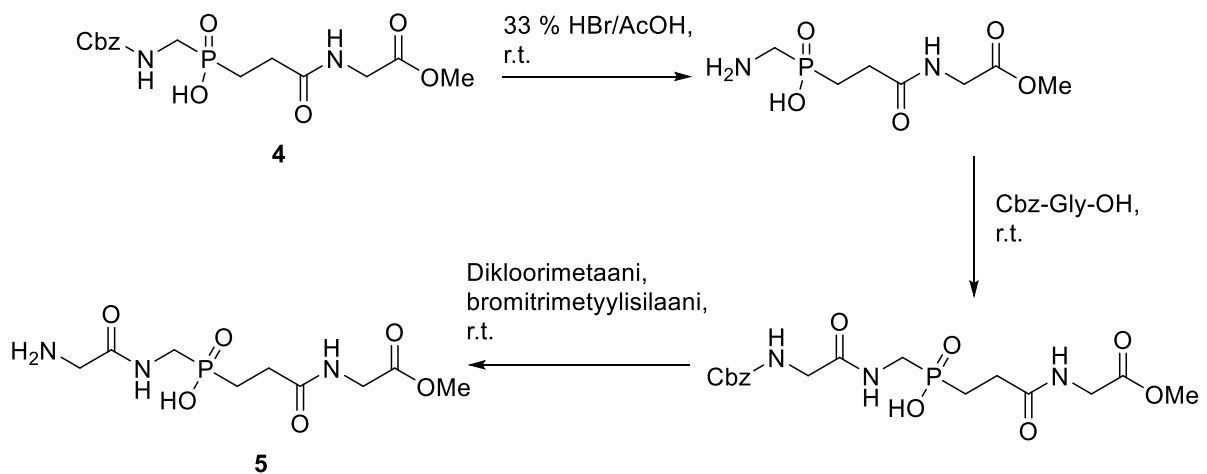
Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen (**1**) ja *N*-akryloyylylglysiinin (**3**) yhdistäminen aloitettiin muuttamalla suojattu aminometyylihypofosforihapoke (**1**) kolmivalenttiseksi esteriksi heksametyylidisiltaanin avulla. Tämän jälkeen *N*-akryloyylylglysiini (**3**) lisättiin seokseen. Reaktio esitetään kaaviossa 3.



Kaavio 3. Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja *N*-akryloyylylglysiinin yhdistäminen.

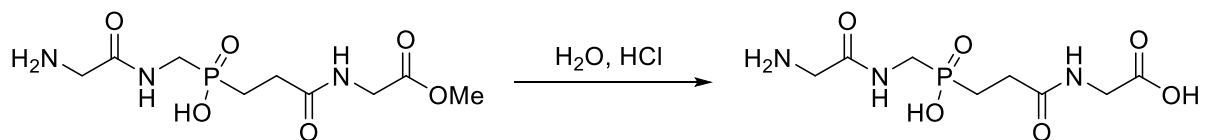
8.3 Tetraglysiinihypofosforihapokkeen valmistus

N-bentsyylioksikarbonyyliglysiinin (Cbz-Gly-OH) liittämiseksi yhdisteestä **4** poistettiin Cbz-suojaryhmä 33 % HBr/AcOH:n avulla. Tämän jälkeen seokseen lisättiin *N*-metyylimorfoliinilla ja isobutyryliklooriformiaatilla aktivoitu Cbz-Gly-OH. Lopuksi Cbz-Gly-OH:n sisältämä suojaryhmä poistettiin käyttäen dikloorimetaania ja bromitrimetyylisilaania. Reaktio esitetään kaaviossa 4.



Kaavio 4. *N*-bentsyylioksikarbonyyliglysiinin liittäminen.

Lopuksi tuote hydrolysoitiin veden ja HCl:n avulla. Reaktio esitetään kaaviossa 5.



Kaavio 5. Hydrolyysireaktio.

8.4 Liukenemattoman sakan käsittely

Tetraglysiinihypofosforihapokkeen (5) synteesin aikana seoksesta poistettiin liukenematon sakka ennen puhdistusvaiheita. Sakkaa haluttiin tutkia, sillä sen oletettiin sisältävän jotakin välituotetta, josta reaktiota voitaisiin mahdollisesti jatkaa ja näin saataisiin lisää tuotetta. Liukenemattoman sakan käsittely aloitettiin mittaamalla siitä ^1H NMR-spektri, jonka perusteella päätettiin käsitellä sitä vedellä ja HCl:lla. Tämän jälkeen mitattiin uusi ^1H NMR-spektri, jossa ei huomattu suuria muutoksia aiempaan verrattuna. Päätettiin käsitellä sakkaa kaavion 4 vaiheiden 2 ja 3 mukaisesti. Liukoisuuden parantamiseksi bromitrimetyylisilaani liuotettiin dikloorimetaanin sijaan kuivaan metanoliin. Bromitrimetyylisilaanin kosteusherkyys otettiin huomioon, ja metanolia kuivattiin molekyyliseuloilla vuorokauden ajan ennen reaktiota. Lisäksi refluksointilaitteistoon lisättiin kalsiumkloridi suojaaputki suojaamaan ilmankosteudelta.

9 TYÖN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Jokaisesta välituotteesta mitattiin vähintään ^1H NMR-spektri, jonka avulla pääteltiin, kuinka reaktio oli edennyt. Toinen lähtöaineista ja yksi välituotteista ei liuennut saatavilla oleviin NMR-liuottimiin, minkä vuoksi niistä mitattiin IR-spektrit. Lopullisesta tuotteesta mitattiin IR-spektri, massaspektri sekä erilaisia NMR-spektrejä. Välituotteille, jotka kiteytyivät hyvin, laskettiin myös saantoprosentti.

9.1 Lähtöaineiden (3 ja 2) tarkistus

Työ aloitettiin varmistamalla lähtöaineiden tila. *N*-akryloyylylglysiinaatin (**3**) ^1H NMR-spektrissä (liite 1) havaittiin O-H-protoni kemiallisella siirtymällä $\delta=3,7$ ppm (singletti), typen ja karbonyylihiilen välissä olevat CH_2 -protonit kemiallisella siirtymällä $\delta=4,0$ ppm (dubletti) ja kaksoissidoksen protonit kemiallisilla siirtymillä $\delta=5,7$ ppm (multipletti) ja $\delta=6,2-6,3$ ppm (multipletti). Typen ja karbonyylihiilen välisten protonien signaali (dubletti singletin sijasta) ja yhden kaksoissidos protonin signaali (multipletti dubletin dubletin sijaan) erosivat sekä ennustetusta että samasta yhdisteestä aiemmin mitatusta ^1H NMR-spektristä. Erojen arvellaan johtuvan siitä, että tuotetta on kuivattu vakuuissa. Tällöin kaikki liuotinjäämät on saatu poistettua, eikä N-H-protonien vaihto ole enää huomattavaa. Tällöin N-H-protoni kytkeytyy viereisiin protoneihin ja niiden ^1H NMR-signaalit jakautuvat. Lisäksi siirtymällä $\delta=3,7$ ppm esiintyvän signaalin integraali on yksi, eli lähtöaineen metyyliesteri on mahdollisesti osittain hajonnut karboksyylihapoksi. Metyyliesteri pyrittiin palauttamaan antamalla yhdisteen reagoida metanolin kanssa rikkihapon läsnä ollessa. ^1H NMR-spektrin perusteella yhdiste kuitenkin hajosi. *N*-akryloyylylglysiinaattia päätettiin siis käyttää sellaisenaan.

Aminometyylihypofosforihapoke (**2**) ei liuennut mihinkään saatavilla olleeseen NMR-liuottimeen, joten siitä mitattiin IR-spektri (liite 2). Spektrissä havaittiin heikko signaali noin aaltoluvulla 3000 cm^{-1} , joka sopii aminoryhmän N-H-venytysvärähdykseen. Aaltoluvulla 2350 cm^{-1} havaittiin C-H-sidosten värähdyksiä, ja sormenjälkialueella havaittiin aaltoluvulla 1000 cm^{-1} P=O-sidoksen absorptiosta aiheutuva signaali. Spektri vastasi yhdisteestä aiemmin mitattua spektriä.

9.2 Suojattu aminometyylihypofosforihapoke (1)

Valmistettu suojattu aminometyylihypofosforihapoke (1) oli valkoista ja vakuumikuivatuksen jälkeen sen massa oli 0,464 g. Tuotteen saantoprosentti oli 9,6 %. Tuotteen muodostuminen varmistettiin NMR-spektroskopian avulla ja saatua spektriä verrattiin myös yhdisteen kirjallisuudesta löytyvään spektriin. ^1H NMR-spektrissä (liite 3) havaittiin kemiallisen siirtymän arvolla $\delta=3,4$ ppm typen ja fosforin välisten CH_2 -protonien signaali (dubletti) ja kemiallisen siirtymän arvolla $\delta=5,1$ ppm fenyyli-ryhmän ja hapen välisten CH_2 -protonien signaali (singletti). Aromaatisten protonien signaali havaittiin kemiallisen siirtymän arvolla $\delta=7,2\text{--}7,5$ ppm (multipletti). Ennustettuun ja yhdisteestä aiemmin mitattuun ^1H NMR-spektriin verrattuna typen ja fosforin välisten protonien signaali oli dubletti singletin sijasta. On kuitenkin mahdollista, että fosfori kytkeytyy protoneihin ja aiheuttaa signaalin jakautumisen. Itse asiassa myös yhdisteestä aiemmin mitatussa spektrissä signaalissa on havaittavissa hienorakennetta.

9.3 Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen (1) ja *N*-akryloyylylglysinaatin (3) Michael-additio

Oletettua *N*-akryloyylylglysinaattiaminometyylihypofosforihapoketta (4) saatiin 0,155 g, mikä vastaa saantoprosenttia 22 %. Oletetusta tuotteesta mitattiin ^1H NMR-spektri (liite 4) useaan kertaan, mutta jostain syystä spektrissä havaittiin vain liuottimen signaalit. On mahdollista, ettei tuote liennut käytettyyn NMR-liuottimeen. Lisäksi on mahdollista, että synteesissä ei syntynyt haluttua tuotetta. *N*-akryloyylylglysinaatti ei liennut refluksoinnin aikana, mikä todennäköisesti on vaikuttanut reaktion etenemiseen. Oletetusta tuotteesta mitattiin myös ^{13}C - ja ^{31}P NMR-spektrit, joissa ei myöskään havaittu halutun tuotteen resonanssisignaaleja.

Tuotteesta mitattiin myös IR-spektri (liite 5), jonka perusteella tuote on orgaaninen yhdiste. Spektrissä aaltoluvulla 1731 cm^{-1} havaitaan $\text{C}=\text{O}$ -venytysvärähdyks, aaltoluvulla 1398 cm^{-1} mahdollisesti $\text{O}-\text{H}$ -taivutus ja alueella $3125\text{--}2808\text{ cm}^{-1}$ $\text{N}-\text{H}$, $\text{C}-\text{H}$ ja $\text{O}-\text{H}$ -sidosten venytysvärähdyksiä. Lisäksi aromaattisen renkaan $\text{C}-\text{C}$ -värähtely voisi aiheuttaa havaitun signaalin aaltoluvulla 1539 cm^{-1} ja $\text{C}-\text{N}$ -venytykset signaaleja alueella $1208\text{--}1026\text{ cm}^{-1}$. IR-spektrin perusteella synteesiä päätettiin jatkaa kyseisestä välituotteesta.

Jälkeenpäin tarkasteltuna on mahdollista, että tuotteeksi saatiin *N*-akryloyylylglysiinaatti-aminometyylihypofosforihapokkeen sijasta esimerkiksi *N*-akryloyylylglysiinaatin suolaa. IR-spektrin signaali aaltoluvulla 2808 cm^{-1} voisi johtua esimerkiksi amiinin suolan N-H-sidoksesta. Jos lähtöaineiden yhdistäminen ei onnistunut, voisi *N*-akryloyylylglysiinaatin suolan muodostuminen olla jopa todennäköistä. Suolan muodostuminen selittäisi myös välituotteen heikon liukoisuuden orgaanisiin liuottimiin, metanoliin ja DMSO:iin.

9.4 Tetraglysiinihypofosforihapoke (5)

Liukenemattomuus oli ongelmana myös tässä synteesivaiheessa. Erityisesti liittäessä Cbz-Gly-OH:a *N*-akryloyylylglysiinaatti-aminometyylihypofosforihapokkeeseen reaktioseokseen jäi liukenematonta sakkaa. Se erotettiin liuoksesta ennen synteesin jatkamista. Sakan poistamisen jälkeen reaktioseoksen käsittelyä jatkettiin kaavion 4 vaiheen 3 mukaisesti. Lopulta saatiin pieni määrä ruskeaa öljymäistä tuotetta, josta mitattiin ^1H NMR- (liite 6) ja ^{13}P NMR (liite 7) -spektrit metanolissa. Protonispektrissä nähtiin voimakkaina liuottimena käytetyn metanolin signaalit, mutta myös muita signaaleja, joiden intensiteetti oli melko alhainen. Ensimmäisellä kerralla mitatussa fosforispektrissä havaittiin muutama heikko signaali, mutta ei oletettua yksittäistä vahvaa signaalia. Suoraan fosforissa kiinni oleva protoni voisi kytkeytyä fosforiin ja jakaa signaalin dubletiksi vastaten mitattua spektriä. Tämä kuitenkin tarkoittaisi sitä, että työssä ei olisi syntynyt tavoiteltua tuotetta, sillä siinä fosforissa ei ole suoraan kiinni protonia. Fosforisignaali oli kuitenkin hyvin heikko, eikä toisessa mittauksessa signaaleja enää havaittu. Jos yhdisteessä on fosforia, sitä on todennäköisesti hyvin vähän.

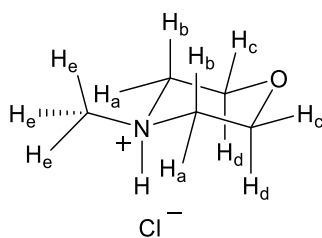
Spektrien avulla ei pystytty päättelemään, mitä yhdisteitä reaktiossa oli syntynyt. Tavoiteltua tuotetta reaktiokolvi ei vaikuta sisältävän, sillä mitatun ^1H NMR-spektrin protonien määrä on vähäisempi kuin tavoitellussa tuotteessa. Öljyn ruskeahkon värin perusteella tuote voisi sisältää bromia, jota on voinut jäädä reaktioseokseen. Koska reaktioseoksesta mitatussa ^1H NMR-spektrissä havaitaan signaali kemiallisen siirtymän arvolla $\delta=0,2\text{ ppm}$, voisi seokseen olla jäänyt reagenssina käytettyä bromitrimetyylisilaania.

9.5 Liukenematon sakka

Tetraglysiinihypofosforihapokkeen valmistusvaiheessa erotettua liukenematonta sakkaa päätettiin tutkia tarkemmin. Koska alkuperäinen reaktio ei tuottanut haluttua yhdistettä, ajateltiin sakkaa mahdollisena välituotteena, josta voitaisiin jatkaa kohti tavoiteltua tuotetta. Sakasta mitatun ^1H NMR-spektrin (liite 8) avulla pääteltiin, että sakka voisi olla tetraglysiinihypofosforihapokkeen metyyliesteriä. Spektrissä siirtymällä $\delta=2,9$ ppm havaittu voimakas singletti voisi vastata CH_3 -ryhmää.

Liukenemattoman sakan käsittely aloitettiin hydrolyysireaktiolla, jonka tavoitteena oli purkaa metyyliesterisuojaus. ^1H NMR-spektrin (liite 9) perusteella vaikutti kuitenkin siltä, että Cbz-Gly-OH ei ollut liittynyt *N*-akryloyyliyglysiinihypofosforihapokkeeseen. Cbz-Gly-OH lisättiin uudelleen, minkä jälkeen synteesiä jatkettiin bromitrimetyylisilaani-käsittelyllä ja lopuksi tehtiin hydrolyysireaktio veden ja HCl:n avulla.

^{31}P NMR-spektrissä ei havaittu signaaleja. ^1H NMR-spektrissä (liite 10) havaitut voimakkaimmat signaalit vastaavat todennäköisesti *N*-metyylimorfolinium-kloridia. *N*-metyylimorfolinium-kloridia on onnistuttu erottamaan aiemminkin⁵⁰, jolloin kiteiden todettiin olevan vetistyyviä. Tämä sopii myös nyt saatuun lopputuotteeseen. *N*-metyylimorfolinium-kloridin oletettu kolmiulotteinen rakenne on esitetty kuvassa 25. Sen CH_2 -protonit ovat kemiallisesti ei-ekvivalentteja. ^1H NMR-spektrissä siirtymillä $\delta=3,2$ ppm (dubletin tripletti) ja $\delta=3,5$ ppm (dubletti) havaitaan H_a - ja H_b - protonien signaalit, ja siirtymillä $\delta=3,8$ ppm (tripletti) ja $\delta=4,1$ ppm (dubletin dubletti) puolestaan H_c - ja H_d - protonien signaalit. Metyyliryhmän H_e -protonien signaali havaitaan siirtymällä $\delta=2,9$ ppm (singletti). ^{13}C NMR-spektrissä havaitaan kolme signaalia. Metyyliryhmän hiilen signaali havaitaan siirtymällä $\delta=42,7$ ppm, tyypeä lähempänä olevien renkaan hiilien signaali siirtymällä $\delta=53,3$ ppm ja happea lähempänä olevien renkaan hiilien signaali siirtymällä $\delta=63,8$ ppm.



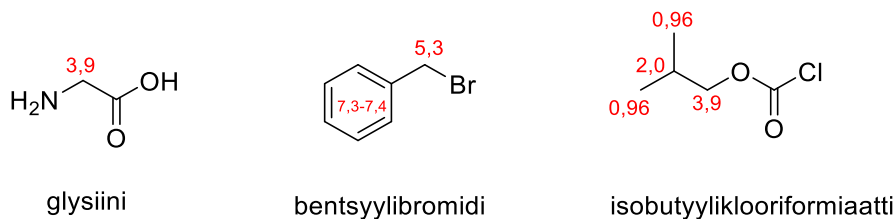
Kuva 25. *N*-metyylimorfolinium-kloridin kolmiulotteinen rakenne ja protonien assignointi.

Massaspektrometria vahvisti epäilykset *N*-metyylimorfoliinista, sillä positiivista ionisaatiota käyttäen mitatussa massaspektrissä (liite 11) näkyvä m/z 102,09 täsmää hyvin *N*-metyylimorfoliinin $[M+H]^+$ ioniin. Myös IR-spektri (liite 12) vahvistaa oletusta *N*-metyylimorfoliinista tai *N*-metyylimorfolinium-kloridista, sillä spektrissä havaitaan signaalit aallonpituuksilla 3368 cm^{-1} ja 1651 cm^{-1} . Nämä voisivat vastata sekundaarisen N-H-sidoksen ja C=O-sidoksen aallonpituuksia.

Mukana voi myös olla hieman *N*-metyylimorfoliini-*N*-oksidia. Oksidia olisi mahdollista muodostua, jos liuottimena käytetyssä tetrahydrofuraanissa (THF) on muodostunut peroksiedeja. Peroksidien muodostuminen THF:ssa on mahdollista hapen läsnä ollessa. THF:n kuivauksen aikana astia oli varustettu kalsiumkloridiputkella, joka estää kosteuden, mutta ei hapen, pääsyn astiaan. Lisäksi kuivattu THF seiso useita päiviä kyseisessä astiassa, jolloin peroksiedeja on voinut muodostua. *N*-metyylimorfoliini-*N*-oksidin läsnäoloa tukee myös negatiivista ionisaatiota käyttäen mitattu massaspektri (liite 13), josta voisi löytyä sopivia fragmentteja. Esimerkiksi $[2M+Na-H]^-$ -ionin laskettu m/z arvo olisi 255,13 ja spektrissä havaitaan piikki arvolla m/z 255,23. Lisäksi spektrissä havaitaan piikki arvolla m/z 297,15, joka voisi vastata ionia $[2M+2MeOH-H]^-$, jonka laskettu m/z arvo on 297,20. Toisaalta IR-spektrissä ei havaita *N*-metyylimorfoliini-*N*-oksidin N-O-sidoksen absorptiosignaaleja, joten jos mukana on oksidia, määrä on hyvin pieni. N-O-sidoksen absorptiosignaalit esiintyisivät noin aallonpituusalueella $1550\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$.

N-metyylimorfoliinin lisäksi yhdisteen ^1H NMR-spektrissä havaitaan siirtymällä $\delta=3,9$ ppm singletti. Kyseisillä protoneilla ei vaikuta 2D-spektrien perusteella olevan korrelaatiota muihin protoneihin, mutta korrelaatio tyypen ja karbonyylihiileen on. Näiden perusteella seoksessa voisi lisäksi olla käytetystä *N*-bentsyylioksikarbonyyliglysiinistä Cbz-suojaryhmän poiston jälkeen jäljelle jäänyt glysiini. 800 MHz NMR-spektrometrillä mitatussa ^1H NMR-spektrissä havaitaan tarkemmin pienellä intensiteetillä esiintyviä signaaleja. Näiden perusteella pyrittiin selvittämään, mitä lähtöaineille on tapahtunut ja sisältääkö lopullinen reaktioseos edellisissä kappaleissa tunnistettujen yhdisteiden lisäksi vielä muita yhdisteitä. Liitteessä 14 esitetään ^1H NMR-spektri, jossa heikompien signaalien intensiteettejä on kasvatettu. 2D NMR-kokeiden perusteella pystyttiin päättämään ydinten välisiä korrelaatioita. $^1\text{H},^1\text{H}$ TOCSY-spektrissä havaittiin korrelaatio esimerkiksi aromaattisen alueen protonien ($\delta=7,3\text{--}7,4$ ppm) ja CH_2 -protonien ($\delta=5,3$ ppm (singletti)) välillä. Tämä voisi viitata Cbz-suojaryhmän poistossa muodostuneeseen bentsyylibromidiin. Lisäksi havaitaan mahdollisesti

isobutyryliklooriformiaatin signaalit siirtymillä $\delta=0,96$ ppm (dubletti), $\delta=2,0$ ppm (multipletti) ja $\delta=3,9$ ppm (dubletti). Siirtymän $\delta=3,9$ ppm protonien ja karbonyylihiilen välillä havaitaan korrelaatio $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC-spektrissä, mikä sopisi hyvin isobutyryliklooriformiaattiin. Kuvassa 26 on esitetty *N*-metyylimorfoliinin lisäksi reaktioseoksessa oletetusti olevien yhdisteiden rakenteet ja punaisella niiden protonien NMR-siirtymät (ppm).



Kuva 26. *N*-metyylimorfoliinin lisäksi reaktioseoksessa oletetusti olevat yhdisteet ja niiden protonien NMR-siirtymät (ppm).

10 YHTEENVETO

Bakteerien vastustuskyky nykyisiä antibiootteja vastaan on jatkuvasti muuttuva ja kasvava ongelma, minkä takia uusia erilaisia antibiootteja on kehitettävä. Bakteerien peptidoglykaanin synteesi ja siihen vaikuttavat entsyymit ovat hyvä kohde lääkeaineille, sillä ihmisen solut eivät sisällä soluseinää. Lisäksi yksittäisten synteesivaiheiden rajoittaminen estää synteessin etenemisen ja heikentää peptidoglykaania, mikä johtaa bakteerisolujen hajoamiseen.

Siirtymätila-analogeja on tutkittu aktiivisesti, sillä ne sitoutuvat entsyymiin huomattavasti paremmin, kuin substraatti. Niiden avulla on tutkittu entsyymien reaktiomekanismeja sekä sitoutumiseen ja katalyysiin osallistuvia aminohappoja. Niitä on myös kehitetty entsyymien inhibiittoreiksi, joita voitaisiin käyttää lääkeaineina. Siirtymätila-analogien pohjalta suunnitelluista lääkeaineista esimerkkinä ovat HIV-infektiota vastaan kehitetyt HIV-proteaasi-inhibiittorit Saquinavir ja Darunavir.

Tässä työssä tavoitteena oli valmistaa lysostafiinientsyymien siirtymätila-analogia, tetraglysiinifosfinaattia, siinä kuitenkin onnistumatta. Pääosin saatu reaktioseos vaikutti sisältävän reagenssina käytettyä *N*-metyylimorfoliinia tai sen suolaa *N*-metyylimorfolinium-kloridia, sekä hieman muitakin käytettyjä reagensseja tai niiden osia, kuten glysiiniä, bentsyylibromidia ja isobutyylidiklooriformiaattia.

Jälkikäteen spektrejä analysoidessa huomataan, että tetraglysiinihypofosforihapoketta valmistettaessa muodostuneen liukenemattoman sakan ¹H NMR-spektri ei juurikaan muutu Cbz-Gly-OH:n liittämisen uusinnasta huolimatta. Se vahvistaa *N*-metyylimorfoliinin tai *N*-metyylimorfolinium-kloridin muodostumisen. Jos liukenematon sakka, josta synteesiä jatkettiin, olisi sisältänyt pääosin jotakin toivottua välituotetta, sen olisi pitänyt reagoida seuraavissa vaiheissa. Oletettavasti suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja *N*-akryloyylylglysiinin yhdistämisvaiheessa lähtöaineet eivät ole yhdistyneet tai ne ovat hajonneet. Epäonnistuneen reaktion seurauksena fosforia sisältävä molekyylin osa ei ole ollut enää mukana saadussa välituotteessa tai sitä on ollut hyvin vähän. Tätä oletusta tukee se, että ensimmäisen loppuun saatetun synteessin reaktiokolvissa olevasta seoksesta mitatussa ³¹P NMR-spektrissä havaitaan hyvin heikko fosforisignaali, ja liukenemattomasta sakasta loppuun saakka jatkettun synteessin reaktiokolvissa olevasta seoksesta mitatussa spektrissä fosforia ei havaita ollenkaan. IR-spektreissä ei myöskään havaittu selkeästi

aminometyylihypofosforihapokkeen spektrissä havaittua P=O absorptiota aaltoluvulla 1000 cm^{-1} .

Synteesin onnistumisen kannalta olisi voinut olla hyödyllistä seurata reaktioiden etenemistä TLC:n avulla, jolloin olisi havaittu, jos jokin reaktio ei olisi edennyt loppuun. Tämä olisi voinut helpottaa tuotteen tunnistamista. Lisäksi työn aikana olisi pitänyt kiinnittää tarkemmin huomiota reaktio-olosuhteisiin. Vaikka kaikkien reagenssien käyttöturvallisuustiedotteet oli luettu etukäteen ja tärkeimmät tiedot reagensseista kirjattu ylös laboratoriapäiväkirjaan, bromitrimetyylisilaaania käytettäessä unohdettiin ensimmäisellä kerralla käyttää kosteutta sitovaa kalsiumkloridiputkea refluksointilaitteistossa. Tällöin bromitrimetyylisilaani on voinut reagoida veden kanssa, minkä vuoksi reaktio ei ole välttämättä edennyt odotetusti.

Jos kyseinen synteesi suoritettaisiin uudelleen, tehtäisiin jokainen reaktio varmuuden vuoksi typen alla. Lisäksi lähtöaineiden pitkää varastointia kannattaisi välttää. Vaikka lähtöaineet vaikuttivat NMR- ja IR-spektrien perusteella olevan kunnossa, oli esimerkiksi *N*-akryloyylylglysiinaatin väri muuttunut kirkkaasta keltaiseksi. Myös useiden välituotteiden heikko liukoisuus on voinut olla yksi vaikuttavista tekijöistä synteesin epäonnistumiseen. Olisi ollut hyödyllistä myös mitata useampia eri NMR-mittauksia ensimmäisenä loppuun saatetun synteesin reaktiokolvissa olleesta seoksesta, jotta yhdisteet olisi saatu tunnistettua. Valitettavasti lisämittauksia ei ehditty tekemään, koska näytteet oli jo ehditty hävittää laboratorion.

11 SYNTEESIOHJEET

11.1 Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen valmistus

Valmistettiin ensin 100 ml 0,86 M kaliumkarbonaattiliuosta punnitsemalla 11,888 g kaliumkarbonaattia ja liuotettiin se 100 ml mittapullossa ionivaihdettuun veteen.

Punnittiin 1,999 g aminometyylihypofosforihapoketta ja siirrettiin se kolmikaulakolviin ja kolvi kiinnitettiin refluksointilaitteistoon. Kolviin lisättiin 21,5 ml aiemmin valmistettua 0,86 M kaliumkarbonaattiliuosta mittalasin tarkkuudella. Seoksen lämpötila laskettiin nolnaan celsiusasteeseen upottamalla kolvi jäihin. 0 °C liuokseen lisättiin 4,12 ml bentsyyliklooriformiaattia 0,2 ml erissä, minkä jälkeen seos jätettiin sekoittumaan huoneenlämpöön yöksi.

Seuraavana päivänä seokseen lisättiin vielä kaksi kertaa 0,5 mooliekvivalenttia, eli 1,5 ml, bentsyyliklooriformiaattia, ja seoksen annettiin sekoittua tunti. Tämän jälkeen seos pestiin 35 ml:lla vettä. Saatu vesiliuos pestiin vielä etyyliasetaatilla (3x30 ml) ja tolueenilla (1x30 ml). Puhdistettu vesifaasi kaadettiin dekantterilasiin, johon oli valmiiksi punnittu 130 g jäitä. Jäiden sulamisen jälkeen liuos happamoitettiin 1 M HCl liuoksella niin, että liuoksen pH oli noin 2. 1 M HCl-liuos valmistettiin 37 % HCl-liuoksesta. Seokseen muodostui valkoista sakkaa, joka imusuodatettiin ja jätettiin kuivumaan kellolasille yöksi. Sitä kuivattiin vielä yön ajan vakuuissa. Tuotetta saatiin 0,464 g (9,6 %). ¹H NMR (300 MHz in CDCl₃): δ = 3.4 (2H, d), 5.1 (2H, s), 7.2–7.5 (5H, m) ppm.

11.2 *N*-akryloyyliyglysinaatin esteröinti

Punnittiin 25 ml kolviin 0,305 g Ojalan valmistamaa *N*-akryloyyliyglysinaattia, ja lisättiin 10 ml metanolia ja 1 pisara väkevää rikkihappoa. Tämän jälkeen seosta refluksoitiin 30 minuutin ajan. Refluksoinnin jälkeen seosta uutettiin 30 ml:llä dietyylieetteriä. Eetterikerros pestiin vedellä (25 ml) ja kylläisellä natriumkloridiliuoksella (25 ml), jolloin muodostui sakka, joka erotettiin liuoksesta. Eetterikerros kuivattiin natriumsulfaatilla, minkä jälkeen kuivausaine suodatettiin pois ja eetterikerros haihdutettiin rotavaporilla.

Kolviin jääneestä jäännöksestä sekä muodostuneesta sakasta mitattiin ¹H NMR-spektrit. Liuottimena käytettiin metanolia. Spektreissä ei havaittu esteröitynyttä

N-akryloyylylglysinaattia; sakasta mitatussa spektrissä havaittiin vain liuotin, ja kolviin jääneestä jäännöksestä mitatun spektrin perusteella vaikutti siltä, että *N*-akryloyylylglysinaatti oli hajonnut. Uutosta jääneet vesikerrokset haihdutettiin vielä kuiviin ja jäännöksistä mitattiin ¹H NMR-spektrit, mutta esteröitynyttä *N*-akryloyylylglysinaattia ei havaittu. Päätettiin käyttää Ojalan valmistamaa *N*-akryloyylylglysinaattia sellaisenaan ilman esteröintiä.

11.3 Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja *N*-akryloyylylglysinaatin Michael-additio

Valmistettiin 4 M HCl-liuosta sekoittamalla 10 ml mittapullossa 3,333 ml 37 % HCl-liuosta ionivaihdettuun veteen.

Punnittiin 50 ml kaksikaulakolviin 0,427 g suojattua aminometyylihypofosforihapoketta. Lisättiin kolviin 1,946 ml heksametyylidisilatsaania, ja sekoitettiin seosta refluksointilaitteistossa typen alla noin 95 °C:ssa kahden tunnin ajan. Annettiin liuoksen jäähtyä 40 °C:een ja lisättiin sekaan 0,319 g *N*-akryloyylylglysinaattia. Lämmitettiin seos 85 °C:een ja sekoitettiin 3 tunnin ajan. *N*-akryloyylylglysinaatti ei liennut juuri ollenkaan.

Vaikka *N*-akryloyylylglysinaatti ei liennut, päätettiin jatkaa reaktiota. Jäähdytettiin seos noin 40 °C:een ja lisättiin tiputussuppilosta tipoitain 10 ml metanolia. Refluksoitiin seosta yön yli 80 °C:ssa. Haihdutettiin rotavaporilla haihtuvat yhdisteet, jolloin saatiin oranssi tahmea jäännös. Jäännös ei kuitenkaan ollut homogeenistä, kuten ohjeessa¹³ sanottiin. Liuotettiin tuote 10 millilitraan metanolia ja happamoitettiin se 25 pisaralla 4 M HCl:a, jolloin pH oli noin 2. Suodatettiin imusuodatuksen avulla sakka pois ja sekoitettiin suodos 90 ml:aan dietyylieetteriä. Muodostunut osittain valkea ja osin rusehtava sakka suodatettiin imusuodatuksen avulla ja siirrettiin kellolasille kuivumaan. Tuotetta saatiin 0,155 g (22 %).

Tuotteesta mitattiin ¹H NMR-spektri metanolissa ja ¹³C NMR-spektri DMSO:ssa. Spektreissä ei havaittu halutun tuotteen signaaleja, vaan pelkästään liuottimen signaalit. Tämän jälkeen tuotteesta mitattiin IR-spektri, jonka perusteella synteesiä päätettiin jatkaa edelleen.

11.4 Tetraglysiinihypofosforihapokkeen valmistus

Lisättiin kolviin edellisessä vaiheessa saatu tuote ja 1,1 ml 33 % HBr-liuosta etikkahapossa. Sekoitettiin seosta kahden tunnin ajan huoneenlämmössä. Haihdutettiin rotavaporilla seoksesta liuotin pois, jolloin jäljelle jäi vaalean kellertävä sakka. Huuhdeltiin sakka dietyylieetterillä (3x7 ml).

Punnittiin toiseen kolviin 0,076 g Cbz-Gly-OH:ta ja lisättiin sekaan 3,7 ml kuivaa THF:a, 0,088 ml *N*-metyylimorfoliinia ja 0,05 ml isobutyryliklooriformiaattia. Sekoitettiin puolen tunnin ajan. Lisättiin valmistettu aktivoitu Cbz-Gly-OH edellisessä vaiheessa saadun pestyn sakan sekaan ja jätettiin sekoittumaan huoneenlämpöön yön yli. Sakka ei liennut yön aikana.

Seoksesta haihdutettiin liuotin pois rotavaporilla. Lisättiin jäännöksen sekaan 10 ml etyyliasetaattia ja happamoitettiin liuos 15 pisaralla 4 M HCl-liuosta, jolloin pH oli noin 3. Imusuodatettiin sakka pois, ja otettiin se talteen mahdollisia jatkotutkimuksia varten. Pestiin orgaaninen kerros kaksi kertaa 4 ml väkevällä natriumkloridiliuoksella ja kuivattiin se natriumsulfaatilla. Haihdutettiin liuotin pois rotavaporilla, jolloin jäljelle jäi oranssi öljymäinen jäännös.

Sekoitettiin 1,1 ml dikloorimetaania ja 0,96 ml bromitrimetyylisilaania toisiinsa, ja lisättiin liuos jäännöksen sekaan. Jätettiin sekoittumaan viikonlopun yli huoneenlämpöön refluksointilaitteistoon. Koska reaktiosta puuttui kalsiumkloridiputki, osa liuottimesta oli päässyt haihtumaan ja kosteus saattoi vaikuttaa reaktioon. Haihdutettiin jäljelle jäänyt liuotin rotavaporilla. Jäännös oli tässä vaiheessa tummaa ja öljymäistä.

Lisättiin jäännökseen 0,74 ml vettä ja sekoitettiin tunnin ajan huoneenlämmössä. Lisättiin vielä 1,84 ml 37 % HCl-liuosta ja jätettiin seos sekoittumaan yön yli. Haihdutettiin liuotin pois rotavaporilla, jolloin jäljelle jäi tumman ruskeahko liuos. Saadun tuotteen määrä oli niin vähäinen, ettei sille saatu laskettua saantoa. ^1H NMR (300 MHz in MeOD): $\delta = 0.2$ (2H, dd, $J_1=6.7$ Hz, $J_2=1.6$ Hz), 1.3 (1H, s), 3.0 (3H, s) ppm. ^{13}P NMR (121.5 MHz in MeOD): $\delta = 5.5$ (d) ppm.

11.5 Liukenemattoman sakan käsittely

Tetraglysiinihypofosforihapokkeen synteesin aikana syntyneestä suodatetusta liukenemattomasta sakasta mitattiin ^1H NMR-spektri, jonka perusteella pääteltiin, että se voisi sisältää tavoitellun tuotteen metyyliesteriä, joka hydrolysoitiin. ^1H NMR (300 MHz in MeOD): $\delta = 2.9$ (3H, s), 3.1 (2H, td, $J_1=12$ Hz, $J_2=3.3$ Hz), 3.4 (2H, d), 3.7 (3H, t), 4.0 (2H, dd, $J_1=13$ Hz, $J_2=3.1$ Hz) ppm.

Lisättiin sakan sekaan 1 ml vettä, annettiin sekoittua tunti ja lisättiin vielä 2,5 ml 37 % HCl-liuosta. Annettiin sekoittua yön yli huoneenlämmössä. Haihdutettiin liuotin pois rotavaporilla, jolloin jäljelle jäi öljymäistä tuotetta, jossa oli vaalean keltaisia kiteitä. Mitatun ^1H NMR-spektrin perusteella yhdiste ei ollut reagoanut Cbz-Gly-OH:n kanssa, joten tehtiin sen lisäys uudelleen. ^1H NMR (300 MHz in MeOD): $\delta = 2.3$ (3H, s), 3.0 (2H, t), 3.3 (2H, d), 3.6 (2H, t), 3.9 (2H, d) ppm.

Punnittiin 0,107 g Cbz-Gly-OH:ta ja lisättiin sen joukkoon 5,2 ml kuivaa THF:a, 0,130 ml *N*-metyylimorfoliinia ja 0,08 ml isobutyliklooriformiaattia. Sekoitettiin puolen tunnin ajan. Lisättiin erilliseen kolviin käsiteltävä sakka, jota oli 0,193 g, ja lisättiin sekaan valmistettu aktivoitu Cbz-Gly-OH. Sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä refluksointilaitteistossa typen alla. Haihdutettiin liuotin pois rotavaporilla, jolloin jäljelle jäi oranssin kellertävä vahamainen sakka.

Sekoitettiin toisiinsa 1,4 ml bromitrimetyylisilanaa ja 1,565 ml molekyyliseuloilla kuivatettua metanolia. Lisättiin liuos varovasti sakan sekaan ja jätettiin sekoittumaan viikonlopun yli refluksointilaitteistoon, joka oli suojattu kalsiumkloridiputkella. Haihdutettiin liuotin pois rotavaporilla, jolloin jäljelle jäi kellertävän ruskea öljymäinen tuote, jossa oli pieniä kiteitä.

Lisättiin kolviin 1,043 ml vettä, sekoitettiin tunti, ja lisättiin 2,608 ml 37 % HCl-liuosta. Annettiin seoksen sekoittua yön yli huoneenlämmössä. Haihdutettiin liuotin pois rotavaporilla, ja jätettiin jäännös vielä vetokaappiin haihtumaan. Tuote oli keltaisen ruskeaa nestettä, joka kiteytyi osittain ajan kanssa. Tuotteelle ei saatu laskettua saantoa.

Tuotteesta mitattiin ^1H NMR, ^{13}C NMR, $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HMBC, $^1\text{H},^{15}\text{N}$ HMBC, $^1\text{H},^1\text{H}$ TOCSY ja $\{^1\text{H}\}^{31}\text{P}$ NMR-spektrit. Lisäksi tuotteesta mitattiin massaspektrit sekä positiivisella että negatiivisella ionisaatiolla. Liuottimena käytettiin metanolia.

^1H NMR (800 MHz in MeOD): $\delta = 2.9$ (3H, s, H_e), 3.2 (2H, td, H_a tai H_b , $J_1=12$ Hz, $J_2=2.8$ Hz), 3.5 (2H, d, H_a tai H_b), 3.8 (2H, t, H_c tai H_d), 4.1 (2H, dd, H_c tai H_d , $J_1=13$ Hz, $J_2=2.1$ Hz) ppm. ^{13}C NMR (200 MHz in MeOD): $\delta = 42.7, 53.3, 63.8$ ppm. MS: m/z 102,09 $[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}+\text{H}]^+$.

KIRJALLISUUSLUETTELO

1. Vollmer, W.; Blanot, D. ja De Pedro, M. A., Peptidoglycan structure and architecture, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 149–167.
2. Silhavy, T. J.; Kahne, D. ja Walker, S., The bacterial cell envelope, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2010**, *2*.
3. Anderson, R. J.; Groundwater, P. W.; Todd, A. ja Worsley, A. J., *Antibacterial Agents: Chemistry, Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Clinical Applications*, Wiley, 2012.
4. Garde, S.; Chodisetti, P. K. ja Reddy, M., Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation, *EcoSal Plus*, **2021**, *9*.
5. Vollmer, W., Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 287–306.
6. Sarkar, P.; Yarlagadda, V.; Ghosh, C. ja Haldar, J., A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics, *MedChemComm*, **2017**, *8*, 516–533.
7. Holliday, G. L.; Fischer, J. D.; Mitchell, J. B. O. ja Thornton, J. M., Characterizing the complexity of enzymes on the basis of their mechanisms and structures with a bio-computational analysis, *FEBS Journal*, **2011**, *278*, 3835–3845.
8. Evans, G. B.; Schramm, V. L. ja Tyler, P. C., The transition to magic bullets – transition state analogue drug design, *MedChemComm*, **2018**, *9*, 1983–1993.
9. Gluza, K. ja Kafarski, P., Transition State Analogues of Enzymatic Reaction as Potential Drugs. Teoksessa: El-Shemy, H. A. (toim.), *Drug Discovery*, InTech, Kroatia, 2013.
10. Porfirio, S.; Carlson, R. W. ja Azadi, P., Elucidating Peptidoglycan Structure: An Analytical Toolset, *Trends Microbiol.*, **2019**, *27*, 607–622.
11. Sharma, A. K.; Kumar, S.; K., H.; Dhakan, D. B. ja Sharma, V. K., Prediction of peptidoglycan hydrolases- a new class of antibacterial proteins, *BMC Genomics*, **2016**, *17*, 411.

12. Vollmer, W.; Joris, B.; Charlier, P. ja Foster, S., Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 259–286.
13. Firczuk, M.; Mucha, A. ja Bochtler, M., Crystal structures of active LytM, *J. Mol. Biol.*, **2005**, *354*.
14. Bastos, M. do C. de F.; Coutinho, B. G. ja Coelho, M. L. V., Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications, *Pharmaceuticals*, **2010**, *3*, 1139–1161.
15. Tossavainen, H.; Raulinaitis, V.; Kauppinen, L.; Pentikäinen, U.; Maaheimo, H. ja Permi, P., Structural and Functional Insights Into Lysostaphin–Substrate Interaction, *Front. Mol. Biosci.*, **2018**, *5*.
16. Zha, J.; Li, J.; Su, Z.; Akimbekov, N. ja Wu, X., Lysostaphin: Engineering and Potentiation toward Better Applications, *J. Agric. Food. Chem.*, **2022**, *70*, 11441–11457.
17. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N. ja Bourne, P. E., The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235–242.
18. Grabowska, M.; Jagielska, E.; Czapinska, H.; Bochtler, M. ja Sabala, I., High resolution structure of an M23 peptidase with a substrate analogue, *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 14833.
19. Chen, X.; Wong, C.-H. ja Ma, C., Targeting the Bacterial Transglycosylase: Antibiotic Development from a Structural Perspective, *ACS Infect. Dis.*, **2019**, *5*, 1493–1504.
20. Murray, C. W. ja Rees, D. C., The rise of fragment-based drug discovery, *Nat. Chem.*, **2009**, *1*, 187–192.
21. Szymański, P.; Markowicz, M. ja Mikiciuk-Olasik, E., Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discovery—Toxicological Screening Tests, *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, *13*, 427–452.
22. Zhang, D.; Burdette, B. E.; Wang, Z.; Karn, K.; Li, H.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C.; Evans, G. B. ja Wang, S., Transition State Analogues Enhanced by Fragment-Based Structural Analysis: Bacterial Methylthioadenosine Nucleosidases, *Biochemistry*, **2020**, *59*, 831–835.

23. Desmarais, S. M.; de Pedro, M. A.; Cava, F. ja Huang, K. C., Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly, *Mol. Microbiol.*, **2013**, *89*, 1–13.
24. Leng, Y., *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*, 2. painos, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2008.
25. Sahiro, K.; Kawato, Y.; Koike, K.; Sano, T.; Nakai, T. ja Sadakane, M., Preyssler-type phosphotungstate is a new family of negative-staining reagents for the TEM observation of viruses, *Sci. Rep.*, **2022**, *12*, 7554.
26. Stewart, P. L., Cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of nanoparticles, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **2017**, *9*.
27. El Kirat, K.; Burton, I.; Dupres, V. ja Dufrene, Y. F., Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy, *J. Microsc.*, **2005**, *218*, 199–207.
28. Khan, H.; Yerramilli, A. S.; D'Oliveira, A.; Alford, T. L.; Boffito, D. C. ja Patience, G. S., Experimental methods in chemical engineering: X-ray diffraction spectroscopy—XRD, *Can. J. Chem. Eng.*, **2020**, *98*, 1255–1266.
29. Dessau, M. A. ja Modis, Y., Protein Crystallization for X-ray Crystallography, *Journal of Visualized Experiments*, **2011**.
30. Smith, J. G., *Organic Chemistry*, 4. painos, McGraw-Hill Education, New York, 2014.
31. Rimal, B.; Senzani, S.; Ealand, C.; Lamichhane, G.; Kana, B. ja Kim, S. J., Peptidoglycan compositional analysis of *Mycobacterium smegmatis* using high-resolution LC–MS, *Sci. Rep.*, **2022**, *12*, 11061.
32. Reichenbacher, M. ja Popp, J., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). Teoksessa: *Challenges in Molecular Structure Determination*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012, ss. 215–312.
33. Schramm, V. L., Enzymatic Transition State Theory and Transition State Analogue Design, *Journal of Biological Chemistry*, **2007**, *282*, 28297–28300.

34. Akparov, V.; Timofeev, V.; Khaliullin, I.; Švedas, V. ja Kuranova, I., Structure of the carboxypeptidase B complex with N-sulfamoyl-L-phenylalanine – a transition state analog of non-specific substrate, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2018**, *36*, 956–965.
35. Birkholz, A. B. ja Schlegel, H. B., Using bonding to guide transition state optimization, *J. Comput. Chem.*, **2015**, *36*, 1157–1166.
36. Akparov, V. Kh.; Konstantinova, G. E.; Timofeev, V. I.; Khaliullin, I. G. ja Kuranova, I. P., Structure of the microbial carboxypeptidase T complexed with the transition state analog N-sulfamoyl-l-lysine, *Biophys. Chem.*, **2021**, *270*, 106535.
37. Gloster, T. M. ja Davies, G. J., Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 305–320.
38. Ge, M.; Molt, R. W.; Jenkins, H. T.; Blackburn, G. M.; Jin, Y. ja Antson, A. A., Octahedral Trifluoromagnesate, an Anomalous Metal Fluoride Species, Stabilizes the Transition State in a Biological Motor, *ACS Catal.*, **2021**, *11*, 2769–2773.
39. Barinka, C.; Hlouchova, K.; Rovenska, M.; Majer, P.; Dauter, M.; Hin, N.; Ko, Y.-S.; Tsukamoto, T.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J. ja Lubkowski, J., Structural Basis of Interactions between Human Glutamate Carboxypeptidase II and Its Substrate Analogs, *J. Mol. Biol.*, **2008**, *376*, 1438–1450.
40. Nashed, N. T.; Aniana, A.; Ghirlando, R.; Chiliveri, S. C. ja Louis, J. M., Modulation of the monomer-dimer equilibrium and catalytic activity of SARS-CoV-2 main protease by a transition-state analog inhibitor, *Commun. Biol.*, **2022**, *5*, 160.
41. Sacco, M. D.; Ma, C.; Lagarias, P.; Gao, A.; Townsend, J. A.; Meng, X.; Dube, P.; Zhang, X.; Hu, Y.; Kitamura, N.; Hurst, B.; Tarbet, B.; Marty, M. T.; Kolocouris, A.; Xiang, Y.; Chen, Y. ja Wang, J., Structure and inhibition of the SARS-CoV-2 main protease reveals strategy for developing dual inhibitors against Mpro and cathepsin L., *bioRxiv*, **2020**.
42. Lefurgy, S. T.; Caselli, E.; Taracila, M. A.; Malashkevich, V. N.; Biju, B.; Papp-Wallace, K. M.; Bonanno, J. B.; Prati, F.; Almo, S. C. ja Bonomo, R. A., Structures of FOX-4 Cephamycinase in Complex with Transition-State Analog Inhibitors, *Biomolecules*, **2020**, *10*, 671.

43. Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopiña, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J. J. A. G.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Saward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J. ja Schofield, C. J., Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- β -Lactamases, *J. Med. Chem.*, **2019**, *62*, 8544–8556.
44. Wanat, W.; Talma, M.; Pawełczak, M. ja Kafarski, P., Phosphonic Acid Analogues of Phenylglycine as Inhibitors of Aminopeptidases: Comparison of Porcine Aminopeptidase N, Bovine Leucine Aminopeptidase, Tomato Acidic Leucine Aminopeptidase and Aminopeptidase from Barley Seeds, *Pharmaceuticals*, **2019**, *12*, 139.
45. Wang, Y.; Wang, G.; Moitessier, N. ja Mittermaier, A. K., Enzyme Kinetics by Isothermal Titration Calorimetry: Allostery, Inhibition, and Dynamics, *Front. Mol. Biosci.*, **2020**, *7*.
46. Ni, Z.; Jin, X.; Zhou, P.; Wu, Q. ja Lin, X.-F., A Combination of Computational and Experimental Approaches to Investigate the Binding Behavior of B.sub Lipase A Mutants with Substrate pNPP, *Mol. Inform.*, **2011**, *30*, 359–367.
47. Manley, G. ja Loria, J. P., NMR insights into protein allostery, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2012**, *519*, 223–231.
48. Raulinaitis, V.; Tossavainen, H.; Aitio, O.; Juuti, J. T.; Hiramatsu, K.; Kontinen, V. ja Permi, P., Identification and structural characterization of LytU, a unique peptidoglycan endopeptidase from the lysostaphin family, *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 6020.
49. Ojala, A., *Peptidoglykaanin hajottaminen, puhdistus ja karakterisointi*, Pro gradu-tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos, Jyväskylä, 2019.
50. Turnbull, M. M., Methylmorpholinium Chloride, *Acta Crystallogr. C*, **1997**, *53*, 818–820.

LIITTEET

Liite 1: *N*-akryloyylylglysiinaatin ^1H NMR-spektri.

Liite 2: Aminometyylihypofosforihapokkeen IR-spektri.

Liite 3: Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ^1H NMR-spektri.

Liite 4: Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja *N*-akryloyylylglysiinaatin Michael-additiotuotteen ^1H NMR-spektri.

Liite 5: Suojatun aminometyylihypofosforihapokkeen ja *N*-akryloyylylglysiinaatin Michael-additiotuotteen IR-spektri.

Liite 6: Tetraglysiinihypofosforihapokkeen ^1H NMR-spektri.

Liite 7: Tetraglysiinihypofosforihapokkeen ^{13}P NMR-spektri.

Liite 8: Liukenemattoman sakan ^1H NMR-spektri.

Liite 9: Liukenemattoman sakan ^1H NMR-spektri hydrolyysin jälkeen.

Liite 10: Liukenemattoman sakan ^1H NMR-spektri uuden Cbz-Gly-OH:n lisäyksen jälkeen.

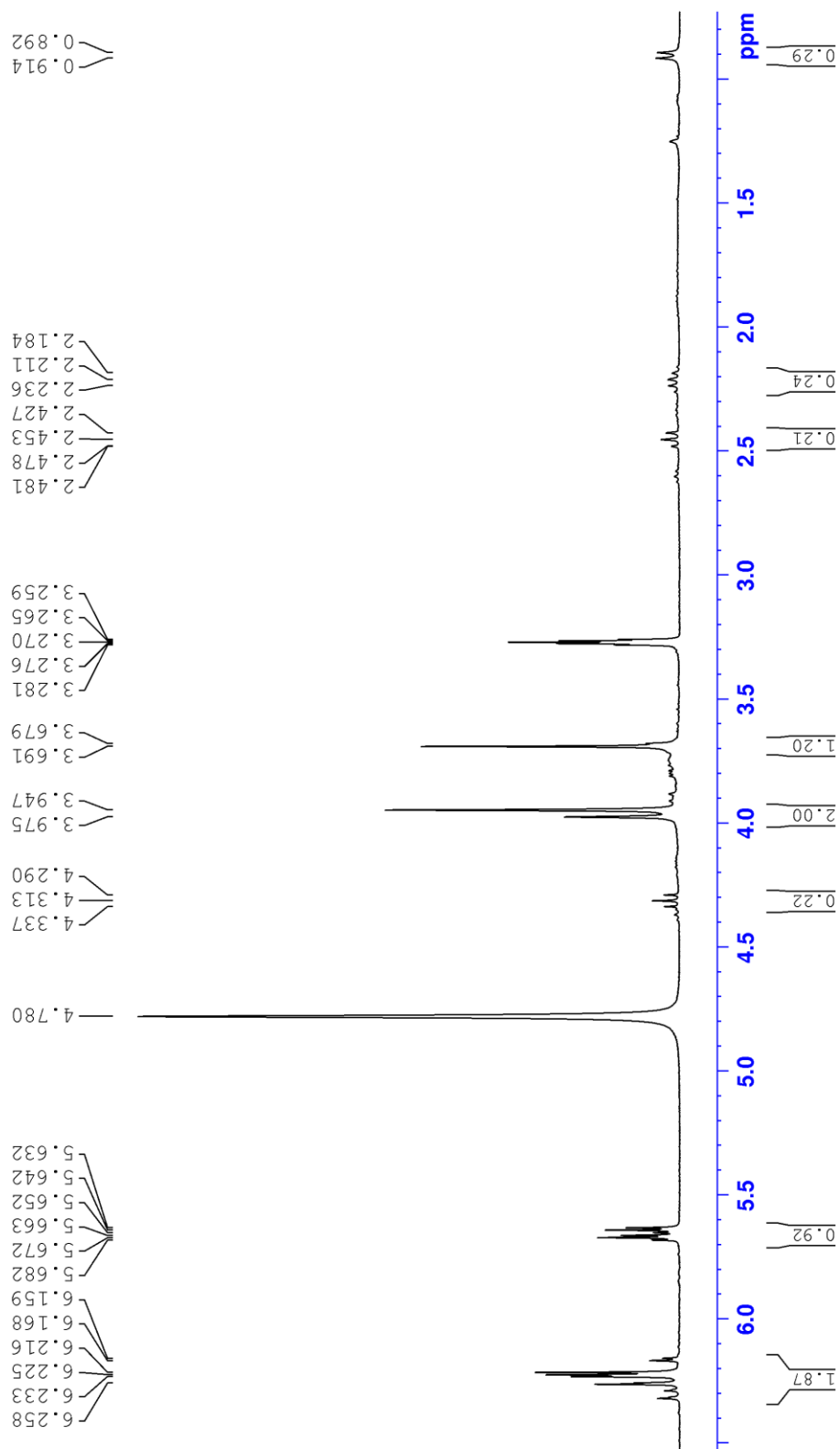
Liite 11: Liukenemattoman sakan positiivisen ionisaation massaspektri uuden Cbz-Gly-OH:n lisäyksen jälkeen.

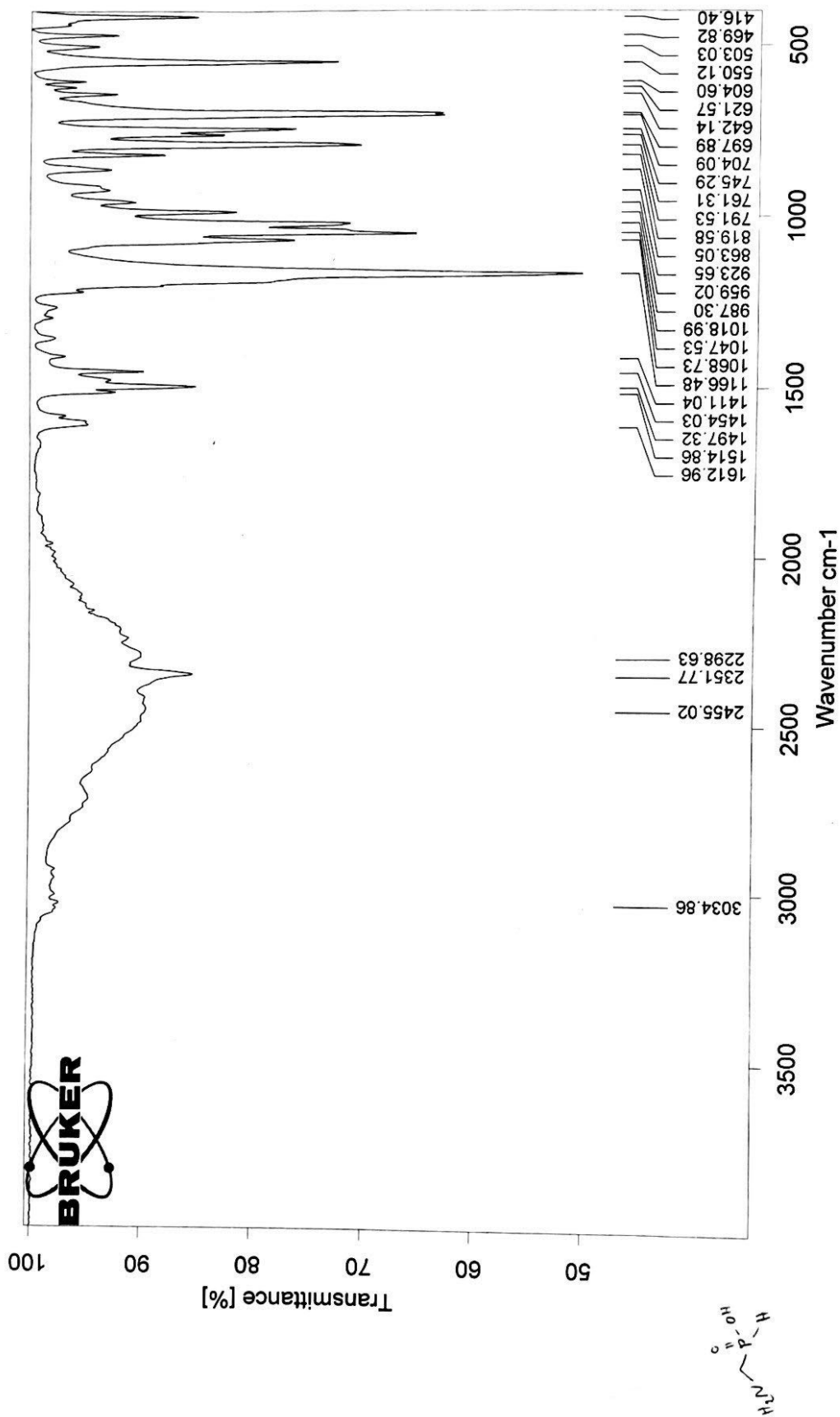
Liite 12: Liukenemattoman sakan IR-spektri uuden Cbz-Gly-OH:n lisäyksen jälkeen.

Liite 13: Liukenemattoman sakan negatiivisen ionisaation massaspektri uuden Cbz-Gly-OH:n lisäyksen jälkeen.

Liite 14: Liukenemattoman sakan ^1H NMR-spektrin heikommät signaalit uuden Cbz-Gly-OH:n lisäyksen jälkeen.

amiiniakryloyylimetyyliiglysinaatti vakuumista
 in MeOD at 30C
 1H NMR at 300 MHz
 9.9.2022 Eveliina Kankkunen





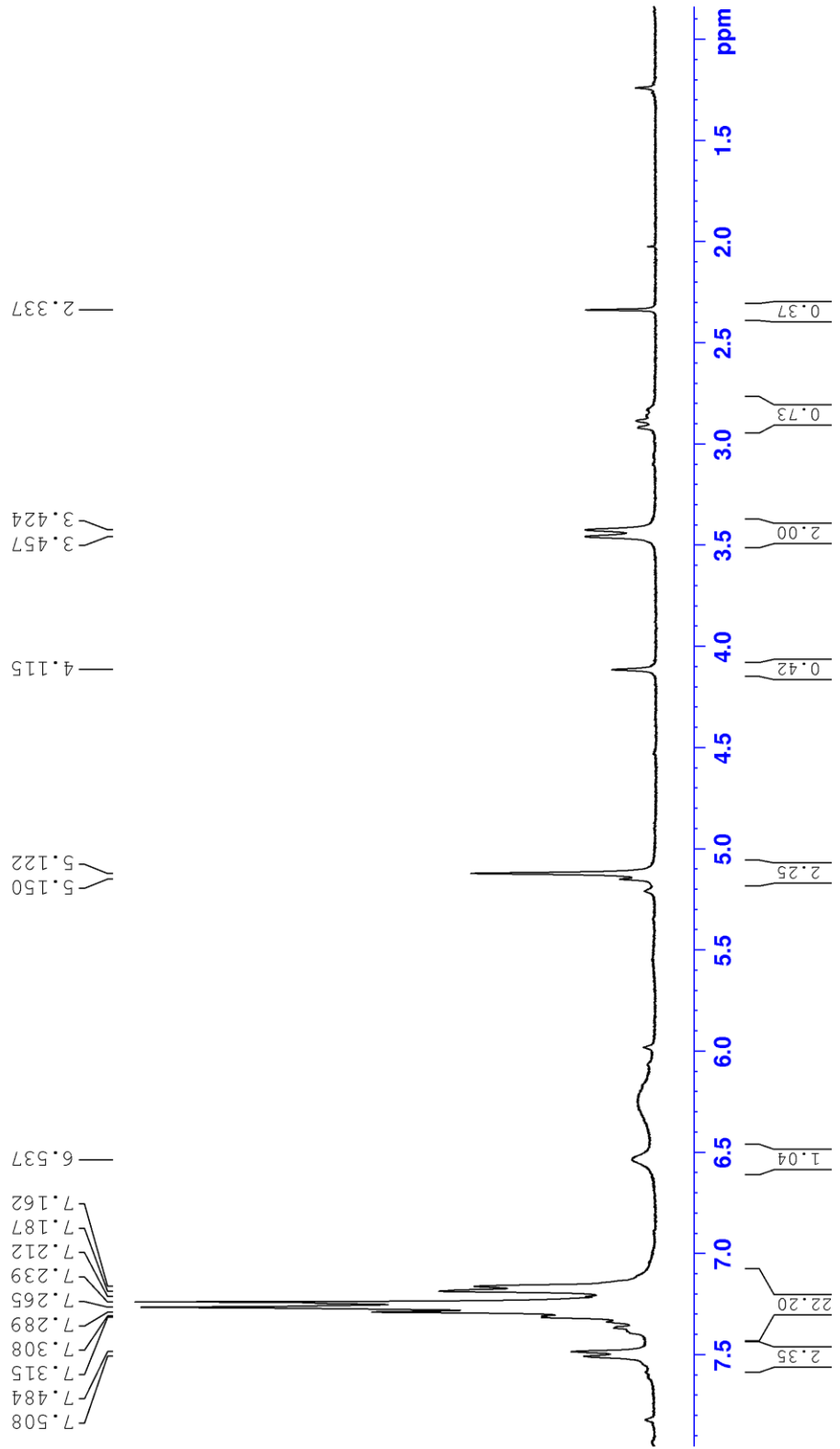
C:\OPUS_7.0.129\MEAS\Louhelainen\JTtest.790

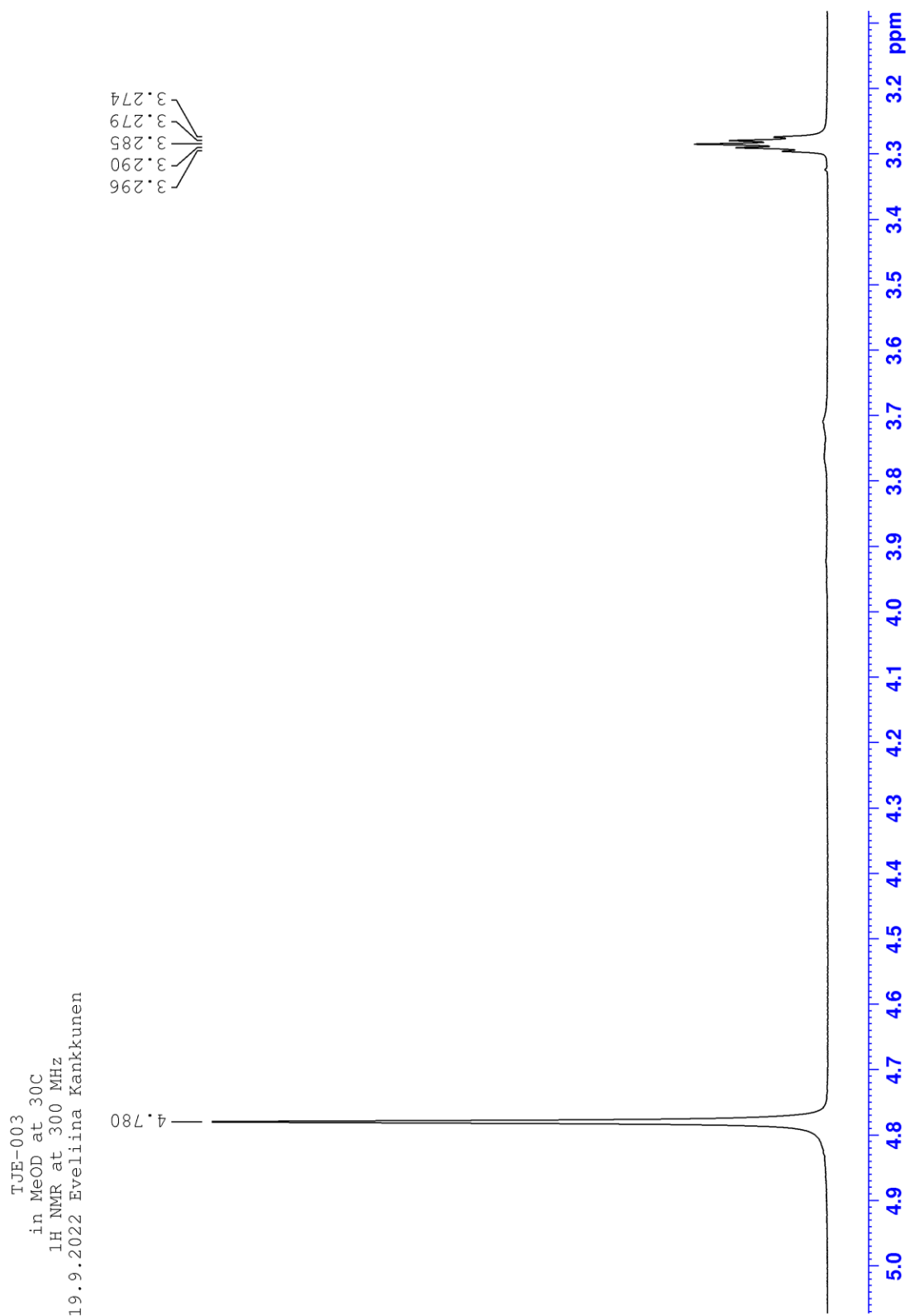
aminometyylihyposforihapoke EK

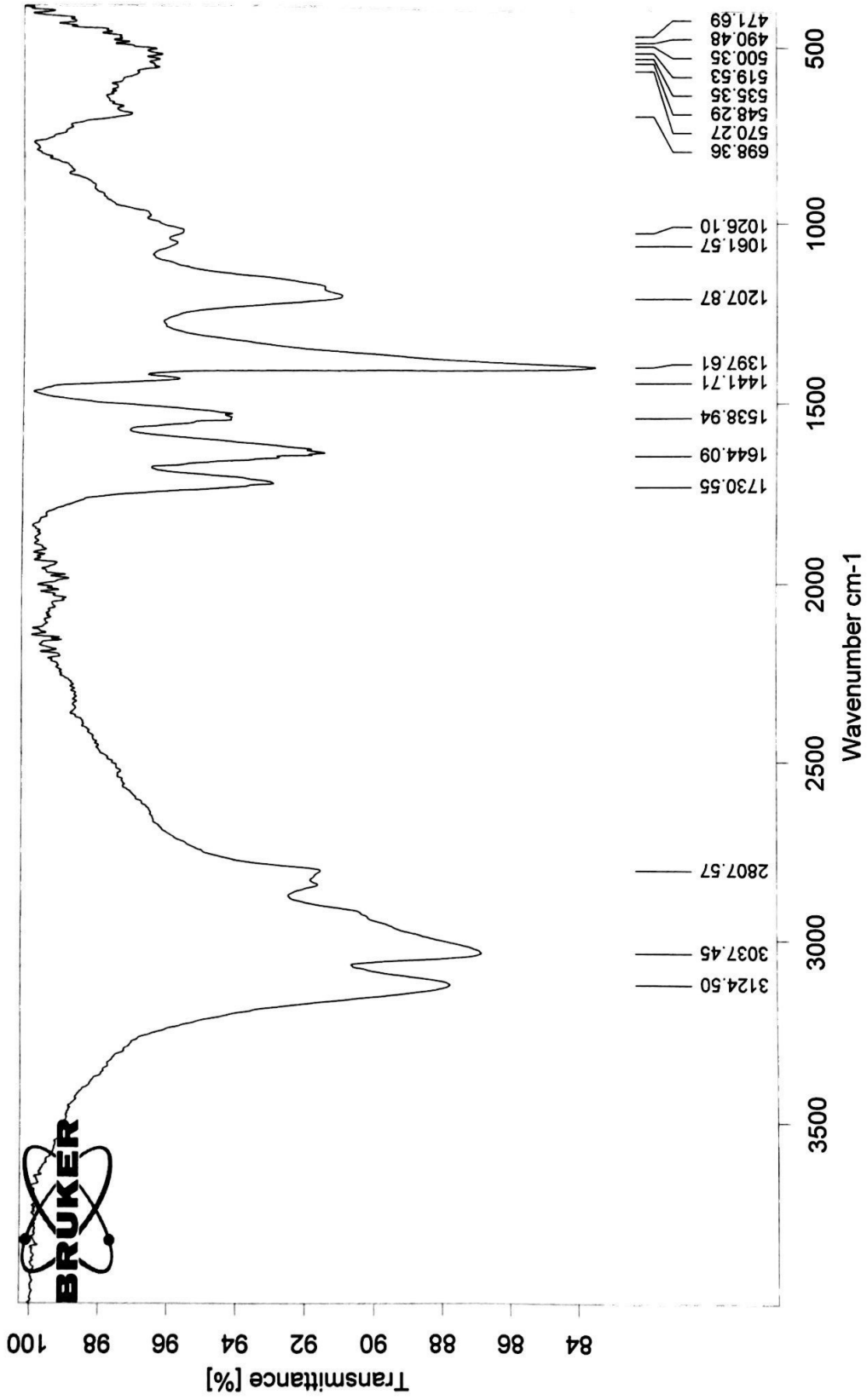
Instrument type and / or accessory

5.9.2022

suojattu aminometyylihyppofosforihapoke vakuumista
 in CDCl₃ at 30C
¹H NMR at 300 MHz
 9.9.2022 Eveliina Kankkunen







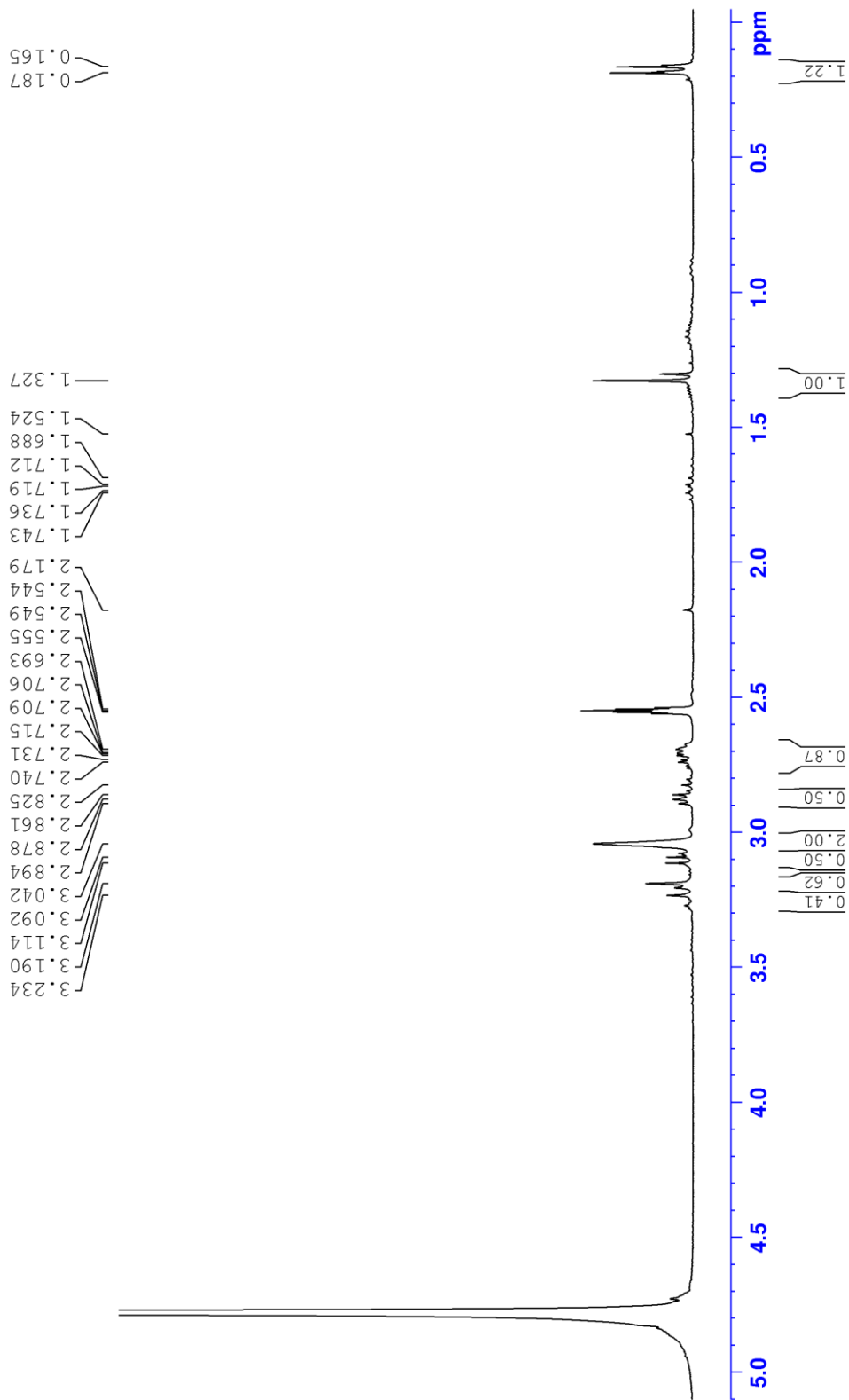
19.9.2022

Instrument type and / or accessory

tje003

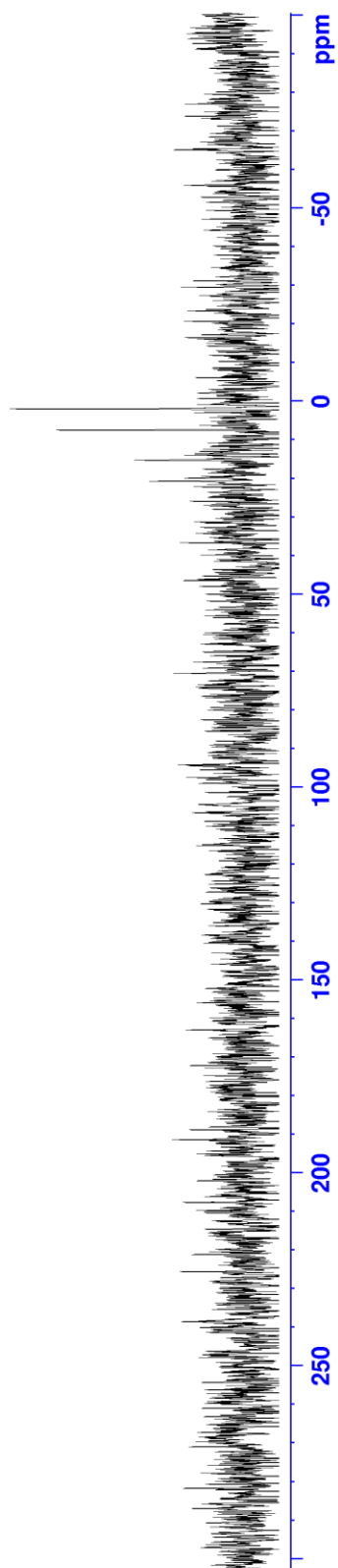
C:\OPUS_7.0.129\MEAS\Louhelainen\JTest.799

TJE-004
 in MeOD at 30C
 1H NMR at 300 MHz
 27.9.2022 Eveliina Kankkunen

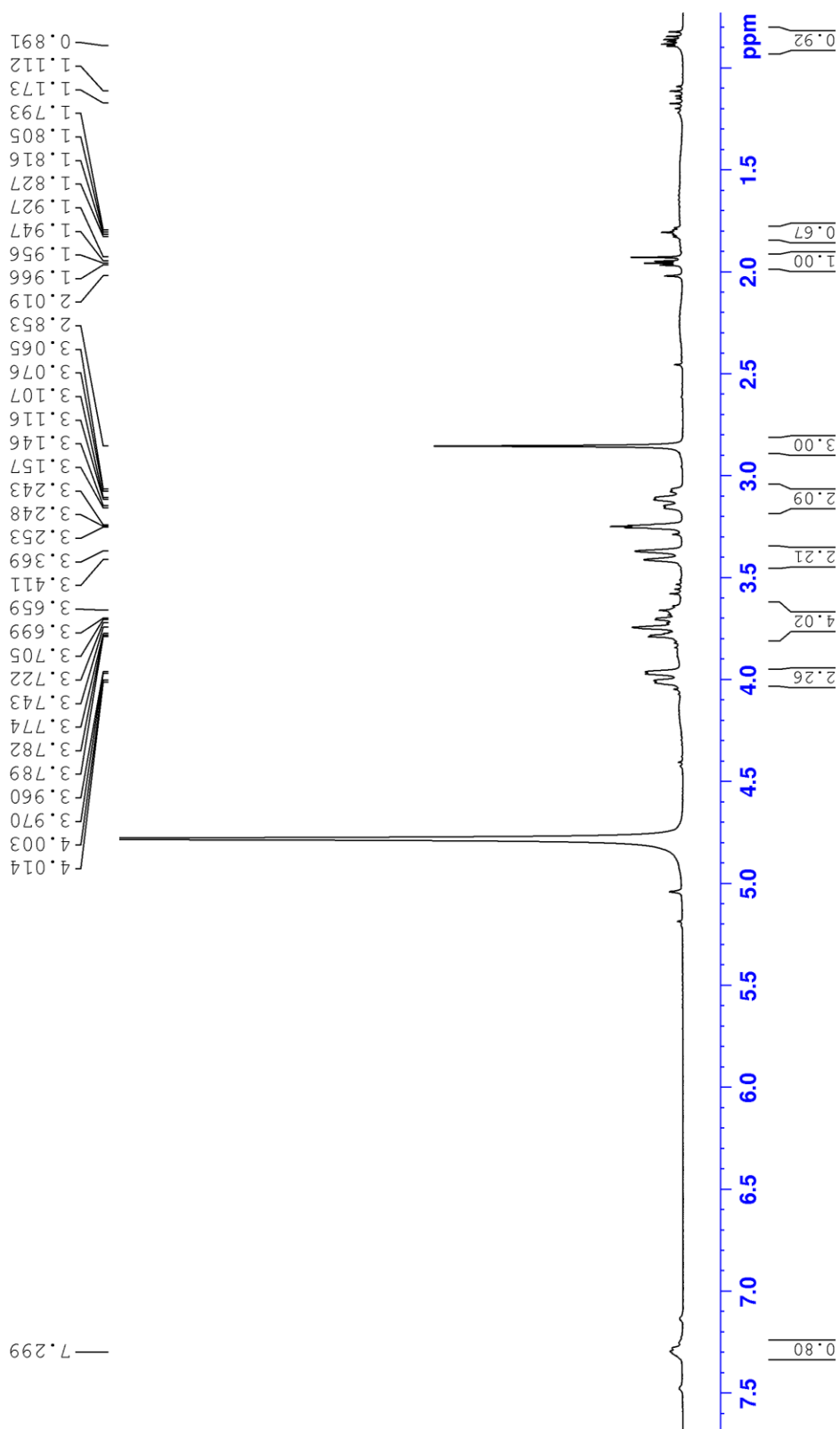


TJE-004
in MeOD at 30C
31P NMR at 121.5 MHz
27.9.2022 Eveliina Kankkunen

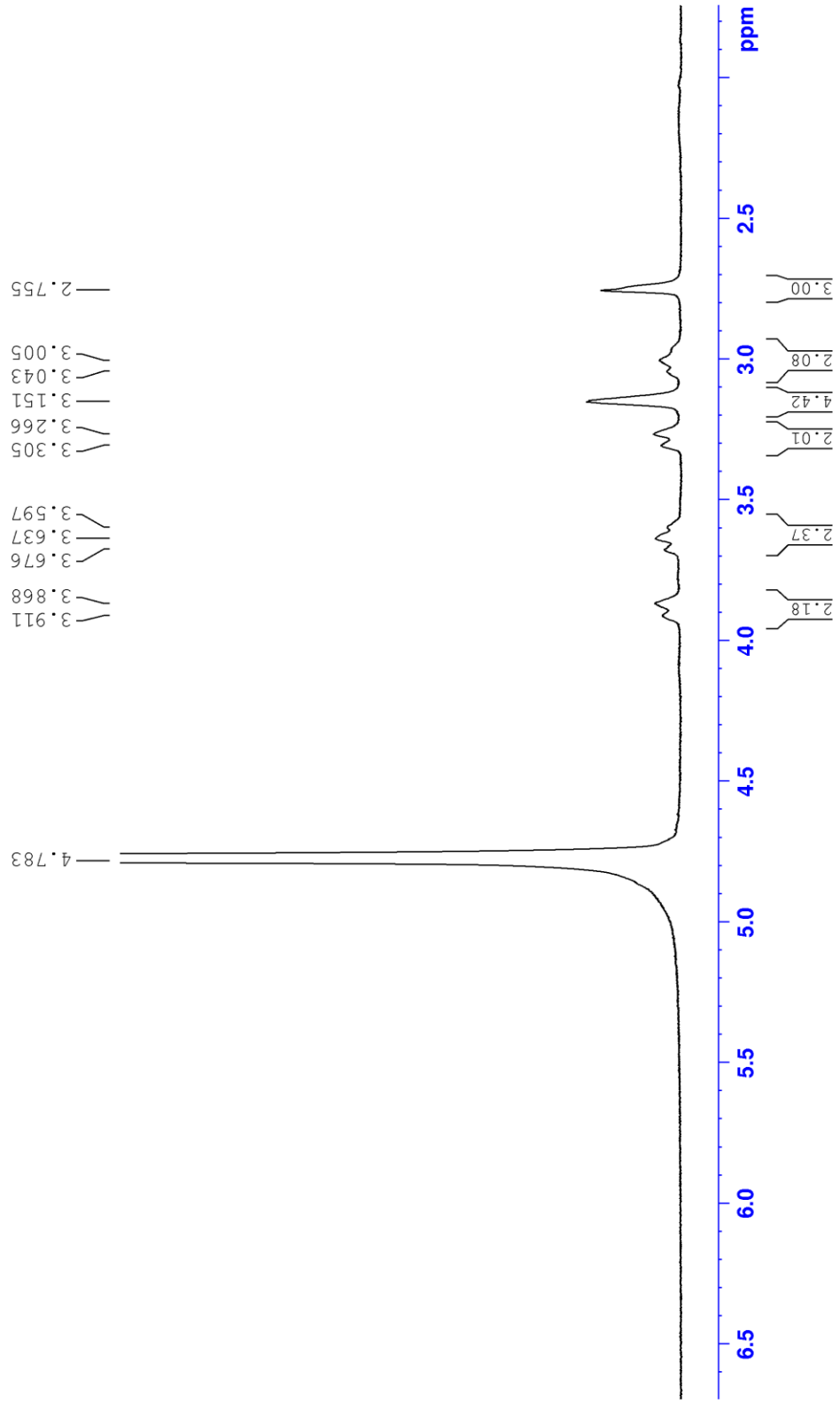
15.39
7.48
2.02
1.95

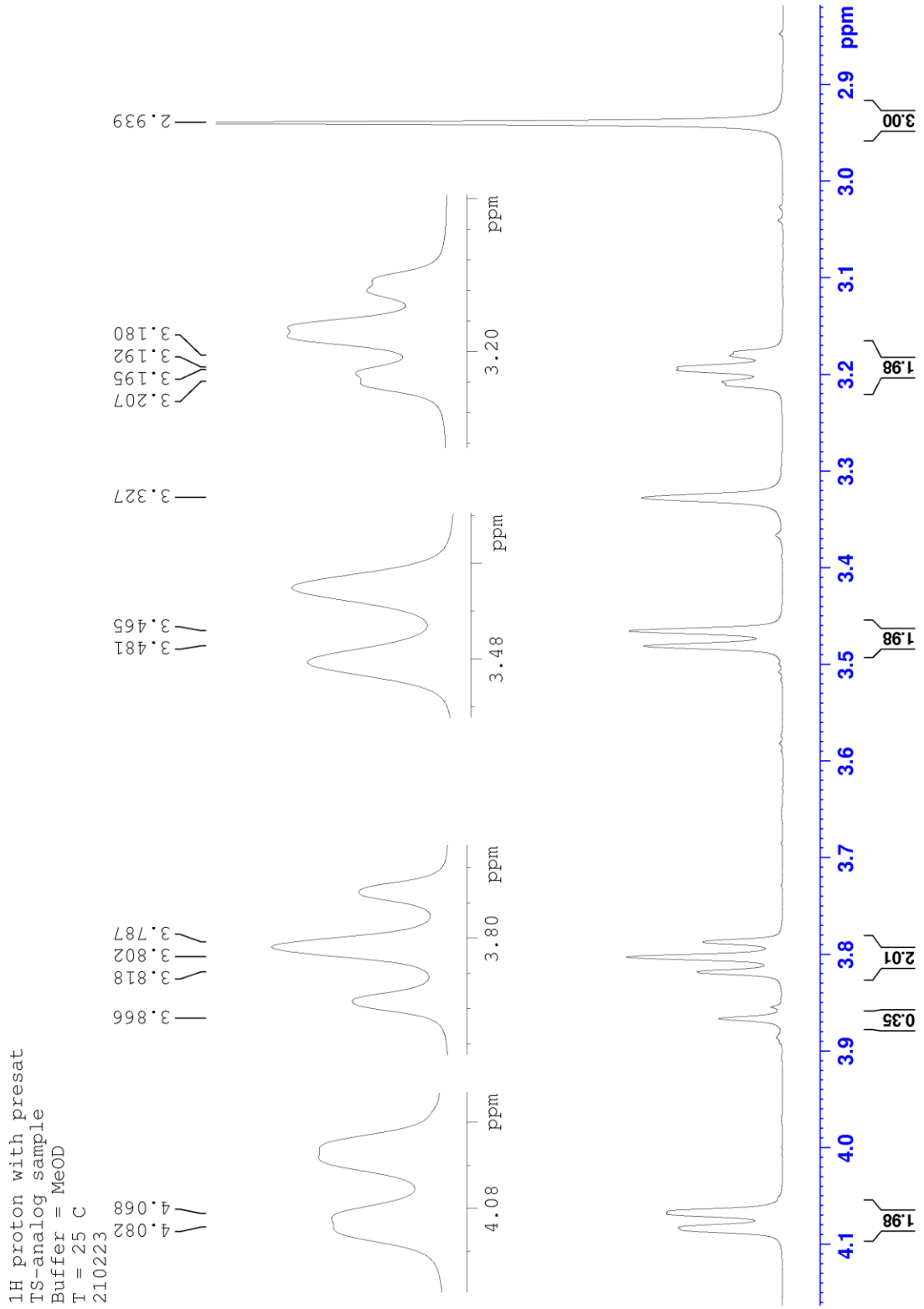


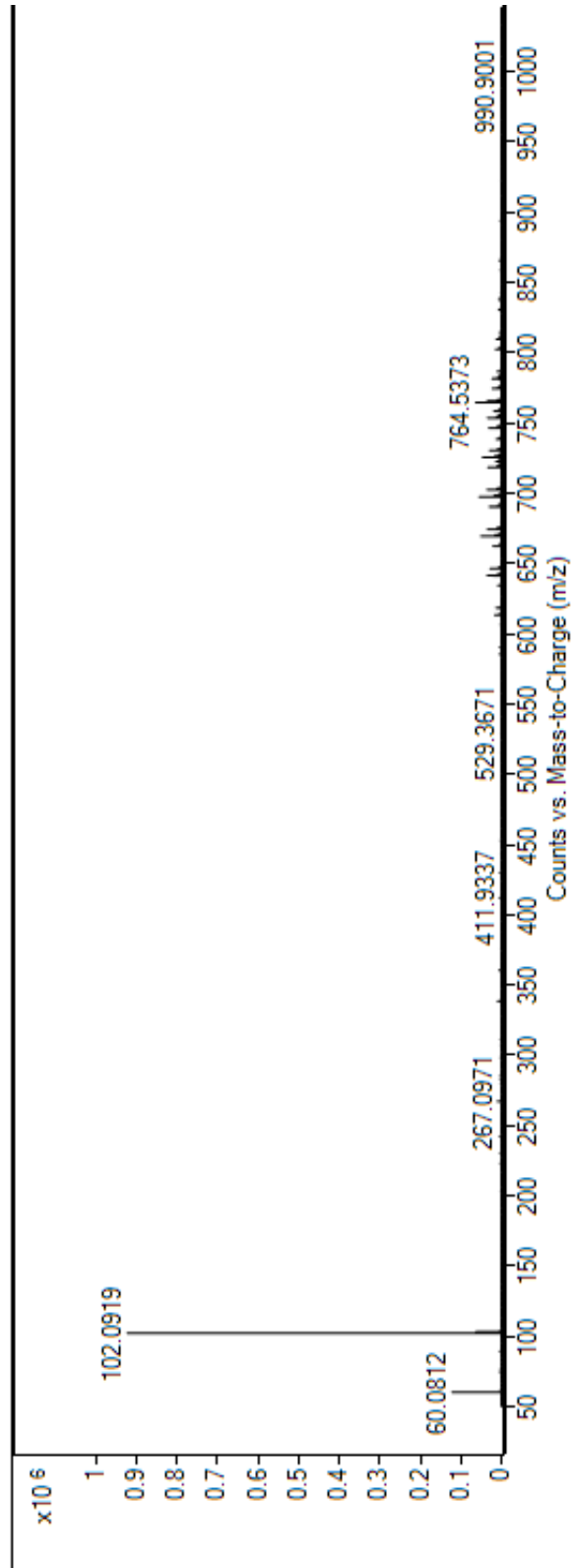
TJE-004 undissolved
 in MeOD at 30C
 1H NMR at 300 MHz
 22.9.2022 Eveliina Kankkunen

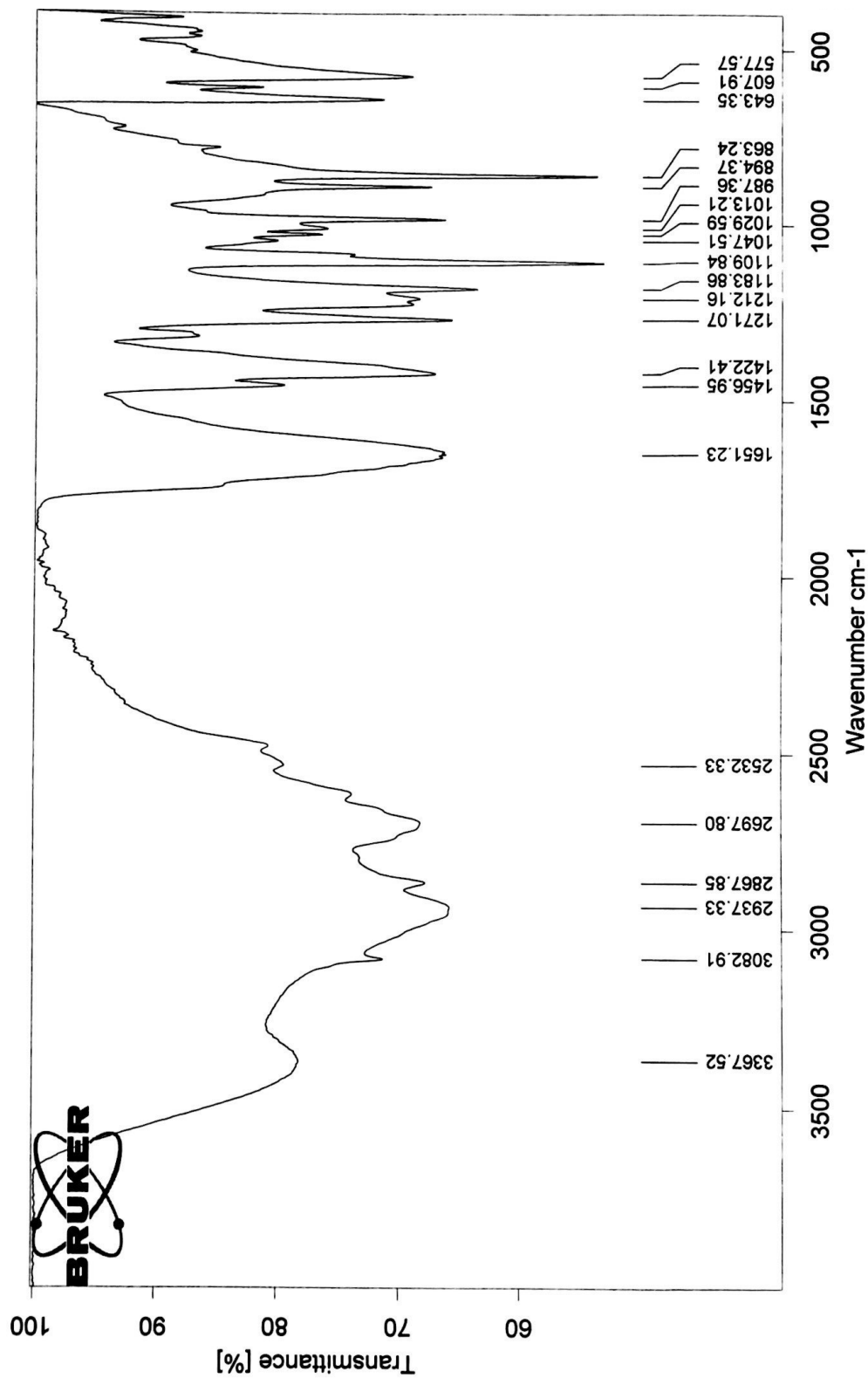


TJE-005
in MeOD at 30C
1H NMR at 300 MHz
6.10.2022 Eveliina Kankkunen

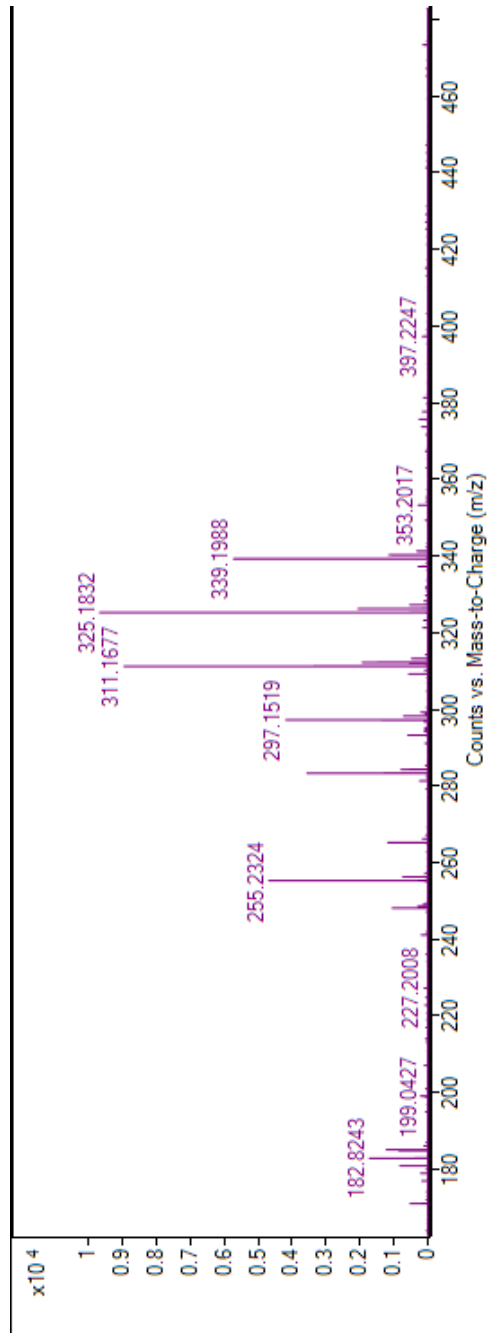








C:\OPUS_7.0.129\MEAS\Louhelainen\ITest.989 T:JE006 Instrument type and / or accessory 29.11.2022



¹H proton with presat
 IS-analog sample
 Buffer = MeOD
 T = 25 C
 210223

