MAGASABB RENDŰ SZERKEZETEKET ALKOTÓ PURINSZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szolomájer János

Témavezető: Dr. Kovács Lajos tudományos főmunkatárs

Kémia Doktori Iskola Orvosi Vegytani Intézet Szegedi Tudományegyetem TTIK



Szeged 2010

TARTALOMJEGYZÉK

A dolgozatban felhasznált közlemények	3
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés, irodalmi előzmények	6
1.1 Nukleinsavak	6
1.1.1. A nukleinsavak jelentősége, kutatásuk rövid története	6
1.1.2. A nukleozidok, nukleotidok, nukleinsavak szerkezete és biológiai szerepe	7
1.1.3. A nukleozidok szerkezete	8
1.1.4. A nukleotidok szerkezete	10
1.1.5. A nukleinsavak elsődleges szerkezete	11
1.1.6. A DNS másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezete	12
1.1.7. Oligonukleotidok szilárd fázisú szintézise	16
1.2. Önszerveződő rendszerek	19
1.2.1 Magasabb rendű önszerveződő rendszerek, G-kvartettek, G-kvadruplexek	19
1.2.2. Nem kovalens kölcsönhatások által stabilizált lipofil G-kvadruplexek	20
1.2.3. A guanozin-5'-monofoszfát önszerveződésének tanulmányozása	22
1.2.4. Nukleinsav G-kvadruplexek. Szerkezet és azonosítás	25
1.2.5. A G-kvadruplex szerkezetek azonosítása	29
1.2.6. Telomeráz inhibitorok: DNS G-kvadruplexeket stabilizáló kis molekulák	31
1.2.7. Guanozin önszerveződések az anyagtudományokban, bioszenzorok tervezése és	
nanotechnológia	31
1.3. N-Alkilguanin-származékok [I, II]	33
1.4. Purin alkaloidok	35
1.4.1 Xantin alkaloidok (koffein, teofillin, teobromin)	35
1.4.2 A koffein bioszintézise	36
1.4.3. A koffein bioszintéziséhez szükséges xantozinforrás	38
1.4.4. A koffein metabolizmusa	39
2. Célkitűzések	42
3. Saját eredmények	43
3.1. Előzmények [III]	43

3.1.1. Semleges és pozitívan töltött új purin tetramer szerkezetek	43
3.1.2. 9-Metilxantin (Xa) és 9-metilhúgysav (Ua) monomerek, dimerek és tetramerek	44
3.2. 3-Szubsztituált xantinok [IV]	48
3.2.1. 3-Szubsztituált xantinok mint ígéretes kvadruplexképző molekulák	48
3.2.2. Elméleti számítógépes vizsgálatok	50
3.2.3. A 3-metilxantin előállítása	53
3.2.4. Tömegspektroszkópiás eredmények	55
3.2.5. Multinukleáris NMR-spektroszkópiás vizsgálatok	57
3.2.6. A 3-szubsztituált xantintartalmú DNS monomer és oligomerek szintézise	60
3.2.7. A 3-szubsztituált xantin/timintartalmú PNS monomerek és oligomerek szintézise	64
4. Kísérleti rész	69
4.1. Általános kísérleti rész	69
4.2. Anyagok és módszerek	70
4.2.1. A 3-metilxantin előállítása	70
4.2.2. A 3-szubsztituált xantintartalmú DNS monomer előállítása	74
4.2.3. A 3-szubsztituált xantin/timintartalmú PNS monomerek előállítása	81
4.2.4. DNS oligonukleotid szintézis	88
4.2.5. PNS oligomer szintézis	89
5. Összefoglalás	92
6. Summary	97
7. Irodalomjegyzék	101
8. Köszönetnyilvánítás	108

A dolgozatban felhasznált közlemények

- I. G. Ferenc, P. Pádár, J. Szolomájer, L. Kovács (2009): N-Alkylated guanine derivatives. Curr. Org. Chem., 13, 1085-1135
- II. G. Ferenc, P. Pádár, J. Szolomájer, N. M. Howarth, L. Kovács (2011): Transition metal ion complexes of *N*-alkylguanines. *Curr. Org. Chem.*, 14 (közlésre elfogadva).
- III. G. Paragi, L. Kovács, Z. Kupihár, J. Szolomájer, B. Penke, C. Fonseca Guerra, F. M. Bickelhaupt (2010): Neutral or positively charged new purine base tetramer structures: a computational study of xanthine and uric acid derivatives. *New J. Chem.*, 34, (nyomdában), DOI: 10.1039/c0nj00613k.
- IV. J. Szolomájer, G. Paragi, G. Batta, C. Fonseca Guerra, F. M. Bickelhaupt, Z. Kele, P. Pádár, Z. Kupihár and L. Kovács (2010): 3-Substituted xanthines as promising candidates for quadruplex formation: computational, synthetic and analytical studies. *New J. Chem.*, 34 (közlésre benyújtva).

Rövidítések jegyzéke

Bn	benzil
<i>t</i> -Bu	terc-butil
CI	kémiai ionizáció
COSY	korrelációs spektroszkópia
CPG	kontrollált porozitású üveg (CPG)
DCM	diklór-metán
DMSO	dimetil-szulfoxid
DMF	dimetil-formamid
DCC	N,N'-diciklohexil-karbodiimid
DIPEA	diizopropil-etilamin
EtOAc	etil-acetát
Et	etil
Et ₂ O	dietil-éter
ESI	elektrospray ionizáció
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
Et ₂ O	dietil-éter
EtOAc	etil-acetát
EtOH	etil-alkohol
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
G	guanozin
Gua	guanin

HATU	$2\-(7\-aza\-1\-H\-benzotriazol\-1\-il)\-1,1,3,3\-tetrametiluronium\-hexafluorofoszfát$
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium-hexafluorofoszfát
HMBC	heteronukleáris többszöröskötés-korreláció
HOBt	1-hidroxi-benzotriazol
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
HSQC	heteronukleáris egykvantum-koherencia
MALDI	mátrix-segített lézer-deszorpciós ionizáció
Me	metil
МеОН	metanol
MS/MS	tandem tömegspektrometria
NMR	magmágneses rezonancia-spektroszkópia
NOE	nukleáris Overhauser-effektus
Ph	fenil
PMB	4-metoxibenzil
PNB	4-nitrobenzil
TEA	trietil-amin
TFA	trifluorecetsav
THF	tetrahidrofurán
VRK	vékonyréteg-kromatográfia
TOF	repülésiidő-analizátor

1. Bevezetés, irodalmi előzmények

1.1. Nukleinsavak^{1,2}

1.1.1. A nukleinsavak jelentősége, kutatásuk rövid története

A nukleinsavak kémiai szerkezetének felderítése a huszadik század első felében klasszikus kémiai szerkezetbizonyító módszerekkel történt. Ezt követte annak felismerése, hogy a nukleinsavak két fajtája, a DNS (dezoxiribonukleinsav) és az RNS (ribonukleinsav) közül a DNS felelős a sejtek tulajdonságainak örökítéséért. Az ezt egyértelműen bizonyító baktériumkísérleteket 1944-ben Avery, MacLeod és McCarty, majd vírusokkal folytatott hasonló vizsgálatok eredményeit 1952-ben Hershey és Chase publikálta. 1953-ban az öröklődés folyamatának kémiai mechanizmusát a Watson és Crick által bemutatott DNS kettős hélix térszerkezet egyértelműen leírta, így a nukleinsavak a biológiai érdeklődés középpontjába kerültek. Az 1960-70-es évekre tisztázódtak a DNS mellett az RNS főbb funkciói és a fehérjeszintézis mechanizmusa, azaz kiderült, hogy az élő szervezetekben lezajló folyamatok irányítása a nukleinsavakban kódolt információra, a fehérjéket kódoló génekre vezethető vissza. E felismerés jelentőségét mutatja, hogy olyan új tudományterületek keletkeztek a biológián belül és mellett, mint a molekuláris biológia, a genetika, a biotechnológia és a genomika. Néhány évtized leforgása alatt robbanásszerű fejlődésen ment keresztül a biológia, mely egyrészt a nukleinsavak vizsgálatához nélkülözhetetlen analitikai eljárások fejlődésének, biológiai eszközök (enzimek) felfedezésének és alkalmazásának, valamint kémiai módszerek kifejlesztésének (nukleotidok, nukleinsavak kémiai és biokémiai előállításának) volt köszönhető. Az 1980-as években értékeltek kémiai Nobel-díjjal több, még az 1970-es években DNS-szekvenálásra kifejlesztett módszert, melyek eredményeként az ezredfordulóra (2000-2003) elkészült a humán genom, azaz a teljes emberi génállomány feltérképezése. Mindezek a hatalmas jelentőségű eredmények szinte azonnal éreztették hatásukat az élettudományok összes területén.

A biológia, biotechnológia és orvostudomány az eddig felhalmozott tudás birtokában az életfolyamatok részletesebb megismerésén, megértésén túl ma már képes bizonyos változtatások elvégzésére is egyes élőlényekben, amely alapjaiban változtathatja meg a jövő hétköznapjait.

1.1.2. A nukleozidok, nukleotidok, nukleinsavak szerkezete és biológiai szerepe

A nukleinsavak elágazást nem tartalmazó polimer makromolekulák. Méretük a nukleinsav funkciójától függően néhány tucat elemi egységtől (nukleotid) néhány százmillióig, moláris tömegük ennek megfelelően néhány ezertől néhányszor tízmilliárd Daltonig (atomi tömegegységig) változhat. A sejtekben általában (sok bázikus oldalláncot tartalmazó) fehérjékhez kötötten fordulnak elő, de ezektől oldhatósági különbségek (kicsapás, extrakció) és a megfelelő pH-n történő ioncserés oszlopkromatográfiás módszerekkel elválaszthatók. A nukleinsav-polimerek elemi alkotórészei a foszforsav, a D-ribóz vagy 2-dezoxi-D-ribóz cukor és a pirimidin illetve purin heterociklus alapvázat tartalmazó úgynevezett nukleobázisok. A polimer molekulában az említett három alkotórészből a cukor és a foszforsav alakítja ki a láncot úgy, hogy egy cukor 3'-hidroxilcsoportja és a szomszédos cukor 5'-hidroxilcsoportja között egy foszforsav foszfodiészter kötést létesít. Az így létrejött cukor-foszfát poliészter-lánc minden egyes cukoregységének glikozidos szénatomjához egy nukleobázis kapcsolódik N-glikozidos kötéssel. Hidrolízissel a nukleinsav-polimerek az 1. ábrán látható módon kisebb egységekre, formailag a nukleinsav monomer egységeire, azaz nukleotidokra bonthatók. A nukleotidok maradék észtercsoportjának hidrolízisével nukleozidokat és foszforsavat kapunk. A nukleozidok savas hidrolízise pedig a fent említett pentózokat (D-ribózt vagy 2-dezoxi-D-ribózt) és pirimidin, illetve purin heterociklusokat tartalmazó nukleobázisokat eredményez.



1. ábra. A nukleinsavak lebontásának termékei

1.1.3. A nukleozidok szerkezete

A nukleinsavak teljes lúgos hidrolízisével nyerhető nukleozidok két fő alkotórésze egy furanózgyűrűs szerkezetű öt szénatomos cukor és az ahhoz *N*-glikozid-kötéssel kapcsolódó heterociklusos bázis. A pentózrész RNS esetében D-ribóz, DNS esetében 2-dezoxi-D-ribóz, míg a heterociklusos bázisok mindkét esetben pirimidin vagy purin alapvázat tartalmaznak. A nukleinsavak fő nukleobázis összetevői az adenin, guanin, citozin és timin, illetve az RNS-ben timin helyett uracil található. Ezen vegyületeket összegzi a 2. ábra. Az egyszerűsített ábrázoláson az áttekinthetőség érdekében nincsenek feltüntetve a szénatomokhoz kapcsolódó hidrogének.



2. ábra. A nukleinsavak cukor és főbb nukleobázis összetevői

A nukleozidok a 2. ábrán látható pentózoknak a nukleobázisokkal alkotott *N*-glikozidjai, melyek formailag a 3. ábrán látható kondenzációs típusú reakcióival származtathatók.



3. ábra. Az N-glikozid kötés és a nukleozidok számozása

A nukleinsavakban előforduló legfontosabb nukleozidok és elnevezésük látható a következő ábrán.



4. ábra. A nukleinsavakat alkotó legfontosabb nukleozidok

A cukorgyűrű minden esetben furanóz szerkezetű és a D-sorozatbeli cukor ábrázolása a szénhidrátoknál megszokott módon történik, azaz az öttagú gyűrűben a 4'-szénatom konfigurációja az ábrákon látható elrendezésben D-cukrot jelöl, ha a gyűrűhöz képest felfelé áll a CH₂OH-csoport. A monoszacharid 1'-szénatomjához kapcsolódik β-helyzetben a pirimidin vagy purin heterociklusos nukleobázis. Ezt azzal jelezzük az ábrázolásban, hogy a cukorgyűrű síkjához képest a CH₂OH-csoporttal azonos állásba kerül, azaz az ábrákon látható D-cukroknál felfelé. A pirimidinek esetében a nukleobázis a heterociklus 1-es nitrogénjén, a purinoknál a 9-es nitrogénen keresztül kapcsolódik a cukorhoz.

A természetes nukleinsavak az öt fő nukleobázison kívül további nukleobázisokat is tartalmaznak kisebb mennyiségben. Ezek többnyire az uridin, adenin és guanin hidroxilezett, metilezett, kéntartalmú valamint 5,6-dihidro-származékai. Néhányuk szerkezetét a 5. ábra mutatja be.



5. ábra. A nukleinsavakban kisebb mennyiségben található egyéb nukleozidok

1.1.4. A nukleotidok szerkezete

Nukleotidoknak nevezzük a nukleozidok olyan származékait, amelyek cukorrészében legalább egy hidroxilcsoport foszforilezett, azaz foszforatom kapcsolódik legalább az egyik oxigénhez. Az élő szervezetekben található nukleotidok egy része a nukleinsavak felépítésében, másik részük pedig a sejtek anyagcsere- és jelátviteli folyamataiban, mint kofaktorok játszanak szerepet. A 6. ábrán néhány példa látható nukleotid szerkezetekre és elnevezésükre.



6. ábra. A nukleotidok szerkezete és elnevezése

A nukleozid-trifoszfátok a nukleinsavak bioszintézisének építőelemei, melyeket a megfelelő polimeráz enzim kapcsol össze polimerláncokká a minta (templát) szál szekvenciája alapján. A polimerizációs reakcióban az enzim mindig az $5' \rightarrow 3'$ irányban halad a készülő új szálon, azaz a 3'-szabad hidroxilcsoporthoz kapcsolja a következő nukleotid egységet úgy, hogy a beépülő 5'-trifoszfát molekulából egy difoszforsavrész kihasad (7. ábra).



7. ábra. A nukleinsavak enzimatikus felépítése nukleotidokból

1.1.5. A nukleinsavak elsődleges szerkezete

A nukleinsavak elsődleges szerkezete a bázissorrend (szekvencia). Ez az egyik legfontosabb szerkezeti jellemző, így egyértelmű leírása az általa hordozott információ miatt feltétlenül szükséges. A 8. ábrán egy trinukleotid látható, melynek teljes szerkezete helyett a feltüntetett egyszerűsített ábrázolási módokat, jelöléseket és elnevezéseket szokás használni.



8. ábra. A nukleinsavak elsődleges szerkezete és ábrázolásmódjuk

Mivel a nukleinsavak általában elágazást nem tartalmazó polimerek, a teljes, részletes szerkezet feltüntetése a legtöbb esetben felesleges, elegendő a legegyszerűbb, csak a nukleobázisok egybetűs A, C, G, T és U betűjelét tartalmazó betűsor (szekvencia) leírása, ahol egy betű az adott nukleobázist tartalmazó nukleotid egységet jelöli.

1.1.6. A DNS másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezete

A nukleinsavak másodlagos szerkezetén a molekuláknak az elsődleges szerkezet által meghatározott, leginkább másodlagos kötőerők által rögzített, viszonylag stabil, állandó szerkezetét értjük, amely szerkezet szoros kapcsolatban áll az adott nukleinsav biológiai funkciójával.

A nukleinsav polimerek elsődleges, kémiai szerkezetének felderítése klasszikus szerkezetbizonyító eljárásokkal az 1940-es évekre fejeződött be és ekkoriban bizonyították azt is, hogy a nukleinsavak közül a DNS a sejtek örökítőanyaga. Azonban a DNS térszerkezetének megismerése és biológiai funkciója közötti összefüggés megfejtéséhez további információkra volt szükség. Mivel sokáig úgy gondolták, hogy a DNS-ben a négy nukleobázis valamiféle közös egységet (valamiféle tetranukleotidot) alkot, amely ismétlődik a láncban, ezért a DNS hidrolízistermékei között található négyféle nukleobázis mennyiségének különbségeit valamiféle mérési hibának tekintették. Chargaff papírkromatográfiás és fotometrikus vizsgálatai azonban egészen pontosan kimutatták, hogy a különböző élőlényekből izolált DNS-hidrolizátumai mindig az adott élőlényre jellemző mennyiségi arányokban tartalmazzák a négyféle nukleobázist, de mennyiségük nem egyenlő. Viszont bármilyen élőlényből származó mintát vizsgált, az adenin mennyisége mindig megegyezett a timinnel, a guaniné pedig a citozinnal (A = T és G = C, Chargaff-szabályok). Ezen kísérletek mellett spektroszkópiai adatok bizonyították, hogy a nukleobázisok laktám-laktim tautomer alakjai közül a DNS-ben a nukleozidoknál és nukleotidoknál ismertetésre kerülő laktám formát veszik fel (10. ábra), valamint sikerült röntgenkrisztallográfiai felvételeket készíteni egymással párhuzamos DNS-szálakról, melyek hélix szerkezetű molekulára utaltak. A fenti tudományos kirakó darabjait a részletes adatok elemzésével végül Watson és Crick illesztették össze, és 1953-ban publikálták a DNS kettős hélix térszerkezetét, amely tökéletesen megmagyarázta a DNS információhordozó és átörökítő tulajdonságait. Az általuk javasolt másodlagos szerkezet a 9. ábrán látható.



9. ábra. A DNS kettős hélix szerkezete

DNS А szálai egymással ellentétes irányokban futnak, antiparallel azaz elhelyezkedésűek. Ha függőlegesen helyezzük el a DNS-szálat, akkor az egyik szál felülről lefelé 5'-3' irányban halad, a másik felülről lefelé 3'-5' irányban. A cukor-foszfát lánc cukorrészeinek 1'-szénatomjához, mint a lépcsőfokok, csaknem "vízszintesen" kapcsolódnak a nukleobázisok. A két párhuzamosan futó láncon egymással szemben lévő nukleobázisok között hidrogénkötések biztosítják a kapcsolatot. A timin és adenin között kettő, a guanin és citozin között pedig három hidrogénkötés található. Az ábrán látható módon egy pirimidinnel szemben mindig egy purinbázis helyezkedik el, a bázisok kölcsönösen meghatározzák egymást. Egy adeninnel szemben mindig timin, guaninnal szemben mindig citozin található. A közöttük kialakuló hidrogénkötést Watson-Crick féle bázispárosodásnak nevezzük (10. ábra). Ez az igen szelektív kötődés az oka annak, hogy a DNS kettős szálból a replikáció során kettő egymással tökéletesen megegyező kettős szálú DNS tud képződni.



10. ábra. Watson-Crick bázispárok

A DNS másodlagos szerkezetének kialakításában jelentős szerepe van a közvetlenül a nukleinsavhoz kötődő vízmolekuláknak, ezért jelentős az eltérés a viszonylag száraz körülmények között, illetve oldatban található nukleinsavak szerkezete között. A tényleges térbeli elrendeződés függ még a szekvenciától, valamint az oldat pH-jától és ionerősségétől is. Az igen sokféle változatos szerkezet abban különbözik egymástól, hogy minden nukleotid-egységen lehetőség van egyrészt a cukor *N*-glikozid kötése körüli rotációnak, azaz a nukleobázis elfordulásának (*szin-* és *anti*-konformációk), valamint a cukorrész pentózgyűrűje sem teljesen síkalkatú, hanem többféle, enyhén csavart konformációt vehet fel. Ezek főbb konformereit mutatja a 11. ábra.



11. ábra. A nukleozidok konformációi

Oldatban a DNS túlnyomó része a Watson és Crick által leírt B-DNS formában van jelen. Az ennél valamivel tömörebb A-DNS forma a kevésbé hidratált állapotban lévő kettős szálú DNS-re, a DNS-RNS heteroduplexekre, valamint az egyszálú RNS-ek önmagukkal alkotott RNS-RNS kettős szálú szakaszaira jellemző. Ebben a formában a kettős spirál közepén egy üreg helyezkedik el, mely a felülnézeti képen jól látszik. Másik jelentős különbség a B-formától, hogy a nukleobázispárok alkotta lépcsők a spirál tengelyére merőleges síkkal majd 20°-os szöget zárnak be. A zegzugos lefutású, a nukleobázisokat nem csak a spirál közepén szabályosan elhelyezkedve, hanem a szélén is tartalmazó Z-DNS a legkompaktabb forma. Balmenetes kettős szálát leginkább a metilezett nukleobázisokat tartalmazó kettős szálú DNS-ben találták meg. Feltételezhetően ennek a szerkezeti elemnek a génszabályozásban lehet jelentős funkciója.

A DNS harmadlagos és negyedleges szerkezete alatt a DNS kettős szál további felcsavarodását, valamint a DNS-hez nem kovalensen kötődő fehérjékkel kialakított szerkezetet értjük melyet minden esetben további másodlagos kötőerők (hidrogénkötések, ionpárképzés, apoláris kölcsönhatások) stabilizálnak.



12. ábra. A B, A és Z DNS szerkezete

1.1.7. Oligonukleotidok szilárd fázisú szintézise

A DNS oligomerek előállítására az esetek túlnyomó részében lépésenkénti szintézisstratégiát alkalmaznak. Napjainkban az oligonukleotidok döntő többségét szilárd fázison készítik és csak speciális esetekben (rövidebb szekvenciák, nagyobb lépték, módosított szerkezetek stb.) használnak oldatfázisú szintéziseket. Az alapvető eltérések az egyes eljárások között a foszfát-diészter kötés kialakításában vannak. A DNS oligomerek szintézisére alkalmazott foszforamidit illetve *H*-foszfonát módszerek közös jellemzője, hogy a kapcsolás intermedieren keresztül történik.

A foszforamidit módszer

Hatékonysága illetve gyorsasága miatt a legelterjedtebben alkalmazott eljárás. Szilárd hordozóként leginkább alkilamino csoportokkal derivatizált felületü kontrollált porozitású üvegport (CPG, controlled pore glass) használnak, amihez borostyánkősavamid illetve -észter kötéssel kötik az első nukleozidot. Egy-egy nukleozid kapcsolása több kémiai lépésben zajlik, melyek ciklikusan ismétlődnek a következő nukleotidok kapcsolásakor, ezért a módszer jól automatizálható. A szintetikus ciklust a 13. ábra szemlélteti.

Egy nukleotid monomer építőegység hozzákapcsolása a szilárd hordozóhoz kötött, egyre növekvő polimerszálhoz egy négylépéses ciklusban történik. A ciklus lépései a következők:

1. lépés (átmeneti védőcsoport eltávolítás): az 5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil) (DMTr) védőcsoport eltávolítása a szilárd hordozóhoz kötött polimer 5'-végéről. Ez egy éterkötés vízmentes, savas kezeléssel (acidolízissel) történő elbontása.

2. lépés (kapcsolás): a kapcsolási vagy kondenzációs lépés, amelyben a foszforamidit monomer és az 1*H*-tetrazol aktivátor (protontranszfer katalizátor) keveréke a szilárd fázishoz kötött polimer szabad 5'-hidroxilcsoportjával létrehozza a foszforossav-triészter kondenzációs terméket.

3. lépés (lefedés, capping): mivel a kondenzációs reakció nem 100 %-os hozamú, ezért ahhoz, hogy ne képződjenek hibás (kimaradt nukleotid egységeket tartalmazó rövidebb szekvenciájú) oligomerek, a kapcsolási lépést követően egy ecetsavanhidridet és piridint

tartalmazó acilező keverékkel az előző lépésben 1-2%-ban szabadon maradt hidroxilcsoportokat ecetsavésztert képezve lefedjük, lezárjuk.

4. lépés (P(III) \rightarrow P(V)-oxidáció): enyhén bázikus, piridines jódoldattal történik a foszforossav-triészter (foszfit-triészter) oxidációja a kívánt foszforsav-triészterré (foszfát-triészterré).

A szintézis befejezése: amikor a polimer teljes hossza elkészült, akkor az állandó védőcsoportok eltávolítása és a szilárd hordozóról történő polimerlánc hasítása egy lépésben, ammóniás hasítással történik. A nukleobázisok acil-védőcsoportjainak ammóniás hasítása hosszabb időt, 12-16 órát vesz igénybe 55 °C-on. A teljes hosszúságú oligonukleotidot a rövidebb szálaktól ioncserés kromatográfiával, fordított fázisú HPLC-vel, vagy gélelektroforézissel lehet elválasztani.



13. ábra. Oligonukleotidok szilárd fázisú szintézise

A H-foszfonát módszer

A másik modern, bár kevésbé elterjedt módszer nagymértékben hasonlít az előzőre. A Hfoszfonát módszer esetében a kialakuló foszfit diészter stabilitása a szintézis körülményei között jó, ezért az oxidációt nem szükséges minden ciklusban elvégezni, hanem a teljes lánchossz elérése után egyszerre az egész láncon. A módszer fő előnye a rugalmassága: az oxidálószertől függően igen sokféle internukleotid foszfáton módosított származék állítható elő.

1.2. Önszerveződő rendszerek

1.2.1. Magasabb rendű önszerveződő rendszerek, G-kvartettek, G-kvadruplexek

A molekuláris önszerveződés központi szerepet játszik számos meghatározó folyamatban a biológia illetve a szupramolekuláris kémia terén. A guanozin molekulák között létrejövő hidrogén-híd kötésekkel illetve alkálifém-kationnal stabilizált G-kvartett makrociklust először 1962-ben azonosították 5'-guanozin monofoszfát aggregációjából. Napjainkban a G-kvartettek számos tudományágban törtek felszínre, kezdve a szerkezeti biológiától az orvosi kémián illetve a szupramolekuláris kémián át egészen a nanotechnológiáig.³

1990-ben, Guschlbauer, Chanton és Thiele "Négyszálú nukleinsav szerkezetek 25 évvel később: a guanozin gélektől a telomer DNS-ig" címmel összefoglaló cikket tettek közzé,⁴ amelyben rámutattak az 1962-ben először azonosított G-kvartettek (14. ábra) fontosságára. Az 1980-as években, a DNS-ben kialakuló G-kvartettek újra a figyelem középpontjába kerültek a felmerülő ígéretes biológiai aktivitásuk miatt. Napjainkban sem csökkent a G-kvartett szerkezetek iránti fokozott érdeklődés. Több ezer publikáció és összefoglaló jelent meg a G-kvartettek szerkezetével illetve funkcójukkal kapcsolatban, beleértve néhány kitűnő összefoglalót is.⁵⁻¹¹



14. ábra. G-kvartett szerkezetek

A G-kvartett egy hidrogén-hidakkal stabilizált komplex, amely képes különböző kationok megkötésére és tökéletes modellként szolgál a molekuláris önszerveződés, illetve nem kovalens szintézisek tudományában. A molekuláris önrendeződés területe három részre osztható:

- 1) biomimetikus tanulmányok
- 2) nem kovalens kölcsönhatások alapjainak tanulmányozása
- 3) új összetett rendszerek szintézise



15. ábra. A molekuláris önszerveződés tanulmányozása

A 15. ábra az említett területek közötti kapcsolatot szemlélteti. A molekuláris önszerveződés kulcsfontosságú része a természetes és szintetikus rendszereknek és ezen jelenség megértésére szolgáló modellek gyakran a természet megfigyeléséből születnek (**A**-út).¹² A modell célja, hogy leegyszerűsítsen számunkra egy komplex rendszert, megengedve ezzel egy specifikus kölcsönhatás vizsgálatát, amely kulcsfontosságú lehet az önszerveződés szempontjából (**B**-út). A modell rendszer vizsgálatából nyert alapvető információk pedig lehetővé teszik az eredeti rendszer megértését (**C**-út), illetve új szintetikus rendszerek építését és ezek alkalmazását.¹³ A G-kvartett tökéletes modellként szolgál a molekuláris önszerveződés alapjainak a megértésére illetve ezek felhasználására.

1.2.2. Nem kovalens kölcsönhatások által stabilizált Lipofil G-kvadruplexek

A G-kvartett szerkezeti felépítése kihangsúlyozza azokat a különböző nem kovalens kölcsönhatásokat, amelyek a guanozin önszerveződésének folyamatát "katalizálják". Különböző alkálifém illetve alkáli-földfém kationok jelenlétében az 5'-*O-terc*-butil-dimetil-szilil-2',3'-*O*-izopropilidén-guanozin (G, **1**) egy apoláros oldószerekben stabil, kristályos lipofil G-kvadruplex szerkezetté rendeződik. A G-kvadruplex, több G-kvartett szerkezet függőleges "tapadó" kölcsönhatásából felépített macrociklus. Az elmúlt néhány év folyamán számos lipofil szerkezetű G-kvadruplex molekula kristályszerkezetét azonosították.¹⁴⁻¹⁸ A 16. ábrán feltüntetett

szerkezet $(1)_{16} \times 3K^+ \times Cs^+ \times 4pik^-$ (pik⁻= pikrát anion), szerves oldószerben egy 26×30×30 Å méretű és több mint 8500-as molekulatömegű egységes stabil szerkezetet alkot, amely 24 komponensből tevődik össze.¹⁴ Az így kialakult $(1)_{16} \times 3K^+ \times Cs^+ \times 4pik^-$ lipofil G-kvadruplex funkciója: egy önszerveződött ionofór, amely képes vizes közegből különböző sókat kivonni szerves oldószerek számára.



16. ábra. Egy lipofil G-kvadruplex kialakulása (M > 8500)

A nem kovalens kölcsönhatások kialakulását és a kvadruplex szerkezet létrejöttét három rendeződési szintre lehet felosztani (17. ábra). Az első szinten négy G (1) molekula hidrogén-híd kölcsönhatások segítségével egy sík alkatú G-kvartettet alkot. A második szinten a kialakult sík alaktú G-kvartettek "tapadó" kölcsönhatás segítségével kapcsolódnak egymáshoz, 3,3 Å távolságot tartva minden G-kvartett réteg között. Két síkalkatú G-kvartett réteg közé egy kation ékelődik be, amely kation-dipól kölcsöhatást létesít nyolc G (1) molekulával, stabilizálva ezzel a hidrogénkötések segítségével kialakult kvartett szerkezeteket illetve fokozva a rétegek közötti "tapadó" kölcsönhatást, kialakítva ezzel egy stabil C₄-szimmetrikus G₈×K⁺oktamer szerkezetet. A harmadik szinten négy pikrát molekula hidrogénkötések segítségével kapcsolódik a szabad aminocsoportokhoz. Az így képződött nukleobázis-anion hidrogénkötések két belső G-kvartett szerkezeteti egységet kapcsolnak össze a D₄-szimmetrikus hexadekamer [1]₁₆×4M⁺×4pik⁻szerkezetében, amely stabil szilárd halmazállapotban illetve oldatban is.¹⁴⁻¹⁷ A képződött szerkezet említésre méltó jellegzetessége a molekula belsejében egymástól 3,3 Å távolságra egy

vonalban elhelyezkedő kationok, amelyek egy belső ioncsatornát képeznek. A szerkezet belsejében lévő kationok közötti elektrosztatikus taszítást, a G-kvartett oxigén atomjai illetve a rétegek közötti aromás tapadó kölcsönhatás minimalizálja. A különböző nem kovalens kölcsönhatások (hidrogénkötések, kation-dipól és van der Waals kölcsönhatások) együttműködésének eredménye a szerkezetileg és sztereokémiailag is stabil lipofil G-kvadruplexek. Ezen nem kovalens kölcsönhatások együttes léte kulcsfontosságú jellemzője a guanozin önszerveződéseknek a biológiában és a szintetikus kémiában egyaránt.

I. szint: G-kvartett kialakulása hidrogénkötésekkel



II. szint: tapadó és kation-dipól kölcsönhatások segítségével kialakult oktamer szerkezet



III. szint: hexadekamer G-kvadruplex, anion-nukleobázis hidrogénkötésekkel



17. ábra. A kvadruplex szerkezet kialakulásának három lépése¹⁴

1.2.3. A guanozin-5'- monofoszfát önszerveződésének tanulmányozása

A guanozin származékok közismerten nehezen kezelhető molekulák laboratóriumi körülmények között. A guanozin önszerveződése nem meglepő jelenség: a molekulában található hidrogéndonor és -akceptor atomok illetve a molekula aromás felülete, ideális aromás tapadó

kölcsönhatás kialakítására.¹⁹ Az önszerveződő rendszerek ezen alapvető tulajdonsága már az 1960-as években megalapozódott, amikor Gellert és munkatársai beszámoltak a 3'-GMP (**2**) és 5'-GMP (**3**) (18. ábra) molekulákból álló rétegek kialakulásáról, amelyek hidrogénkötéssel stabilizált tetramerekből épültek fel. Diffrakciós módszerek segítségével megállapították, hogy a guanin molekula N1-H illetve N2-H hidrogén donor atomjai egy szomszédos guanin N7 és O6 atomjaival kapcsolódnak össze. A kialakuló G-kvartett makrociklus síkbeli elrendeződésü és 8 hidrogénkötéssel stabilizálódik. A hidrogénkötéssel stabilizált G-kvartettek hélix formába rendeződnek, amelyben minden G-kvartett egység 3,25 Å távolságra helyezkedik egymástól. Ezek az eredmények megegyeznek későbbi diffrakciós adatokkal, amelyeket guanozin analógok és poliguanilsav vizsgálatakor észleltek. Rövid idő elteltével ezen eredmények közlése után Fresco és munkatársai beszámoltak arról, hogy a poliguanilsav oldatban többszálú hélixet alkot, ami ebben az esetben is arra engedett következtetni, hogy a hidrogénkötésekkel stabilizált G-kvartetke aromás tapadó kölcsönhatással stabilizálják a kialakuló poliguanilát makrociklust.



18. ábra. G-kvartett építőkövek

Az 1970-1980-as években két kulcsfontosságú felfedezésre került sor a guanozin önszerveződésével kapcsolatban:

1. Az 5'-GMP (**3**) nem minden körülmények között képez gélt. Bázikus körülmények között az 5'-GMP (**3**) dianionos formában van jelen és kisebb önszerveződött szerkezeteket képez, amelyek vizsgálata NMR-spektroszkópiás módszerrel vált lehetővé.²⁰

2. Az alkálifémek közül különösen a K⁺- és a Na⁺-kationok képesek stabilizálni a kialakult komplexeket.²¹ A kationokkal kialakított kölcsönhatások érthetőek, hiszen a G-kvartettnek négy oxigénatomja a szerkezet belsejében helyezkedik el. A kationok megkötése nélkül a kialakult ciklikus elrendeződés elektronikusan kedvezőtlen lenne,²² ezért a kationokkal való kölcsönhatás kulcsfontosságú szerepet játszik a G-kvartett stabilizációjában.

A guanozin önszerveződésével kapcsolatos elméleteket különböző szerkezetvizsgálati módszerek támasztják alá: röntgen diffrakciós módszerek, cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD), elektrospray tömegspektrometria,^{23,24} illetve szilárd fázisú NMR-spektroszkópia. Az [1]₁₆×3K⁺/Cs⁺×4pik⁻ lipofil G-kvadruplex illetve a [d(GGGGTTTTGGGGG)]₄ szekvenciájú DNS kvadruplex molekula kristályszerkezetének a vizsgálata során megállapították, hogy a szerkezetek belsejében a stabilzáló K⁺ ionok "szendvics" formában vannak elhelyezkedve.^{14,25,26} Az említett szerkezetek NMR spektroszkópiás vizsgálatakor érdekes szupramolekuláris sztereokémiai jelenségekre lettek figyelmesek. Két királis G-kvarett (G₈×M⁺) tapadó kölcsönhatásából kialakuló szerkezet, a kialakuló "tapadó" kölcsönhatás orientációjától illetve a központi tengely körüli relatív forgatás irányától függően, legkevesebb hat lehetséges diasztereomer szerkezetettel rendelkezik. Az 5'-GMP×Na⁺ NMR-spektroszkópiás vizsgálataiból, csak két stabil diasztereomer jelenléte volt azonosítható, ami az önszerveződő folyamatok magas fokú sztereoszelektivitását bizonyítja. Ugyancsak NMR-spektroszkópiás vizsgálat eredményeként megemlíthető hogy a 5'-GMP×Na⁺ szerkezet NMR-spektrumában jól azonosítható elkülönült jelei voltak a monomernek és az önszerveződött struktúrának, ami a szerkezet kinetikai stabilitását bizonyítja. A [3]₈×Na oktamer szerkezet ²³Na NMRspektroszkópiás vizsgálata során Na⁺ ionok gyors "ki-be" mozgását igazolták, amelyek 10⁴- 10^8 /sec sebességgel mozogtak a szerkezetben, ami azt a tényt igazolja, hogy a kialakult szerkezeteknek nem kell teljes mértékben disszociálni ahhoz, hogy elengedjék a stabilizáló kationt.

A nem kovalens szerkezetek önszerveződésének folyamata fontos szerepet játszik az anyagtudományok és a nanotechnológia terén.²⁷ Az 5'-GMP (**3**) kitűnő modellvegyületként szolgál az önszerveződés folyamatának tanulmányozására.²⁸⁻³⁰ Magasabb koncentráció mellett az 5'-GMP (**3**) monomerből valamint, a d(GGGGGG) hexanukleotidból kialakuló GMP oligomerek egyaránt folyadékkristályokat képeznek vizes oldatban.^{28,29} Az említett oligomerek CD és röntgen diffrakciós vizsgálatai igazolták a G-kvartett tartalmú helikális szerkezetek kialakulását. Az a tény, hogy az önszerveződött G-kvadruplexek vizes oldatban folyadékkristályokká rendeződnek, fontos szerepet játszik az anyagtudományok és nanotechnológiai alkalmazások terén.

1.2.4. Nukleinsav G-kvadruplexek. Szerkezet és azonosítás

Azok a DNS és RNS oligonukleotidok amelyek guaninban gazdag szekvenciával rendelkeznek (kromoszómális telomer, gén promóter régiók, RNS rekombinációs szakasz)^{9,11} képesek G-kvadruplex képzésre, és ezen szerkezetek funkcionális szerepe az élő sejtekben hosszú időn át vitatott volt. Az elmúlt néhány évtizedben számos NMR-spektroszkópiás illetve röntgendiffrakciós tanulmány született a különböző G-kvadruplex szerkezetekről. Az oligonukleotidokból kialakult G-kvadruplex szerkezetek egymástól a lánc hosszúságában és orientációjában különböznek. A különböző kvadruplex szerkezeteket mindig kationok stabilizálják és négy különálló, kettő vagy akár egyetlen szálból is kialakulhatnak. NMR-spektroszkópiás vizsgálatok igazolják, hogy a guaninban gazdag oligonukleotid szekvenciák négy párhuzamos szálból álló kvadruplexet képeznek (19. ábra).^{31,32}



19. ábra. Négy (a), kettő (b, c) vagy akár egy (d) oligonukleotid szálból kialakuló kvadruplex szerkezetek

A [d(TGGGGT)]₄ kvadruplex molekula, Na⁺-ionokkal stabilizált kristályszerkezetében (20. ábra) két elkülönült hélixet találunk, amelyek négy G-kvartettet tartalmaznak, az 5'-végeknél összekapcsolódva azonos orientációval egy nyolc G-kvartettből alló "oszlopot" alkotnak.



20. ábra. Egy nyolc G-kvartettből álló "oszlop" szerkezet

A kialakult négyszálú DNS-ben hét, egy egyenes mentén elhelyezkedő kollineáris Na⁺ iont találunk, amelyek egy ioncsatornát hoznak létre és az így képződött szerkezet sokban hasonlít a $(1)_{16} \times 3K^+ \times Cs^+ \times 4pik^-$ molekulából képződött lipofil G-kvadruplex szerkezetre (16. ábra). A tetraplex DNS szerkezetében a Na⁺ ionok beékelődnek a G-kvartettek közzé, vagy kollineárisak a G-kvartett szerkezetekkel. A kationok egymáshoz való közelségéből eredő elektrosztatikus taszítást a G-kvartettek oxigén atomjai minimalizálják. Ab initio kvantumkémiai számítások segítségével megállapították, hogy a G-kvartett oxigénatomjai és a kation között töltésvándorlás van. Egyéb, a kialakult szerkezetre elvégzett számítások azt mutatták, hogy elsősorban a karbonil-kation kötési entalpia felelős a szerkezet stabilizálásáért, háttérbe szorítva ezzel a hidrogénkötéseket és az aromás tapadó kölcsönhatást.³³ További molekuladinamikai szimulációs számítások alátámasztották, hogy a G-kvadruplex DNS csak a Na⁺-ionok jelenlétében stabil, a stabilizáló Na⁺-ionok eltávolítása a rendszer azonnali összeomlását okozza.³⁴ Egy guaninban gazdag szekvenciájú oligonukleotid, G-G Hoogsten kölcsönhatás alapján hajtűszerkezetté képes alakulni (19. ábra, b, c). A kialakult hajtűszerkezet dimerizációjával egy bimolekuláris, két hurokkal rendelkező G-kvadruplex szerkezetet kapunk. A hurkok kétféle orientációval rendelkezhetnek, ezzel különböző szerkezeteket eredményeznek: 1) "oldalsó" hurok, amely összeköti a szomszédos nem párhuzamos szálakat (19. ábra, b).

2) "átlós" hurok, amely keresztezi a kialakult G-kvadruplex szerkezetet, összekötve a nem

párhuzamos szálakat (19. ábra, c).

A tetramolekuláris G-kvadruplex szerkezetek a kvadruplex nukleinsavak legegyszerűbb csoportjába tartoznak. NMR-spektroszkópiás és krisztallográfiai módszerek bizonyítottak, hogy a tetramolekuláris G-kvadruplexekben a szálak párhuzamos elhelyezkedésűek és a guaninglikozidos kötések minden esetben *anti*-konformációval rendelkeznek. Két szál összefonódásából keletkező bimolekuláris G-kvadruplexek esetében nagyobb számú topológiai variációval találkozhatunk. Egy klasszikus bimolekuláris G-kvadruplex szerkezetet a 21. ábra szemléltet.



21. ábra. Egy klasszikus bimolekuláris G-kvadruplex szerkezet

Az unimolekuláris G-kvadruplexek egyetlen szálból alakulnak ki és három hurokkal rendelkezhetnek (19d és 22. ábra). A bimolekuláris G-kvadruplex szerkezetek esetében előforduló hurkok mindegyike megjelenhet az unimolekuláris G-kvadruplex szerkezetekben. A guanin-egységekben gazdag emberi telomer szekvencia d[AG₃(TTAGGG)₃] vizes oldatban Na⁺- ionok jelenlétében antiparallel szerkezetetű G-kvadruplex szerkezetet eredményez egy "átlós" és két "oldalsó" hurokkal. K⁺-ionok jelenlétében az említett guanin egységekben gazdag szekvencia, képes más bonyolultabb szerkezetekbe önszerveződni.



22. ábra. Egy unimolekuláris G-kvadruplex szerkezet

A G-kvadruplexek kationfüggő szerkezetek és alkáli illetve alkáli-fém kationokkal stabilizálódnak. A K⁺- és Na⁺-kationok gyakoriak az élő sejtekben, ezért a G-kvadruplexek tanulmányozásában ezekre a kationokra irányul a legnagyobb figyelem.³⁵ A DNS és RNS G-kvadruplexek esetében általában a K⁺-ionok a kedvezményezett kationok a Na⁺-ionokkal szemben, mivel a K⁺-kationok méretükből adódóan könnyebben beékelődnek egy G₈-oktamerbe.

Hasonlóan az oligonukleotidokhoz, módosított vázú polimerek is képesek a G-kvadruplex képzésre. A nukleinsavakkal ellentétben a peptidnukleinsavak nem tartalmaznak cukor-foszfát láncot, helyette *N*-(2-aminoetil)glicin alapvázzal rendelkeznek.³⁶ A DNS-sel ellentétben a semleges PNS hibridizációját illetve önszerveződésének folyamatát nem destabilizálják a szálak között fellépő elektrosztatikus kölcsönhatások. A PNS-molekulák alkalmazása DNS analízisre nemcsak nagyobb érzékenységre és specifitásra nyújtanak lehetőséget, hanem a PNS-szálak kiváló hőmérséklet-, pH- és biológiai stabilitással is rendelkeznek. CD (cirkuláris dikroizmus) spektroszkópiás illetve fluoreszcens rezonancia-elektrontranszfer (FRET) vizsgálatok igazolták a DNS és PNS 1:1 arányú keverékéből kialakuló PNS₂-DNS₂ stabil szerkezetű hibrid G-kvadruplex kialakulását (23. ábra).



23. ábra. PNS₂-DNS₂ hibrid G-kvadruplex szerkezet³⁷

Bizonyos esetekben, a guaninban gazdag szekvenciák nemkívánt másodlagos szerkezetekké rendeződhetnek. A DNS-szekvenálás illetve a polimeráz láncreakció (PCR) kivitelezése guaninban gazdag szekvenciák esetén igazi kihívást jelent a nagymértékű önszerveződések miatt. Az ilyen jellegű problémák kiküszöbölése kémiailag módosított nukleobázis alkalmazásával történhet. A módosított nukleobázisok képesek ugyan a G-C Watson-Crick féle bázispárosodásra, de ezek a szerkezetek nem képesek önszerveződött szerkezetek kialakítására. A guanin egységek 7-dezazaguanin (4) egységekre való cseréje (ami az N7 atom eltávolítását jelenti) olyan rendszer előállításához vezet, amely nem képes stabil G-kvadruplexet képezni.³⁸ Hasonló jelenséget tapasztaltak a 6-tioguanin (5) egységek alkalmazásakor (24. ábra).



24. ábra. Kvadruplex szerkezetek kialakítására nem képes, módosított nukleobázisok

Molekuladinamikai számítások igazolták, hogy a 6-tioguanin egységeket tartalmazó DNS nem képes G-kvadruplex szerkezetek kialakítására, mivel a C6-on lévő kén atom túl nagy a stabil G-kvartettek kialakításáshoz.

1.2.5. A G-kvadruplex szerkezetek azonosítása: a G-kvartett szélei alapján

A G-kvartett szélein elhelyezkedő hidrogén donor (N₂-H és C₈-H) illetve akceptor atomok (N₃) mind a szerkezet azonosítására szolgáló részek (14. ábra, a, b). Ezek az azonosító helyek, amelyek a kialakult G-kvadruplex egész felületén az "árkok" mentén helyezkednek el, képesek víz, különböző ionok, aminosav-oldalláncok és egyéb nukleobázisok megkötésére. NMR-spektroszkópiával azonosítottak olyan hexamer és heptamer szerkezeteket, amelyekben két vagy három adenin nukleobázis hidrogénkötéssel kapcsolódik egy G-kvartetthez (25. ábra).³⁹



25. ábra. G-kvartett-adenin kölcsönhatás, hexamer és heptamer szerkezetekben

A G-kvadruplex szerkezetek azonosítása: azonosítás vízből

A kristályszerkezetek nagyon sok információval szolgálnak a G-kvadruplexek önszerveződésével, illetve azonosításukkal kapcsolatban. A G-kvadruplex felületén négy árkot találunk, amelyek magukba foglalják a C₈-H, N₂-H és N₃ atomokat. A vízmolekulák az egész szerkezetre kiterjedő hidrogénhíd kölcsönhatásokat létesítenek a guanin egységek széleivel, illetve a cukor-foszfát vázzal, kialakítva ezzel egy jól elrendezett hidratációs gerincet a Gkvadruplex árkában.

A G-kvadruplex szerkezetek azonosítása: azonosítás fehérjékből

A DNS és RNS oligonukleotidok, más néven aptamerek, képesek olyan másodlagos térbeli szerkezetet felvenni, amely nemkovalens jellegű kölcsönhatásokon keresztül egy adott célvegyület megkötésére alkalmas.⁴⁰ A célvegyületek lehetnek makromolekulák (pl. fehérjék), de kis molekulatömegű vegyületek is (pl. metabolitok, toxinok).

A legfontosabb DNS-fehérje kölcsönhatások:⁹

1) elektrosztatikus kölcsönhatások

2) van der Waals kölcsönhatások

3) vízmolekulákkal való hidrogénkötések kialakítása

4) nukleobázis-peptid kölcsönhatás

A G-kvadruplex szerkezetek azonosítása: G-kvadruplex aptamerek, szerkezetazonosítás kis molekulák segítségével

Kis molekulák képesek létrehozni DNS és RNS aptamereket és a G-kvartett szerkezetek gyakran részét képezik az aptamer szerkezeteknek. A porfirinnek hasonló molekulafelületi részei vannak, mint a G-kvartettnek és számos biofizikai illetve biokémiai tanulmány igazolta a porfirin és a G-kvadruplexek közötti kölcsönhatásokat illetve azt, hogy az említett aptamerek G-kvadruplex szerkezetté szerveződnek porfirin molekulák jelenlétében.⁴¹

1.2.6. Telomeráz inhibitorok: DNS G-kvadruplexeket stabilizáló kis molekulák

A telomer a kromoszómát alkotó DNS-szál két végén található rövid, többszörösen ismétlődő szakasz (embernél és állatoknál a TTAGGG kód ismétlődik több ezerszer). A telomeráz gátlásának egyik lehetősége az enzim-szubsztrát kölcsönhatások blokkolása, amíg ugyanis az egyszálú DNS egy telomeráz szubsztrát, a G-kvadruplex DNS nem. Az emberi telomerben ismétlődő 5'-TTAGGG-3' szakasz képes intramolekuláris G-kvadruplexek kialakítására, amelyek ionos körülmények között stabilak és gátolják a telomeráz működését. A telomeráz gátlása tehát az egyszálú DNS és a kialakult G-kvadruplex szerkezet közötti egyensúly váltakozásától függ. Nagy affinitású kis molekulák megkötése hatékony stratégia lehet a G-kvadruplexek stabilizálására (26. ábra). Az első beszámoló 1997-ben jelent meg, amely egy antrakinon származék DNS G-kvadruplex-megkötő és telomerázgátló hatását tárgyalta.⁴² Az elmúlt évtizedben több száz kis molekulánál tapasztaltak hasonló telomerázgátló hatást, viszont nyitott maradt a kérdés az aromás molekulák és a DNS G-kvadruplex közötti kölcsönhatással kapcsolatban. NMR-spektroszkópiás, száldiffrakciós és röntgenkrisztallográfiás vizsgálatok azt igazolták, hogy a telomeráz inhibitorok aromás-aromás "tapadó" kölcsönhatással kapcsolódnak a G-kvadruplex szerkezetek két széléhez.



26. ábra. Nagy affinitású kis molekulák kölcsönhatása G-kvadruplex szerkezetekkel⁴³

1.2.7. Guanozin önszerveződések az anyagtudományokban, bioszenzorok tervezése és nanotechnológia

A nanotechnológia egyik virágzó területe nagymértékben függ a megfelelő molekulák nanométer, illetve mikrométer skálán való elhelyezésétől.^{44,45} A négyszálú G-kvadruplex molekula ideális szerkezetnek bizonyult az adott paraméterek között. A kristályszerkezetű GMP

(2, 3) és poliguanilsav száldiffrakciós vizsgálatai igazolták, hogy ezek a molekulák aromásaromás tapadó kölcsönhatással összekapcsolt G-kvartett "rúd" szerkezetté szerveződnek. A kialakult polimerek rendkívül stabilak voltak: 80 °C-ra felmelegítve illetve 8 M tiokarbamid oldatban oldva sem sikerült denaturálni a szerkezeteket. Marsh és Henderson elnevezte az említett szerkezeteket G-drótoknak (G-wires),⁴⁶ helyesen meghatározva ezzel a folyamatos, párhuzamos elhelyezkedésű DNS szuperstruktúrákat (27. ábra).



27. ábra. DNS szuperstruktúrák: G-drótok, felbomlott G-drótok⁴⁶

Atomerő-mikroszkópia (AFM) segítségével analizálhatóvá váltak a $d(G_4T_2G_4)$ oligomerből kialakuló G-drótok, amelyek 10-1000 nm hosszúságúak és 18-25 Å szélességűek. A kationok jelenléte a G-drótokban, a G-kvartett szerkezetekhez hasonlóan nélkülözhetetlen a megfelelő stabilitás biztosítása érdekében. Na⁺-ionokat adva a rendszerhez, egy sokkal hosszabb és kevésbé összenyomható szerkezet keletkezett a duplex DNS-hez képest.

Több mint harminc évvel az 5'-GMP gélek azonosítása után, a G-kvartettek igen fontos szerepet kaptak a DNS G-kvadruplexek biológiai jelentősége miatt. A nukleinsavak szerkezetének feltárása rohamosan felgyorsult az elmúlt évtizedben, amelynek köszönhetően napjainkban számos G-kvadruplex szerkezete ismeretes. Ezek az adatok gazdag információforrásként szolgálnak a nem kovalens kölcsönhatásokról, amelyek a guaninban gazdag nukleinsavak önszerveződését katalizálják.

1.3. N-Alkilguanin-származékok [I, II]

A guanin a dezoxi-ribonukleinsavakban illetve ribonukleinsavakban jelenlevő általános purin nukleobázis. A DNS és RNS-ben megtalálható 9-glikozilezett származékain túl, a guanin előfordul *N*-alkilezett formában is. A DNS és RNS molekulákat különböző mutagén illetve karcinogén hatásoknak kitéve, exogén guanin származékok keletkeznek: 7-metilguanin, 7etilguanin, akrolein-2'-dezoxiguanin adduktumok (28. ábra), ugyanakkor az *N*-alkilguaninok endogén körülmények között is léteznek, sokoldalú szerepeket betöltve. A ribonukleinsavak különösen nagyszámú módosított nukleobázist tartalmaznak, mint a wyosine és wybutosin, amelyek mindketten guanozin származékok, valamint a mezofil és hipertermofil élőlényekben a tRNS funkcióinak kibővítésért felelősek, fokozva a hőmérséklet-toleranciájukat és megnövelve ezzel a sejtek élettartamát.



28. ábra. N-Alkilguanin-származékok

A 7-metilguanin származékok, ún. "zárószerkezetek" a hírvivő RNS metabolizmusában fontos szerepet játszanak, a hírvivő RNS-t a sejtmagtól a citoplazmáig szállítják, valamint kontrollálják a hírvivő RNS stabilitását. A guanin származékok a természetben előforduló származékaikkal együtt, illetve a vírusölő sajátságokkal rendelkező acyclovir, ganciclovir és penciclovir megjelenésével, amelyek hatásos gyógyszerek a herpesz (herpes simplex, HSV) és a bárányhimlő (varicella zoster, VZV) vírusfertőzéseknek, nagymértékben megnövelték az *N*-alkilguaninok értékét. Az *N*-alkilguaninok szintézisét és tulajdonságait egy összefoglaló cikkben tekintettük át [I]. Az *N*-alkilguaninok továbbá nagyon sok esetben tökéletes modellvegyületként szolgálnak különböző anyagok kölcsönhatásaiban, például a rákellenes hatóanyagként ismert ciszplatin és származékainak kölcsönhatása a nukleozidokkal és nukleotidokkal. Az *N*-alkilguaninok fém-komplexeinek egy fontos családja (a rákellenes ciszplatin komplex stb.) az "*N*-alkilguaninok átmenetifém-komplexei" című összefoglaló cikkünkben részletesen megtalálható [II].

1.4. Purin alkaloidok

1.4.1. Xantin alkaloidok (koffein, teofillin, teobromin)

A purin alkaloidok a purin nukleotidok másodlagos metabolitjai,⁴⁷ több mint 100 különböző növényfajban megtalálhatóak.^{48,49} A metilxantinok, mint a koffein (1,3,7-trimetilxantin), teobromin (3,7-dimetilxantin) és metil-húgysav, mind a purin alkaloidok csoportjába tartoznak (29. ábra), és megtalálhatóak a teában, kávéban és számos alkoholmentes üdítőben is.



Xantin és metilxantinok



Húgysav és metilhúgysavak

Szerkezetek	Triviális nevek	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	0-2
Xantin és metilxantinok						
xantin		Н	Н	Н	-	-
1-metilxantin		CH_3	Н	Н	-	-
3-metilxantin		Н	CH_3	Н	-	-
7-metilxantin		Н	Н	CH ₃	-	-
1,3-dimetilxantin	teofillin	CH_3	CH_3	Н	-	-
1,7-dimetilxantin	paraxantin	CH_3	Н	CH ₃	-	-
3,7-dimetilxantin	teobromin	Н	CH ₃	CH ₃	-	-
1,3,7-trimetilxantin	koffein	CH_3	CH ₃	CH ₃	-	-
Húgysav és metilhúgysavak						
Húgysav		Н	Н	Н	Н	-
1,3,7-trimetilhúgysav		CH ₃	CH ₃	CH ₃	Н	-
1,3,7,9-tetrametilhúgysav	theacrine	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-
O ² ,1,9-trimetilhúgysav	liberine	CH ₃	Н	Н	CH ₃	CH ₃
O ² ,1,7,9-tetrametilhúgysav	metylliberine	CH ₃	Н	CH ₃	CH ₃	CH ₃

29. ábra. A xantin és húgysav vázon alapuló purin alkaloid szerkezetek
A koffeint először teából és kávéból izolálták az 1820-as évek első felében, de a koffein bioszintézise illetve a koffein metabolizmusa egészen 2000-ig ismeretlen volt. A koffein szerkezetének a feltérképezése a XIX. század végére született meg és Hermann Emil Fischer német kémikus nevéhez fűződik, aki először írta le a koffein teljes szintézisét, amely szerves része volt Fischer 1902-ben Nobel-díjjal jutalmazott munkásságának.

1.4.2. A koffein bioszintézise

A koffein bioszintézisét illetve annak különböző útjait, elsősorban a kávéban illetve a teanövényekben már nagyon régóta vizsgálják. Az a tény, hogy a koffein elfogyasztása káros hatással van az emberi szervezetre, illetve a dekoffeinezett termékek iránti megnövekedett igény némileg serkentőleg hatott a kutatásokra. Ashihara és Suzuki⁵⁰ majd Schulthess és munkatársai⁵¹ első ízben írták le a koffein bioszintézisét. A 30. ábrán feltüntetett két alternatív reakcióút (szaggatott vonal) a kávécserjében és a tea növényekben lejátszódó szintetikus folyamatokat szemlélteti.⁵¹



R-P=ß-D-ribofuranóz-5'-foszfát

30. ábra. A koffein bioszintézisének lépései, a xantozintól a koffeinig. Az egyes lépéseket katalizáló enzimek:
(SAM) S-adenozil-L-metionin, (SAH) S-adenozil-L-homocisztein, (1) 7-metilxantozinszintáz;
(2) N-metilnukleozidáz; (3) teobrominszintáz; (4) koffeinszintáz.⁵¹

A koffein bioszintézise négy lépésben foglalható össze, amelyből három metilezés, egy pedig nukleozidáz reakció. A koffein xantin alapú vázát a purin nukleotidok szolgáltatják. A koffein bioszintézisének első (láncindító) lépése a *N*-metiltranszferáz enzim segítségével törénő xantozin metilezése. Radioizotópokkal jelzett kísérletek illetve az *N*-metiltranszferáz enzim szubsztrátspecifitása alapján arra lehet következtetni, hogy a koffeinhez vezető fő útvonal a következő: xantozin \rightarrow 7-metilxantozin \rightarrow 7-metilxantozin \rightarrow teobromin \rightarrow koffein.

Annak ellenére, hogy ezek az információk nagyrészt a kávéból (*Coffea arabica*) és a teából (*Camelia sinensis*) származnak, a meglévő bizonyítékokból arra lehet következtetni, hogy a koffein bioszintézisének a mechanizmusa más purin tartalmú növényekben is hasonló, mint például: a mate (*Ilex paraguariensis*)⁵² és a kakaó (*Theobroma cacao*).^{53,54}

A koffein bioszintézisének az első lépésében a 7-metilxantozin előállítására kerül sor xantozinból kiindulva. А metilezési reakciót 7-metilxantozinszintáz $(xantozin-N^7-)$ metiltranszferáz) katalizálja. A 7-metilxantozinszintázt kódoló géneket először kávéból (C. arabica) izolálták.55,56 A bioszintézis második lépése egy nukleozidáz (N-metilnukleozidáz) segítségével történik, amely katalizálja a 7-metilxantozin hidrolízisét. A kávéból izolált 7metilxantozinszintázzal kapcsolatos részletes szerkezet vizsgálatok szerint a bioszintézis első és második lépésében lejátszódó metilezés és a nukleozid- hasítás egymáshoz tartoznak és egy enzim katalizálja őket.⁵⁷ A koffein bioszintézisének az utolsó két lépését egy SAM-specifikus *N*metiltranszferáz enzim katalizálja, amely nem azonos az első lépést katalizáló N-metiltranszferáz enzimmel. Natív N-metiltranszferáz aktivitást azonosítottak nyers és részlegesen tisztított tea és kávé növényi kivonatokban. A bioszintézis utolsó két lépését a koffeinszintáz nevű enzim katalizálja, amely a koffein előállításáért felelős 7-metilxantinból, teobrominon keresztül. A rekombináns teobrominszintáz aktivitása specifikus a 7-metilxantin teobrominná való átalakításában. A rekombináns koffeinszintáz képes paraxantint, teobromint és 7-metilxantint is hasznosítani a koffein előállítására (30. ábra). Annak ellenére, hogy a paraxantin a legaktívabb szubsztrátja az említett rekombináns enzimnek, csak korlátozott mennyiségű paraxantin szintetizálódik a növényi sejtekben, tehát az in vivo módon előállított koffeinszintáz, elsődlegesen a koffein előállításáért felelős (7-metilxantinból teobrominon keresztül). A teobromint tartalmazó kakaón és kínai teán radioizotópok segítségével elvégzett kísérletek azt igazolják, hogy az említett növényekben a teobromin csak korlátozott mennyiségben alakul át koffeinné. Nyers teakivonatból (C. ptilophylla) azonosították és izolálták azt az N- metiltranszferáz enzimet, amely csak a 7-metilxantin teobrominná való átalakulását katalizálja.⁵⁸ Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a teobromint tartalmazó (felhalmozó) növényekben egy specifikus teobrominszintáz enzim van jelen, amely kizárólag a teobromin szintéziséért felelős.

1.4.3. A koffein bioszintéziséhez szükséges xantozinforrás

A xantozin a purin alkaloidok szintézisének első szubsztrátja, legalább négy különböző úton állítható elő és hasznosítható a koffein bioszintéziséhez: *de novo* purin bioszintézis (de novo út), az adenin és guanin nukleotidok bomlásának útjai (AMP-út és GMP-út) és az *S*-adenozil-L-metionin (SAM)-ciklus (31. ábra).





A purin nukleotidok előállítása a *de novo* szintézis eredménye nem purin alapú prekurzorok segítségével, azaz szén-dioxid, 10-formiltetrahidrofolát, 5'-foszforibozil-1-pirofoszfát, glicin, glutamin, és aszpartát révén történik. A xantozinhoz vezető fő útvonal a

következő: IMP \rightarrow XMP \rightarrow xantozin, amelyet az IMP-dehidrogenáz és 5'-nukleotidáz enzimek katalizálnak. Az IMP-dehidrogenáz gátolja annak az enzimnek a működését, amely a tea és kávé levelekben végbemenő koffein-bioszintézist korlátozza.⁵⁹ A bioszintézishez szükséges xantozin egy része a *de novo* szintézisútban keletkező adenin és guanin nukleotidokból származik. Létezik néhány potenciális út az AMP-ből kiinduló xantozin előállításra, de az AMP \rightarrow IMP \rightarrow XMP \rightarrow xantozin irány a domináns. Mindhárom enzimet, amely az átalakulást katalizálja, az AMPdeamináz, IMP-dehidrogenáz és az 5'-nukleotidáz enzimeket azonosították és izolálták tealevelekből.⁶⁰ Egy másik út a bioszintézishez szükséges xantozin előállítására guanin nukleotidokból kiindulva a GMP \rightarrow guanozin \rightarrow xantozin útvonal. A szintézisben résztvevő guanozin-dezamináz enzim aktivitását igazolták sejtmentes tealevelek kivonatában, de a GMPdezamináz aktivitását nem sikerült feltérképezni.⁶¹⁻⁶³ A GMP-deamináz enzim hiányából arra következtethetünk, hogy a GMP \rightarrow IMP \rightarrow XMP \rightarrow xantozin szintézis útvonal a növényekben nem működik.

A SAM (*S*-adenozil-L-metionin) a koffein bioszintézisének mindhárom metilezési reakciójában a metil donor szerepét tölti be. A metilezési folyamatok során a SAM *S*-adenozil-L-homociszteinné (SAH) alakul, majd homociszteinné és adenozinná hidrolizálódik. Az említett ciklusban felszabadult adenozin közvetlen/közvetett módon adeninen keresztül átalakul adenozin monofoszfáttá (AMP). Az így keletkezett AMP a koffein bioszintéziséhez szükséges xantozinná alakul.

1.4.4. A koffein metabolizmusa

A koffein számos fiatal növény levelében és éretlen gyümölcsökben keletkezik és idővel felhalmozódik az említett növényi szervezetek fejlődése során. A koffein szerkezetében szereplő három metilcsoport eltávolítása a xantin keletkezését eredményezi, amely a természetben egy lassú folyamat részét képezi. A kávélevelekben levő koffein metabolizmusát előszőr 1965-ben Kalberer közölte.⁶⁴ A koffein metabolizmusának első feltérképezése óta számos kísérletet végeztek ¹⁴C-izotóppal jelzett purin alkaloidokkal,⁶⁵⁻⁶⁸ amelyek eredményeképpen megállapították, hogy a koffein metabolizmusának a fő útja a koffein \rightarrow teofillin \rightarrow 3metilxantin \rightarrow xantin átalakulás. A koffein metabolizmusában keletkező xantin, a purin metabolizmusának fontosabb lépéseiben tovább bomlik húgysavon keresztül szén-dioxidra és ammoniára, majd allantoinra és allantoátra (32. ábra).



32. ábra. A koffein metabolizmusának folyamatábrája⁶⁹

A koffein metabolizmusa általában a koffein, teofillinné való átalakulásával kezdődik, amelyet az N^7 -demetiláz enzim katalizál. A teofillin sokkal gyorsabban bomlik szén-dioxidra, mint a koffein, ezzel is bizonyítva, hogy a koffein teofillinné való bomlása a meghatározó útvonal a koffein metabolizmusában, illetve magyarázatot ad arra a tényre, hogy miért halmozódik fel nagy koncentrációban a koffein egyes növényekben (*C. sinensis, C. arabica*).^{66,70}



33. ábra. A koffein metabolizmusának útjai. A koffein túlnyomórészt xantinná és 3-metilxantinná bomlik teofillinen keresztül. Az így képződött xantin tovább bomlik a purin metabolizmus útjait követve széndioxidra és ammóniára.

2. Célkitűzések

A xantinszármazékok meghatározó szerepet játszanak számos enzim illetve enzimatikus rendszer intracelluláris anyagcsere-folyamataiban mint szubsztrát és/vagy köztitermékek. Eddig nem vizsgálták, hogy milyen tulajdonságokkal rendelkeznek a 3-szubsztituált xantinszármazékok az esetlegesen kialakuló magasabb rendű tetramer illetve kvadruplex szerkezetekben.

1. A QUILD program keretein belül elvégzett számítógépes molekulamodellezési és sűrűségfunkcionál-elmélet számítások (DFT) alapján a 3-metilxantin, a 9-metilguaninhoz és 9metilhúgysavhoz hasonlóan, ígéretes tetrád- és kvadruplexképző sajátságokkal rendelkezik a magasabbrendű szerkezetek kialakulása esetén. A feltételezett kölcsönhatások vizsgálatához a 3metilxantin szintézisét, majd az előállított célvegyület MS és NMR karakterizálását terveztem a magasabb rendű önszerveződő rendszerek kialakulásának és igazolásának céljából.

2. A 3-metilxantinra elvégezett ígéretes molekulamodellezési számításokat alapul véve olyan 3-szubsztituált xantin-heterociklust tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav (DNS) és peptidnukleinsav (PNS) monomerek szintézisét terveztem, amelyek közvetlenül felhasználhatóak 3-szubsztituált xantintartalmú DNS és PNS oligomerek szilárd fázisú szintézisére. A szilárd fázisú szintézis segítségével előállított 3-szubsztituált xantin-tartalmú DNS és PNS oligomerek vizsgálatára MS és NMR spektroszkópiás módszerek alkalmazását terveztem, amelyek segítségével igazolhatóak a 3-szubsztituált xantintartalmú, magasabb rendű önszerveződő rendszerek kialakulása. Hasonlóan a guanin kvartett és kvadruplex szerkezetek kialakulásához, várhatóan a 3-szubsztituált xantinok domináns 7*H*-tautomer formája elősegíti a tetramer illetve kvadruplex szerkezetek kialakulását.

3. Saját eredmények tárgyalása

3.1. Előzmények [III]

3.1.1. Semleges és pozitívan töltött új purin tetramer szerkezetek

Az önszerveződő képességekkel rendelkező molekulák, széles körben felhasználhatóak a szupramolekuláris kémia, orvosi kémia, szerkezeti biológia és a nanotechnológiai alkalmazások terén.⁷¹ A G-tetrádok azonosítása óta, elméleti számolásokra és kísérleti eredményekre alapuló nagyszámú kvadruplex szerkezetet azonosítottak. Az új szerkezetek számos módosítást tartalmaznak, kezdve a guanin nukleobázison történő változtatásoktól egészen a teljes monomer egység helyettesítéséig. Minden esetben bebizonyosodott, hogy a kationok nagyon fontos szerepet játszanak a kialakult kvadruplex szerkezetek stabilitásában, beékelődve a tapadó tetrád szerkezetek közzé, valamint negatív töltéssel rendelkező molekulák kölcsönhatása a kvadruplex szerkezetekkel tovább növelheti a szerkezet stabilitását. Az említett esetek mindegyikében a kialakuló kvadruplex szerkezet elektromos szempontból semleges volt. A töltéssel rendelkező kvadruplex szerkezetek fontosak lehetnek nemcsak a különböző ionok megkötése céljából, hanem új lehetőségeket nyitnak a magasabb rendű szerkezetek tervezése terén is (nano-drótok). Az eddigi megállapítások szerint a G-kvartett szerkezetek a legmegfelelőbb molekulák a tapadó kölcsönhatások kialakulására mivel a guanin egységek erős kölcsönhatással kapcsolódnak egymáshoz, ami egy optimális síkbeli alakot biztosít a szerkezetnek.⁷² Más purin alapú tetramereket is vizsgáltak, de ezek a szerkezetek minden esetben gyengébb kölcsönhatásokat tartalmaztak, illetve kevésbé síkbeli alkattal rendelkeztek.73 A kevésbé síkbeli alkat kialakulása érthető ezekben a szerkezetekben, mivel a nukleobázisok csak egy hidrogénkötéssel kapcsolódnak egymáshoz ezekben a tetramerekben, ami nagyobb flexibilitást illetve a síkalkattól eltérő szerkezetet biztosít a molekulának. Jelen tanulmányban bemutatjuk, hogy a xantin tartalmú szerkezetekben két alacsony potenciálgátú hidrogénkötés kialakulására van lehetőség a szomszédos xantin egységek között, valamint azt, hogy a természetben előforduló húgysav képes a tetramer képzésre xantin segítségével illetve nélküle.⁷⁴ Következtetésképpen a kialakuló rendszer egy pozitív töltéssel fog rendelkezni, ami erős kölcsönhatás kialakulásával jár. Elméleti számítógépes számításokra alapozva, olyan kvartett rendszerek kialakulását feltételezzük, amelyek pozitív töltéssel, illetve töltés nélkül alakulnak ki xantin illetve húgysav

származékokból. Az elvárásainknak megfelelően a kialkuló szerkezetek képesek különböző anionokkal való kölcsönhatásra, valamint a monomerek közötti két erős hidrogénkötés kialakulása síkalkatot kölcsönözhet a szerkezeteknek. A legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan tetramer amelyben, a pozitív töltés a tetramer szerkezethez tartozik, nem pedig a központi fémionhoz.

3.1.2. 9-Metilxantin (Xa) és 9-metilhúgysav (Ua) monomerek, dimerek és tetramerek

Az elméleti számítógépes molekulamodellezési illetve sűrűségfunkcionál-elmélet számításokat a QUILD program keretein belül végeztük. A xantin és a húgysav természetben előforduló nukleobázisok (34. ábra), amelyek ebben az esetben egy adott alapvázhoz (cukorfoszfát, PNS) való lehetséges kapcsolódási módott modelleznek, azonban a xantin N(7)-en protonált formájának (XaH⁺) kiemelt szerepe van a kialakuló rendszerekben.



34. ábra. A 9-metilxantin (Xa) és 9-metilhúgysav (Ua) pK_a és pK_b értékei. A kísérleti pK_a értékek dőlt betűvel a becsült elméletei értékek szögletes zárójelben, valamint a pK_b értékek aláhúzott karakterrel jelöltem.⁷⁵⁻⁸⁰

A 35. ábra a kialakult optimalizált dimer szerkezeteket szemlélteti (kötési energiákkal és a megfelelő hidrogénkötés-távolságokkal), amelyek a kialakuló kvartett szerkezetek elsődleges kölcsönhatásait képviselik. A feltüntetett pK_a értékek alapján a vizsgált töltéssel rendelkező struktúrák erősen savas körülmények között alakulhatnak ki.



35. ábra. A tetramer szerkezetek kialakulásához szükséges dimmer kölcsönhatások (a számított kötési enegiák zárójelben vannak, kcal/mol), valamint az optimalizált hidrogénkötés-távolságok a proton és az akceptor heteroatom között.

Amint az a 35. ábrán is látható, a dimer szerkezetekben kialakuló kötési energiák igen ígéretesek, különösen az alacsony potenciálgátú hidrogénhidak jelenlétében. Az egyedüli kivétel a XaH⁺-XaH⁺ kölcsönhatás mivel ebben az esetben a kötési energia és a kölcsönhatási energia is pozitív. Figyelembe véve a XaH⁺-Xa és a XaH⁺-XaH⁺ dimerek közötti nagy kötésienergiabeli különbséget, egyszerű magyarázatot találunk a XaH⁺-XaH⁺ dimerek esetében kapott eredményre, mivel ebben az esetben a hidrogénkötések nem tudják kompenzálni a molekulán belül kialakuló elektrosztatikus taszító erőket. Az új dimer szerkezetek további *váltakozó* hidrogénkötéseket tartalmaznak (proton donor és akceptor mindkét monomerben), ellentétben a G-G dimerekkel. Az említett váltakozó hidrogénkötések elősegítik a síkalkat kialakulását, ami nagyon fontos a kvadruplex szerkezetek kialakulása szempontjából, mivel a sík alkatú tetramerek hatékonyabbak a tapadó kölcsönhatások kialakításában. A kapott kötésienergia-értékeknek köszönhetően a legstabilabb kvadruplex szerkezet az XaH⁺ és az Ua molekulák kötött alakulhat ki, de az Ua

molekulákból képződött tetramer szerkezet is ígéretes. Az előbb említett esetekben a kialakuló kvadruplex szerkezetek kétszeresen pozitív töltéssel rendelkeznek, az utóbbi pedig semleges marad. Nyitott maradt viszont a kérdés, hogy a $(XaH^+)_4$ szerkezetek stabilizálhatóak-e negatív ionok kölcsönhatása révén.

A 36. ábrán látható tetramerek az említett dimer szerkezetekből épültek fel. Egyesek közülük csak egy féle monomerből [(Ua)₄, (Xa)₄, (XaH⁺)₄] épülnek fel hasonlóan a G-tetramer szerkezetekhez, viszont vannak olyan szerkezetek, amelyek két különböző monomer egyséket tartalmaznak.



36. ábra. A vizsgált tetramer szerkezetek. A zárójelben lévő számok a számított kötési energiát mutatják (kcal/mol)

Az össztöltéseknek köszönhetően, +4, +2, és zérus töltéssel rendelkező komplexeket, valamint 8, 6, és 4 hidrogénkötést tartalmazó szerkezeteket kaptunk.

A 37. ábra a tetramer szerkezetekből származtatható alternatív fragmentálódást szemlélteti, amely minden esetben két különböző dimer fragmens közötti kölcsönhatásra lett kiszámolva. Kétféle fragmentálódási lehetőséget különböztetünk meg, (AB)+(CD) és

(AD)+(BC) típusok, a 37. ábrán feltüntetett A, B, C, és D régiók alapján. A (XaH⁺-Xa)₂ tetramer fragmentálódási analízise során a következő eredményeket kaptuk: az (AB)+(CD) esetén 1,36 kcal/mol valamint a (AD)+(CD) esetén -19,92 kcal/mol kölcsönhatási energia értékeket kaptunk. A pozitív kölcsönhatási energia értékek, ellentétben a dimerek vizsgálatakor kapott értékekkel (35. ábra) egyértelműen azt mutatják, hogy ennek a tetrádnak a kialakulása kedvezőtlen. Ezek a tények azt mutatják, hogy az AD és BC dimer fragmensek között erős kölcsönhatás van (semleges és protonált formában lévő xantin között), de a hidrogénkötések nem elég erősek ahhoz, hogy kompenzálni tudják az AB és CD dimerek között (mindkettő pozitív töltéssel rendelkezik) kialakuló elektrosztatikus taszítást.



	(Xa-Ua) ₂	(XaH+-Ua) ₂	(XaH ⁺ -Xa) ₂	(Ua) ₄	G_4
(AB)+(CD)	-22.67	-3.53	1.36	-23.40	-46.79
(AD)+(BC)	-5.54	-18.63	-19.92	-23.40	-46.79

37. ábra. Dimer fragmentációk. Az A, B, C és D monomerekből kialakult dimer szerkezetek, a dimerek közötti kölcsönhatási energiát a táblázat szemlélteti.

Hasonló adatokat kaptunk a (XaH⁺-Ua)₂ tetramer vizsgálata esetén: -3,53 kcal/mol és -18,63 kcal/mol kölcsönhatási energiák az AB+CD illetve az AD+BC fragmentálódások esetén. Az Ua monomer N(7)-H atomja és az XaH⁺ monomer O(2) atomjai között kialakuló hidrogénkötés nagyon gyenge, ami a H(7)···O(2) atomok közötti viszonylag nagy kötéstávolsággal magyarázható (2,13 Å) (35. ábra). Annak ellenére, az elméleti számítások alapján a kialakult

dimer szerkezetek ígéretes kölcsönhatásokat tanúsítottak a modellezett tetramer szerkezetekben, minden esetben a vártnál gyengébb kölcsönhatások jelentkeztek, mint a G-tetrádok esetében. Az alacsony potenciálgátú hidrogénkötéseknek köszönhetően, a tetramerekben extra kölcsönhatások alakultak ki a dimer szerkezetek között, valamint a pozitív töltéssel rendelkező szerkezetek képesek voltak különböző anionokkal való kölcsönhatásra.

Az tárgyalt elméleti számítógépes vizsgálatok eredményeinek a kísérleti (MS, NMR) igazolása jelenleg folyamatban van.

3.2. 3-Szubsztituált xantinok [IV]

3.2.1. 3-Szubsztituált xantinok mint ígéretes kvadruplexképző molekulák

Azok a kvadruplex szerkezetek, amelyek legkevesebb két tetrád vagy tetramer szerkezet "tapadó" kölcsönhatásából alakulnak ki, illetve különböző kationok segítségével stabilizálódnak (Na⁺, K⁺, NH₄⁺), különböző optoelektronikai sajátságokkal rendelkező szupramolekuláris rendszerek alap építőelemei lehetnek.⁸¹⁻⁸³ Eddig számos változatos alakzatot javasoltak a kialakult guanin rendszereknek, és minden esetben kísérletileg vizsgálták a kialakult kvadruplex szerkezeteket. Más purinvázas (adenin, hipoxantin)^{72-74,84-88} és pirimidinvázas (uracil, timin, citozin)⁸⁹⁻⁹⁵ molekulák esetében is végeztek számítógépes ill. kísérleti vizsgálatokat, amelyben az említett molekulák kvadruplexképző sajátságait vizsgálták. A számítógépes modellezés és kísérletek azt mutatták, hogy minden esetben a kialakult tetrád szerkezetekben az egymással szomszédos heterociklusok között csak egy stabilizáló hidrogénkötés alakult ki, amely gyengébb kölcsönhatást és kevésbé sík alkatot kölcsönzött a kialakult szerkezeteknek, mint a guanin tetrádok esetében.

A jelen tanulmányban a 3-szubsztituált xantinok (purin származékok) magasabbrendű szerkezetekbe való önszerveződésének képességeit vizsgáltuk. A 3-szubsztituált xantinok domináns 7*H*-tautomer formája lehetővé teszi, hogy a kialakult tetrád szerkezetben a szomszédos xantin egységek két hidrogénkötéssel kapcsolódjanak egymáshoz, hasonlóan a guanin tetrádok kialakulásához. Ezek alapján feltételeztük, hogy a kialakuló magasabb rendű szerkezetben, a xantin egységek között erős kölcsönhatások, és teljesen sík alkatú szerkezet alakul ki gázfázisban

is. Az említett vizsgálatok elvégzéséhez a legegyszerűbb purin modellt, a 3-metilxantint választottuk (38. ábra) kationokkal és kationok nélkül.



38. ábra. 7*H*-3-Metilxantin egységekből összeállt tetrád szerkezet, kationok nélkül és kationokkal (kat⁺: Na⁺, K⁺, NH₄⁺).

A xantin, a 9-es helyzetben glikozilezett nukleozidjai, nukleotidjai és alkilezett származékai meghatározó szerepet játszanak számos enzim és enzimatikus rendszer intracelluláris anyagcsere folyamataiban, mint szubsztrátok illetve köztitermékek.⁷⁹ A xantin mindkét enzim, a xantin-oxidáz és a xantin-dehidrogenáz enzimek szubsztrátja, a húgysav képződésének köztiterméke illetve a purin nukleotidok metabolizmusának végterméke (1.4. fejezet). A 3-metilxantin, a metilxantin alkaloidok (koffein, teofillin, teobromin) metabolizmusának köztiterméke, amelyeket légúti betegségek, úgymint krónikus tüdőbetegség és asztma kezelésére is alkalmaznak.⁹⁶

A 3-szubsztituált xantinok magasabb rendű rendszerekbe való önszerveződésének lehetőségeit eddig még nem vizsgálták. Elméleti számítógépes vizsgálatokkal kezdve, majd kísérletileg megvalósítva, megvizsgáltuk a 3-szubsztituált xantinok- tetramer illetve oktamerképző sajátságait. Az elméleti számítások következtetéseit alapul véve, 3-metilxantint állítottunk elő,^{97,98} majd a magasabb rendű szerkezetek kialakulásának a vizsgálatára nano-ESI-MS tömegspektroszkópiás és oldatfázisú NMR módszereket használtunk.

3.2.2. Elméleti számítógépes vizsgálatok

A QUILD program^{99,100} keretein belül számítógépes molekulamodellezési és sűrűségfunkcionál-elmélet számításokat (DFT) végeztünk a 3-metilxantinra, a 3-szubsztituált xantinok családjának egyik legegyszerűbb képviselőjére. A kialakult, optimalizált tetramer és oktamer szerkezeteket kationokkal és kationok jelenléte nélkül a 39. ábra szemlélteti. A négy 3-metilxantin monomer egységből kialakuló tetrád szerkezetben a számított hidrogénkötési energia: -66,1 kcal/mol (1. táblázat).

kation	klaszter	$E_{k\"olcs\"onhatas}$	$E_{\text{bomlás}}$	$E_{k\"otes}$
Na^+	tetrád + ion	-100.30	3.69	-96.61
$\begin{tabular}{ c c c c c c } \hline kation & klaszter & E_{kölcsönhatá} \\ \hline & \\ \hline Na^+ & tetrád + ion & -100 \\ \hline & oktád + ion & -135 \\ \hline & \\ \hline K^+ & tetrád + ion & -73 \\ \hline & oktád + ion & -106 \\ \hline & \\ \hline NH_4^+ & tetrád + ion & -75 \\ \hline & oktád + ion & -103 \\ \hline & \\ \hline & \\ \hline kationok & négy monomer \\ \hline egység & -73 \\ \hline \end{array} \end{tabular}$	-135.78	10.56	-125.22	
V ⁺	tetrád + ion	-73.09	2.75	-70.34
K	oktád + ion	-106.27	4.56	-101.71
NILI ⁺	tetrád + ion	-75.58	3.75	-71.83
11114	oktád + ion	-103.20	4.39	-98.81
kationak	négy monomer egység	-73.62	7.52	-66.10
nélkül	tetrád ₁ + tetrád ₂	-51.84	4.80	-47.04

 táblázat. Kötési energiák (kcal/mol) a 3-metilxantin tetrád és oktád szerkezetekben, tapadó kölcsönhatási energiák a kialakuló tetrád és oktád szerkezetek között, ion-kötési energiák.



39. ábra. 3-Metilxantinból kialakuló optimalizált tetrád (bal oldal) és oktád (jobb oldal) szerkezetek, kationok nélkül
(a) illetve kationokkal (b: Na⁺, c: K⁺, d: NH₄⁺)

A kialakult tetrádok közül a központi fémion nélküli tetrád szerkezet is stabilnak bizonyult gázfázisban, valamint a különböző kationok hasonló hatást gyakoroltak a kialakult szerkezetekre, mint a guanin tetrádok esetében; nevezetesen a nátrium ionok igyekeztek a kialakult tetrád síkjában maradni, viszont a kálium és ammónium ionok a tetrád síkján kívül helyezkedtek el. Az eltérő ion rádiuszoknak köszönhetően a Na⁺ (1,02 Å) és K⁺ (1,38 Å) ionok esetében a kialakult szerkezetek érthetőek voltak illetve a hasonló, tetrád síkon kívüli optimumok a K⁺ és NH₄⁺ ionok esetében megmagyarázzák a gázfázisban felállítható kation kötésienergiasorrendet. A megállapítható stabilitási sorrend Na⁺ > NH₄⁺ \approx K⁺, valamint a 3-metilxantin tetrád (3MX)₄ szerkezet és a kationok közötti kötési energia: -96,6 (Na⁺), -71,8 (NH₄⁺) és -70,3 kcal/mol (K⁺).

Na⁺ ion jelenlétében kialakuló oktád szerkezet volt a leginkább sík alkatú szerkezet, valamint a központi fémionok nélküli szerkezet volt a leghajlottabb. Minden esetben az oktád szerkezetekben lévő (3MX)₄ komplex bizonyult a leginkább sík alkatúnak. Az oktád szerkezetet kialakító két réteg között közel középen helyezkedtek el a kationok, és minden aggregátum esetén a kialakuló két réteg közötti elfordulás szöge megközelítőleg 17°. A rétegek közötti említett távolság nagyon hasonló volt minden kialakuló komplex szerkezet esetében, így egyik fémion illetve az NH₄⁺ sem befolyásolja az optimális tapadó távolságot. A kialakult klaszterekben a 2. táblázatban feltüntetett "belső" hidrogénkötések (N1H…O6) szürke háttérrel vannak feltüntetve, valamint a "külső" hidrogénkötések (N7H…O2) a sötétszürke és a szaggatott vonallal jelölt rész között találhatóak. A kissé "meghajlott" szerkezetekben a kialakult "külső" hidrogénkötések egy sík alkatú szerkezetben kevésbé kellene lineáris orientációval rendelkezniük, ami a karbonil (C=O) és az N-H csoportok kötésszögeivel magyarázható.

A kation-kötési kölcsönhatások erőssége a kétrétegű oktamer szerkezetek és a tetrád szerkezetek esetében is azonosak voltak: $Na^+ > NH_4^+ \approx K^+$. Megjegyzendő azonban, hogy két (3MX)₄ egység között kialakuló tapadó kötési energia -47,0 kcal/mol, ami erősebb kölcsönhatásnak bizonyult, mint a megfelelő tapadó kötési energia a 9-metilguanin egységekből kialakuló oktamer klaszter szerkezet (9MG)₈ esetében (-35,4 kcal/mol). A tetrád és oktád szerkezetek esetében kapott elméleti eredmények késztettek a (3MX)₄ és (3MX)₈ szerkezetek kísérleti vizsgálatára a megfelelő kationok jelenlétében illetve kationok nélkül.

CH ₃	
$N = \frac{d_2}{N} = \frac{1}{2} $	
$d_1 + 1 N^1 = N^1 N^1 N^1 N^1 N^1 N^1 N^1 N^1 N^1 N^1$	
$H_3C = N$ $\begin{pmatrix} 6 \\ 2 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0$	
0 H $($ kat ⁺ $)$ H 0	
H α_3 N α_3 N α_3 N α_3 N α_4 N α_5 N $\alpha_$	Ha
	113
N N 2 0H-N7 N	
CH ₃	

	klaszterek	szir (tetrác	nmetria 1 rétegek)	d ₁ (d ₃)	α ₁ (α ₃)	d ₂ (d ₄)	$\begin{array}{c} \pmb{\alpha}_2 \ (\pmb{\alpha}_4) \end{array}$
	(3MX) ₄	C_4	-	1.73	170	1.74	175
ok	$(3MX)_4 + Na^+$	C_4	-	1.75	165	1.77	176
etrád	$(3MX)_4 + K^+$	C_4	-	1.79	168	1.75	173
te	(3MX) ₄ +NH ₄ ⁺	C ₂	-	1.76 (1.82)	170 (167)	1.75 (1.78)	172 (175)
	(3MX) ₈	C	(felső)	1.70	169	1.78	173
oktádok		C_4	(alsó)	1.70	171	1.77	174
	$(3MX)_8 + Na^+$	9	(felső)	1.70	164	1.75	178
		C_4	(alsó)	1.71	163	1.75	178
	(3MX) ₈ +K ⁺	G	(felső)	1.72	167	1.80	176
		C_4	(alsó)	1.72	167	1.81	176
	(3MX) ₈ +NH ₄ ⁺	_	(felső)	1.71 (1.74)	167 (168)	1.81 (1.81)	175 (176)
		C ₂	(alsó)	1.72 (1.71)	167 (169)	1.82 (1.81)	175 (175)

2. táblázat. A 3-metilxantin (3MX) klaszterekben a heteroatom és hidrogének közötti hidrogénkötések kötéstávolsága (Å) és kötésszöge

A "belső" hidrogénkötések (N1…O6) a szerkezetben szürke háttérrel vannak feltüntetve, a "külső" hidrogénkötések (N7H…O2) a szürke háttér és a szürke szaggatott vonal között helyezkednek el. Összhangban a C₂ szimmetriájú esettel (kat⁺ = NH₄⁺), a C₄-szimmetrikus klaszterekben (kat⁺ = Na⁺, K⁺, kation nékül) **d**₁ = **d**₃ (a "belső" hidrogénkötések megegyeznek, N1H…O6) és **d**₂ = **d**₄ (a "külső" hidrogénkötések azonosak, N7O…H). Az oktád szerkezeztekben a magasabb (felső) és alacsonyabb (*alsó*) fekvésű tetrád rétegek esetében, a kötéstávolságok és a kötésszögek némileg különböznek.

3.2.3. A 3-metilxantin előállítása



40. ábra. 3-metilxantin előállítása, reakciókörülmények: **a**. DMSO, benzil-bromid, 36% HCl, 24 óra, (70-99%), **b**. AcOH, NaNO₃, 55 °C, 12 óra, (50-90%), **c**. vízm. DMF, K_2CO_3 , CH_3I , 50 °C, (16%), [NaOH, H_2O , CH_3I , szobahőmérséklet, (32%)], **d**. AcOH, H-Cube[®]/autokláv, 75 bar, 90 °C, (46-90%)

A 3-metilxantin (**10**) szintézise guanozinból két lépésben a 7-benzilxantin előállításával indult Bridson módszere szerint.¹⁰¹ A szintézis első lépésében guanozin-hidrátból (**6**) kiindulva benzil-bromid felhasználásával előállítottam a 7-benzilguanin-hidrokloridot (**7**). A kiindulóanyag rossz oldhatósága miatt az alkilezési reakció dimetil-szulfoxidban történt 24 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd a szénhidrát rész sósavas hidrolízise után termékként kicsapódott a 7-benzilguanin-hidroklorid (**7**). Az így előállított hidrokloridot felhasználva a következő lépésben előállítottam a 7-benzilxantint (**8**). A hidroklorid rossz oldhatósága miatt a diazotálási reakció vizes-ecetsavban végeztem 50 °C-on nátrium-nitrit felhasználásával, majd visszahűtve és kevertetve a reakcióelegyet szobahőmérsékleten, egy éjszaka alatt kicsapódott a kívánt termék. Az így keletkezett terméket (**8**) foszfor-pentoxid és nátrium-hidroxid fölött tároltam, oldószernyomok eltávolítása érdekében. Az előállított 7-benzilxantin kiindulóanyagként szolgált az alkilezett származék (**9a**) előállításában.

A **8** vegyület alkilezésének optimalizálására több próbálkozás is történt. Az *A* módszer esetében az alkilezési reakció vízmentes dimetil-formamidban, kálium-karbonát segítségével hajtottam végre 50 °C-on 24 óra alatt, a *B* módszer esetében viszont az alkilezést vizes nátrium-hidroxid oldatban szobahőmérsékleten végeztem a megfelelő mennyiségű metil-jodid

hozzáadására. Mindkét módszer esetében megfigyelhető volt a bisz-alkilezett származék keletkezése (**9b**) (14-15% mindkét előállítási módszer esetében) amely megnehezítette a kívánt termék feldolgozását, illetve kromatográfiás elválasztását. Amint a 3. táblázatból is kiderül, a *B* előállítási módszer jobbnak bizonyult mind a kiindulóanyag konverzióját, mind pedig a kívánt termék (**9a**) keletkezését tekintve.

	9a (%)	9b (%)	El nem reagált kiindulási anyag (%)
A alkilezési módszer	16	15	69
B alkilezési módszer	31	15	54

3. táblázat. Az alkilezési reakciók termelései¹⁰²⁻¹⁰⁴

A 9a termék folyadékkromatográfiás elválasztásához a 20 v/v% EtOAc–DCM eluens rendszer bizonyult a legalkalmasabbnak, ugyanis ebben a rendszerben teljes mértékben elkülöníthető volt a 9a termék a 9b mellékterméktől. A xantin 7-N védelmére a megfelelő védőcsoport stratégia kialakítása igazi kihívást jelentett a szintézis során. A guanin származékoknál a 4-nitrobenzil illetve 4-p-metoxibenzil védőcsoportok eltávolítására sikerrel használt eljárás, a xantin esetében nem volt optimális. A benzil védőcsoport eltávolítása először egy H-Cube[®] folyamatos folyadékáramú hidrogénező készülék segítségével történt 90 °C-on és 100 bar H₂ nyomáson. Az H-Cube[®] készülék alkalmazásakor a kiindulóanyag konverziója közel 100% volt a kívánt termék keletkezése közben, viszont hátrányt jelentett a hidrogénező készülék kis kapacitása (max. redukálható kiindulóanyag 100 mg, 1 ml/perc áramlási sebesség), ezért az H-Cube[®] készülékben alkalmazotthoz hasonló reakciókörülmények reprodukálására kényszerültünk laboratóriumi körülmények között. Ilven, vagy ehhez hasonló reakciókörülményeket (90 °C, 75 bar H₂ atm., 24 óra) autokláv használatával sikerült biztosítani, amelynek köszönhetően a kiindulóanyag közel 100%-os konverziójával előállítottam a debenzilezett származékot (10). А debenzilezett származék nyers tisztítását oszlopkromatográfiás módszerrel végeztem 20 v/v% MeOH-DCM eluens rendszert felhasználva, majd a megtisztított terméket 90 °C-on vízből átkristályosítottam.

3.2.4. Tömegspektroszkópiás eredmények

A 3MX egységekből a magasabb rendű tetrád szerkezetek kialakulását kísérletileg először tömegspektroszkópiás eljárással, egy nano-ESI ionforrással ellátott Q-TOF tömegspektométer segítségével vizsgáltuk. Annak ellenére, hogy csak NH_4^+ ionokat tartalmazó vizes-metanolos rendszerben dolgoztunk az NH_4^+ -adduktumok detektálása céljából, a tömegspektrumban megjelenő legintezívebb csúcsszéria tartalmazott Na^+ és K^+ adduktumokat is, valószínüleg a használt boroszilikát kapilláris felületén bekövetkezett ioncsere miatt (41.ábra). Az így kapott eredmények tökéletesen megegyeznek az elméleti számolások eredményeivel, amelyek szerint a Na^+ ionok kötődtek a legerősebben a kialakult tetrád szerkezethez. Érdekes módon a csúcsintenzitások növekedését figyeltük meg a kialakult adduktumok [3MX+Na]⁺, [(3MX)₂+Na]⁺, [(3MX)₃+Na]⁺ és [(3MX)₄+Na]⁺ sorozatában, ellentétben a "hagyományos" esettel, amikor nincs tetrád képződés.



41. ábra. A 3-metilxantin (3MX) nano-ESI-Q-TOF tömegspektruma

Továbbá, a tömegspektrumban a $[(3MX)_4+Na]^+$ csúcs fölött egy magasabb tömegtartományban a következő legintenzívebb csúcssorozat, a $[(3MX)_8+kation]^+$ adduktumokhoz tartozik, ami a négy 3MX egységből kialakuló tetrád megnövekedett stabilitását tükrözi. Az 1012 és 1041 közötti *m/z* tartományban, nagyon kis intenzitású jelek (1-4%) figyelhetőek meg, amelyek a $[(3MX)_{12}+2Na]^+$, $[(3MX)_{12}+Na+K]^+$, $[(3MX)_6+NH_4]^+$ adduktumokhoz tartoznak. (lehetséges még a $[(3MX)_6+Na]^+$ és a $[(3MX)_6+K]^+$ klaszterek kialakulása is, 42. ábra).



42. ábra. A 3-metilxantin (3MX) nano-ESI-Q-TOF tömegspektruma, az 1012-1041 m/z értékek közötti nagyított tartomány

3.2.5. Multinukleáris NMR spektroszkópiás vizsgálatok

Teljes körű ¹H, ¹³C, ¹⁵N NMR-spektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk a 3-metilxantin (3MX) esetében, deuterált dimetil-szulfoxidban (~ 5 mg/500 µl, DMSO-d₆, 300 K) standard HMBC technika alkalmazásával. Az így kapott adatok alátámasztják a 3MX tautomer formáit, amelyet a 43. ábra szemléltet. A tömegspektroszkópiás vizsgálatok eredményeként kapott adatok megerősítéseként $(3MX)_n \times \text{kation}^+$ aggregátumok (n = 4, 8; kation⁺ = NH₄⁺, Na⁺, K⁺), néhány további NMR-spektroszkópiás vizsgálatra került sor. Diffúziós NMR-spektroszkópiás (DOSY) módszert alkalmaztunk¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ az oldatban keletkezett aggregátumok molekulatömegeinek az azonosítására, amelyhez referenciaként tetrametilszilánt használtunk, annak szférikus szerkezete és inertsége miatt. Deuterált dimetil-szulfoxid oldatban, 300 K-en dolgozva, a (3MX)4 aggregátumra jellemző 667 Da molekulatömeg helyett 920 Da molekulatömeget azonosítottunk. Az elméleti és gyakorlati (mért) értékek között különbség, valószínűleg a kialakult 3MX klaszterek és az alkalmazott oldószer aggregációjának tulajdoníthatóan. Abban az esetben, amikor 0,4 ekv. kálium-pikrátot adtunk a rendszerhez, a látszólagos molekulatömeg növekedését tapasztaltuk 1130 Da-ra. Tovább növelve a hozzáadott kálium-pikrát mennyiségét 1,04 ekv.-re, a molekulatömeg 1300 Da-ra emelkedett. Ezekkel ellentétben, megnövelve a hőmérsékletet 315 Kre, a molekulatömeg 710 Da-ra csökkent. Megemlítendő, hogy a diffúziós NMR-spektroszkópiás technika alkalmazásakor 10-15% hiba jelentkezhet, amelyet többszöri méréssel igazoltunk. Egyéb oldószerek (víz, dimetil-formamid, metanol, kloroform) alkalmazása esetén a 3MX oldhatósága minimálisra csökkent, továbbá nem tapasztaltunk asszociációra jellemző molekulatömegeket híg vizes-dimetilszulfoxid [($\varepsilon = 78,4$ (víz), $\varepsilon = 46,45$ (DMSO)] alkalmazása esetén sem. A kialakult intramolekuláris hidrogén kötések azonosítása céljából deuterálási izotópeltolódást mértünk az akceptor karbonil részeken, viszont a molekulán belül "versengő" intramolekuláris kötések miatt ez nem volt szignifikáns. Az NH protonok kémiai eltolódásának a hőmérsékletfüggését vizsgálva megállapítottuk, hogy a kapott értékek a hidrogénkötésekre jellemző értékektől nem különböztek lényegesen (N7H = -4,5 ppb/K, N1H = -6,1 ppb/K). További egydimenziós NOESY vizsgálatokat végezve jelentős mágnesezettség-transzfert észleltünk az N7H és a vízmolekulák között, ami viszont az N1H esetében elhanyagolható volt. Következtetésképpen azt feltételeztük, hogy a kialakuló (3MX)₄ szerkezetekben a "belső" hidrogénkötéseknek (N1H…O6) erősebbnek kell lenniük, mint a "külső" (N7H…O2) hidrogénkötéseknek. Ez a feltételezés összhangban van a gázfázisban elvégzett elméleti vizsgálatok eredményeivel, amelyek szerint a kialakuló "belső" hidrogénkötések minden esetben rövidebbek a "külső" hidrogénkötéseknél (2. táblázat).

Atom száma	Csoport	Becsült ¹³ C kémiai eltolódás (ppm)	¹³ C (kísérleti) (ppm)	¹ H (kísérleti) (ppm)	¹⁵ N (kísérleti) (ppm)	¹³ C deuterálási izotóp eltolódás (ppb)
2	С	151.2	151.05	-	-	-87
4	С	149.4	149.56	-	-	0
5	С	106.9	106.69	-	-	-150
6	С	154.7	154.05	-	-	-36
8	CH	140.5	140.42	8.008	-	0
12	CH_3	28.8	28.62	3.371	-	0
1	NH	-	-	11.074	153.35	-
7	NH	-	-	13.480	159.89	-
9	Ν	-	-	-	234.45	-
3	Ν	-	-	-	112.86	

3. táblázat. A 3MX NMR adatai. Oldószer: DMSO-d₆, T = 300 K, referencia: TMS = 0 ppm, 5 mg 3metilxantin 500 μ L DMSO-d₆ + kb. 5 ekv. H₂O.

Csatolások (Hz)	Hozzárendelés	
7.6	2 J _{H8,N7}	
12	2 J _{H8,N9}	
< 4	${}^{3}\mathbf{J}_{\mathrm{H1,N3}}$	
< 4	$^{2}J_{H3C,N3}$	
90.5	${}^{1}J_{1\mathrm{NH,N}}$	

4. táblázat. A 3MX ¹⁵N HMBC vizsgálatai során mért ¹⁵N-¹H csatolások

A homonukleáris NOE-nak¹⁰⁸ köszönhetően az elvégzett egydimenziós NOESY kísérletek során csak egy kisebb NOE kölcsönhatás figyelhető meg az N1H és N3CH₃ csoportok között, valamint egy nagyobb, intramolekuláris kölcsönhatás az N7H és a C8H atomok között. Stacionárius fázisú ¹³C {¹H} heteronukleáris NOE-t alkalmazva, 14% és 44%-os heteronukleáris NOE kölcsönhatást észleltünk a C6 és C2 atomok között, abban az esetben, ha az N1H telített volt, viszont ezek az atomok nem mutattak "aktivitást" az N7H és C-5 kölcsönhatásakor, ebben az esetben a két kötés heteronukleáris NOE interakciója 17%-kal növekedett. További ¹⁵N, ¹³C

HMBC módszerek alkalmazásával nem tapasztaltunk csatolásokat az intermolekuláris hidrogénkötések között.



43. ábra. A 3MX stacionárius fázisú ¹³C {¹H} heteronukleáris NOE spektruma, az N7H (A) és N1H atomok besugárzása (B)^{108,109}

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a DOSY NMR spektroszkópiás módszer segítségével igazolni lehetett a $(3MX)_4 \times kat^+$ és a lehetséges $(3MX)_8 \times kat^+$ (kat⁺ = K⁺, kation nélkül) klaszter szerkezeteket deuterált dimetil-szulfoxid felhasználásával, viszont nehéz volt egyértelműen bizonyítani a molekulán belül kialakuló hidrogénhíd-kölcsönhatásokat, a "gyenge" önszerveződött szerkezetek dinamikus természete miatt. Ahhoz, hogy növelni tudjuk a kölcsönhatásokat a 3-metilxantinból kialakuló önszerveződő tetrád/kvadruplex szerkezetekben, a xantin 3-as helyzetében lévő metil szubsztituens helyett más szubsztituensek jelenlétét is vizsgálnunk kell. Az említett vizsgálatok kivitelezése céljából, 3-szubsztituált xantin tartalmú DNS és PNS monomerek szintézisét terveztük (lásd 3.2.6., 3.2.7. fejezetek), majd az elkészült monomerek beépítését oligomerekbe, illetve ezek MS és NMR vizsgálatát magasabb rendű, önszerveződő rendszerek kialakulásának igazolása céljából.

3.2.6. A 3-szubsztituált xantin tartalmú DNS monomer és oligomerek szintézise

Előzetes molekulamodellezési számítások alapján, a xantin-heterociklust tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav (DNS) illetve peptidnukleinsav (PNS) oligomerek olyan extra hidrogénhíd kötéseket tartalmazhatnak, melyek erősíthetik a képződő PNS-DNS duplexek, illetve triplexek közötti kölcsönhatást. A feltételezett kölcsönhatások vizsgálatához olyan xantin tartalmú PNS és DNS monomer egységeket terveztünk, amelyek közvetlenül felhasználhatók DNS és PNS oligomerek szilárd-fázisú szintézisére. A xantintartalmú DNS előállítása esetében foszforamidit-stratégiához igazodtunk. A 3-metilxantin magasabb rendű szerkezetekben bizonyított tetramerilletve kvadruplexképző sajátságaiból kiindulva, 3-szubsztituált xantintartalmú DNS/PNS monomerek és oligomerek előállítását, majd az így kapott molekulák MS-és NMR-karakterizálását terveztük, az esetlegesen kialakuló magasabb rendű szerkezetek kialakulásának igazolására. A 3-szubsztituált-xantin tartalmú DNS monomer (19) előállítása 7benzilxantin (8) előállításával indult két lépésben Bridson módszere szerint.¹⁰¹



44. *ábra*. A 3-szubsztituált xantin tartalmú DNS monomer előállítása, reakiókörülmények: **a**. DMSO, benzil-bromid, 36% HCl, 24 óra, (70-99%), **b**. AcOH, H₂O, NaNO₃, 55 °C, 12 óra, (50-90%), **c**. 1. MeOH, 1% HCl/MeOH, Ag₂CO₃, 30 perc, 2. piridin, *p*-toluoil-klorid, 12 óra, AcOH, telített HCl/AcOH, HCl gáz, 30 perc, **d**. vízm. dioxán, 55% NaH, Ar atm., 45 °C, 2 óra, (26%), **e**. vízm. dioxán, autokláv, Pd(OH)₂, 100 bar, 90 °C, 24 óra, (98%), **f**. 40% MeNH₂/H₂O, MeOH, 45 °C, 12 óra, (94%), **g**. 4,4'-DMTr-Cl, TEA, piridin, 3 óra, (34%), **h**. 2-cianoetil-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetraizopropilfoszfordiamidit, vízm. DCM, 1*H*-tetrazol, Ar atm., 4 óra, (93%).

A glikozil-halogenid (14) előállítása 2-dezoxi-D-ribózból indult három lépésben. Az első lépésben 2-dezoxi-D-ribózból (11) kiindulva előállítottam a metil-glikozidot (12), amelyet kis mértékű stabilitása miatt azonnal felhasználtam a következő lépésben. A metil-glikozid előállítása sósavas metanolban szobahőmérsékleten 20 perc alatt lejátszódott, majd a feldolgozás után az instabil metil-glikozidot *p*-toluoil-kloriddal kezeltem piridinben 0 °C-on 24 órán keresztül, így eljutottam a toluoilezett metil-glikozidhoz (13). A következő lépésben a toluoilezett metil-glikozid felhasználásával előállítottam az instabil glikozil-halogenidet (14). A reakció szobahőmérsékleten 30 perc alatt lejátszódott sósavas ecetsavban, *in situ* előállított sósavgáz reakcióelegybe való bevezetésének hatására 10 perc után kicsapódott a kívánt glikozil-klorid (14). Az így előállított glikozil-kloridot 24 órán keresztül exszikkátorban szárítottam, majd levegőn való bomlékonysága miatt 24 óra után maradéktalanul felhasználtam a következő lépéshez, megelőzve ezzel a levegő nedvességtartalmára rövid időn belül megjelenő bomlástermékekek kialakulását.

A glikozil-klorid (14) és a 7-benzilxantin (8) kapcsolási reakciójának optimalizálására több kísérlet is történt. A kapcsolási reakció megvalósításánál minden esetben gondot okozott a megfelelő oldószer kiválasztása, figyelembe véve a kiindulóanyagok rossz oldékonyságát. A kapcsolási reakciót vízmentes dioxánban végeztem 55%-os nátrium-hidrid felhasználásával argon atmoszférában dolgozva. A reakció fokozott figyelmet igényelt a kiinduló anyagok tisztaságára illetve vízmentességére nézve, ezért a glikozil-klorid előállítása minden esetben a kapcsolási reakció előtt max. 24 órával történt, elkerülve ezzel a bomlástermékek megjelenését. A 7-benzilxantin (8) felhasználásánal figyelembe kellett venni, hogy a maradék ecetsav- illetve víznyomok a kapcsolási reakció folyamán nem kívánt melléktermékek kialakulásását eredményezhetik, mérsékelve ezzel a kívánt termék kialakulását. Az optimális reakciókörülmények biztosítása esetén a kapcsolási reakció 45 °C-on 2 óra alatt lejátszódik, majd a megfelelő feldolgozást követően a nyers terméket oszlopkromatográfiás módszer segítségével tisztítottam 20 v/v% EtOAc-DCM felhasználásával.

A kapcsolási reakcióban előállított termékből (15) való benzil védőcsoport eltávolítás több téren is igazi kihívást jelentett számunkra a megfelelő reakciókörülmények biztosítása szempontjából. A debenzilezési reakció optimális körülményeinek a megválasztásánál figyelembe kellett venni a keletkező termék rossz oldékonyságát illetve a magas nyomás és hőmérsékleti tényezőket. Számos kísérlet történt a redukció optimalizásására, változtatva az

alkalmazott oldószert, a katalizátort, a nyomást illetve hőmérsékletet, majd ezeket alapul véve a debenzilezési reakció vízmentes dioxánban, palládium-hidroxid (Pd(OH)₂/C, 20 % Pd) katalizátor valamint egy 100 ml–es autokláv felhasználásával valósult meg. A (**9a**) vegyület debenzilezésénél alkalmazott reakciókörülmények biztosítása (hőmérséklet, nyomás, katalizátor) lehetővé tette a kiindulóanyag (**15**) közel 100%-os konverzióját, a kívánt termék (**16**) keletkezése közben, majd a megfelelő feldolgozás után a nyers terméket oszlopkromatoráfiás módszer segítségével tisztítottam 30 v/v% EtOAc–DCM eluens rendszer alkalmazásával. A debenzilezési reakció során, a korábban feltüntetett reakciókörülmények között, a benzil csoport redukciója mellett, a cukorrészen lévő *p*-toluoil védőcsoportok aromás gyűrűi is részben telítődtek. A feltételezett telített melléktermék keletkezését a (**16**) vegyület MS-MS tömegspektrumából sikerült azonosítani.

A megtisztított debenzilezett termék (**16**) kiindulóanyagként szolgált a detoluoilezési reakcióban, amelyet metanolban, 40%-os víz/metilamin segítségével végeztem 35 °C–on 24 órán keresztül. A reakcióidő lejárta után vékonyréteg alapján megbizonyosodtam a kiindulóanyag közel 100%-os konverziójáról illetve a kívánt termék (**17**) keletkezéséről. A keletkezett nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam 10 v/v% MeOH–DCM eluens rendszer felhasználásával.

A tisztított termék (17) tritilezési reakciója 4,4'-dimetoxitritil-klorid felhasználásával piridinben valósult meg, trietil-amin hozzáadásával. A tritilezési reakcióhoz minden esetben frissen előállított 4,4'-dimetoxitritil-kloridot használtam, elkerülve ezzel a bomlástermékekből kialakuló nem kívánt melléktermékek megjelenését. A reakció 3 óra alatt szobahőmérsékleten teljesen lejátszódik. Mivel a tritilezési reakció során minden esetben feleslegben használtuk a 4,4'-dimetoxitritil-kloridot, illetve a kiindulóanyag (17) 7-es nitrogénje a debenzilezési reakció után szabaddá vált, ezért a keletkező termék szerkezete nem volt teljesen egyértelmű. Az alkalmazott szerkezetvizsgálatok alapján (MS, NMR) megállapítható volt, hogy a keletkezett termék bisz-tritilezett származék, a cukorrész 5'-hidroxilcsoportjára illetve a xantin 7- es nitrogénjére 4,4'-dimetoxitritil védőcsoport került. A xantin reaktív 7- es nitrogénjén levő 4,4'-dimetoxitritil csoport a 3-szubsztituált xantin tartalmú oligomerek szintézise során védőcsoportként szolgált, elkerülve ezzel az oligomer szintézis során keletkező melléktermékek kialakulását. A bisz-tritilezett (18) nyers terméket, a megfelelő feldolgozást követően gyors oszlopkromatográfiás módszer segítségével tisztítottam, trietil-amin tartalmú eluens rendszer

felhasználásával, ezzel is megakadályozva a savas szilikagélen történő 4,4'-dimetoxitritil csoport hidrolízisét, majd a tisztított bisz-tritilezett terméket argon atmoszféra alatt tároltam.

A bisztritilezett származék (18) foszfitilezési reakcióját az általánosan alkalmazott 2cianoetil-(*N*,*N*-diizopropilamino)-foszfokloridit reagens helyett 2-cianoetil-*N*,*N*,*N'*,*N'*tetraizopropilfoszfordiamidit reagens felhasználásával hajtottam végre, amely végül elvezetett a védett foszforamidit monomer (19) keletkezéséhez. A foszfitilezési reakciót minden esetben frissen desztillált vízmentes diklór-metánban végeztem, 1*H*-tetrazolt felhasználva aktivátorként, argon atmoszféra alatt. A foszfitilezési reakció szobahőmérsékleten 2 óra alatt lejátszódott. A keletkezett nyersterméket feldolgozás nélkül gyors oszlopkromatográfiás módszer segítségével tisztítottam kevés dezaktivált szilikagélen 30 perc alatt, elkerülve ezzel a nemkívánt bomlástermékek kialakulását. Az így megtisztított 3-szubsztituált xantin tartalmú DNS monomert (19) a folyadékkromatográfiás tisztítás után vízmentes acetonitril illetve dietil-éter segítségével szárítottam, majd argon atmoszféra alatt -20 °C-on tároltam.

3-Szubsztituált xantintartalmú DNS oligomerek szintézise

Szilárd fázisú szintézist alkalmazva TX_4T illetve T_3XT_2 szekvenciájú model DNS oligomereket állítottam elő foszforamidit módszer segítségével, egy Expedite 8909 típusú szintetizátor felhasználásával (X = 3-(2'-dezoxi- β -D-ribofuranozil)xantin monomer egység). A gyantáról való hasítás után a nyers DNS oligomerek tisztítását Shimadzu típusú HPLC, LiChrosper RP Select B oszlopot felhasználva C18 töltet segítségével végeztem. A tisztított TX₄T illetve T_3XT_2 oligomerek tritil-védettek voltak, amelyeket nano-ESI-Q-TOF tömegspektrometriás technikával vizsgáltunk Micromass MALDI Q-TOF Premier tömegspektrométer segítségével. Az előállított oligomerek magasabb rendű szerkezetekbe való önszerveződésének további MS és NMR vizsgálatai jelenleg folyamatban vannak.



3.2.7. A 3-szubsztituált xantin/timintartalmú PNS monomerek és oligomerek szintézise

45. *ábra*. A 3-szubsztituált xantin/timin tartalmú PNS monomer előállítása, reakciókörülmények: **a**. DMSO, benzilbromid, 36% HCl, 24 óra, (70-99%), **b**. AcOH, H₂O, NaNO₂, 55 °C, 12 óra, (50-90%), **c**. vízm. DMF, K₂CO₃, etilbrómacetát, 45 °C, 12 óra, (34%), **d**. 5% HCl, THF, 60-80 °C, 24 óra, (95%), **e**, **f**. vízm. DMF, K₂CO₃, etilbrómacetát, szobahőmérséklet, 4 óra, 2 M NaOH, 90 °C, 20 perc, 4 M HCl, szobahőmérséklet, 30 perc, (70%), **g**. DCM, *terc*-butil-brómacetát, 0 °C, 24 óra (66%), **h**. DCM, DIPEA, Fmoc-OSu, szobahőmérséklet, 12 óra (88%), **i**. vízm. DMF, DCM, DIPEA, HOBT, HBTU, szobahőmérséklet, 48 óra, (41%), **j**. DCM, TFA, H₂O, szobahőmérséklet, 6 óra, (51%).

A 3-szubsztituált xantintartalmú PNS monomer (**26**) előállítása 7-benzilxantin (**8**) előállításával indult két lépésben Bridson módszere szerint.¹⁰¹ A 7-benzilxantin (**8**) alkilezési reakciójának optimalizálására több kísérlet is történt. A kiindulóanyag rossz oldhatósága miatt az alkilezési reakció minden esetben vízmentes dimetil-formamidban, kálium-karbonát illetve etilbrómacetát alkilező ágens felhasználásával történt. A reakció 45 °C-on 24 óra alatt lejátszódott, de minden esetben megfigyelhető volt elhanyagolható mennyiségű bisz-alkilezett melléktermék keletkezése, ami a nyerstermék oszlopkromatográfiás tisztításását megnehezítette. A keletkezett nyersterméket, a megfelelő feldolgozást követően oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottam max. 30v/v % EtOAc–DCM eluens rendszer felhasználásával. A nyerstermék tisztítására az említett eluens rendszer bizonyult a legoptimálisabbnak a 3-mono- (**20a**) illetve a 3,7-bisz-alkilezett (**20b**) származék kromatográfiás elválasztása esetén. A továbbiakban a (**20a**) mono-alkilezett termék hidrolízisét végeztem el, a 7benzilxantin-3-il-ecetsav (**21**) előállítása céljából. A hidrolízist minden esetben tetrahidrofuránban végeztem 5 m/m %-os vizes sósav oldat felhasználásával, 85 °C-on 24 órán keresztül. A vizes sósav oldat hozzáadására a kiindulóanyag kicsapódott az oldatból, de a megfelelő reakcióhőmérséklet elérésekor újra beoldódott, és közel 100%-os konverzióval a kívánt főtermék (**21**) keletkezését eredményezte. A keletkezett termék a reakcióelegy szobahőmérsékletre való visszahűtésekor kicsapódott, amely megkönnyítette a termék feldolgozását. A kiszűrt termék esetében a közel 100%-os átalakulás miatt nem volt szükség oszlopkromatográfiás tisztításra, ezért ebben az esetben a (**21**) terméket átkristályosítottam (*n*hexán).

A PNS váz előállítása etilén-diaminból (22) kiindulva két lépésben történt. A szintézis első lépésében az etilén-diamin aminocsoportját *terc*-butil-brómacetáttal reagáltattam vízmentes diklór-metán felhasználásával. A reakció 0 °C-on 5 óra alatt, majd szobahőmérsékletre melegítve 12 óra alatt lejátszódott, a megfelelő feldolgozás után az így kapott nyersterméket (23) egyből felhasználtam a következő reakciólépéshez.

Az előállított *terc*-butil-észter (23) szabadon maradt primer aminocsoportját 9fluorenilmetil-szukcinimidil-karbonáttal kezeltem vízmentes diklór-metánban, N,N-diizopropiletilamin jelenlétében 12 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd a kívánt termék (24) a megfelelő feldolgozást követően -20 °C-on való tárolás közben 12 óra alatt kikristályosodott. Az így előállított kristályos PNS váz (24) a további szintézisek során a 3-szubsztituált xantin tartalmú PNS monomer alapvázát képezte.

A monomerszintézis utolsó két lépésében az előállított PNS váz (24) és a 7-benzilxantin-3-il-ecetsav (21) kapcsolási reakciója a védett (Fmoc, benzil, terc-butil) xantin tartalmú PNS monomert (25) eredményezte. A reakció minden esetben vízmentes dimetil-formamid és vízmentes diklór-metán elegyében játszódott le a megfelelő kapcsolószerek (HOBt, HBTU, DCC) jelenlétében. A kapcsolási reakció 48 óra alatt szobahőmérsékleten a kívánt termék (25) keletkezését eredményezte. А megfelelő feldolgozást követően a nyersterméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottam 20v/v%EtOAc-hexán eluens rendszer felhasználásával.

A monomerszintézis utolsó lépésében a (25) védett xantintartalmú PNS monomerből, terc-butil-csoport hidrolízist kővetően előállítottam a (26) xantintartalmú PNS monomert (benzil-, Fmoc-védett). A szintézist diklór-metánban szobahőmérsékleten hajtottam végre a megfelelő mennyiségű trifluor-ecetsav és víz hozzáadására. A *terc*-butil-csoport hidrolízise minden esetben 6 óra alatt játszódott le közel 100%-os konverzióval, a kívánt termék (**26**) keletkezése közben, amelyet oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottam 20v/v% 2-propanolhexán eluens rendszer felhasználásával.

A timin tartalmú PNS monomer (**31**) szintézise timinből (**27**) kiindulva két lépésben történt. Az első lépésben a timin alkilezésére került sor etil-brómacetát illetve kálium-karbonát felhasználásával, majd ezt követően az előállított észter (**28**) hidrolízise történt meg a timin-1-il-ecetsav (**29**) előállítása céljából. Az így előállított timin-1-il-ecetsav kristályos, ezért ebben az esetben nem volt szükség további tisztításra.

A timin tartalmú PNS monomer szintézis utolsó két lépésében az előállított PNS váz (24) és a timin-1-il-ecetsav (29) kapcsolási reakciója a védett (Fmoc, *terc*-butil) timin tartalmú PNS monomert (30) eredményezte. A reakció vízmentes dimetil-formamid és vízmentes diklór-metán elegyében játszódott le a megfelelő kapcsolószerek (HOBt, HBTU, DCC) jelenlétében. A reakció 48 óra alatt szobahőmérsékleten a kívánt termék (30) keletkezését eredményezte. A megfelelő feldolgozást követően a nyers terméket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottam 2v/v% MeOH-DCM eluensrendszer felhasználásával.

A timin tartalmú PNS monomer szintézis utolsó lépésében a védett timin tartalmú PNS monomerből (**30**), *terc*-butil-csoport hidrolízist követően előállítottam a (**31**) timin tartalmú PNS monomert (Fmoc-védett). A szintézist diklór-metánban szobahőmérsékleten végeztem a megfelelő mennyiségű trifluor-ecetsav és víz hozzáadására. A *terc*-butil-csoport hidrolízise 6 óra alatt játszódott le közel 100%-os konverzióval a kívánt termék (**31**) keletkezése közben, amelyet oszlopkromatográfia segítségével tisztítottam, 10 v/v% MeOH-DCM eluens rendszer felhasználásával.

Peptid-nukleinsav (PNS) oligomerek szintézise



46. ábra. Peptid-nukleinsav (PNS) oligomerek szintézise

Napjainkban számos összefoglalót találhatunk PNS oligomer szintézis a reakciókörülményeinek optimalizálására, de túl sok tényező befolyásolhatja a szintézis megfelelő kivitelezését (a szilárd hordozó természete, a monomer illetve a monomer esetleges védőcsoportjai, megfelelő mennyiségek, kapcsolószerek stb.) ahhoz, hogy egyszerűen összefoglaljuk a PNS-oligomerszintézis optimális reakciókörülményeit.¹¹⁰ A közelmúltban közzétett PNS oligomer szekvenciák nem tartalmaznak guanin nukleobázist vagy csak néhány közülük, ami azt érzékelteti, hogy az ilyen jellegű monomerek szintézise igen nehézkes, illetve a guanin nukleobázis jelenléte az oligomerekben nagy mértékben csökkenti ezek oldhatóságát. A PNS oligomerek előálítására minden esetben az általános peptidszintéziseknél alkalmazott szilárd fázisú peptidszintézist használtuk. Ez az általános módszer lehetővé teszi mind az Fmocmind pedig a Boc-kémia alkalmazását a megfelelő gyanta kiválasztásával. A mi esetünkben Fmoc-stratégiát használtunk, mivel a meglévő xantin-PNS (x) iletve t-PNS (t) monomerek Fmoc-védőcsoporttal voltak ellátva. A megfelelő gyanta kiválasztásánál figyelembe kellett venni a PNS oligomer építőköveinek meglévő védőcsoportjait illetve oldallánc védőcsoportjait, a monomerek oldhatóságát, a gyanta megfelelő duzzadását az alkalmazott oldószerben, illetve a kapcsolószerek természetét. Az Fmoc-védett PNS oligomer építőköveinek kapcsolásánál kapcsolószerek közül а HOBT/DCC illetve HATU/DIPEA/lutidin alkalmazott kapcsoló/aktiválószerek bizonyultak optimálisnak. A szilárd fázisú szintézis segítségével előállított 3-szubsztituált xantintartalmú tx₄t modell PNS oligomer szintézisénel (x = 3-xantinil PNS monomer) az Fmoc-kémiában alkalmazott általános védőcsoport hasítási, aktiválási illetve kapcsolási körülményeket alkalmaztam. А nemkívánt melléktermékek megjelenését megakadályozva minden építőelem kapcsolásánál ecetsavanhidrides "lefedést" alkalmaztam, amivel elkerülhető volt egy nemkívánt szekvencia kialakulása. A gyantáról való hasítás után a nyers PNS oligomer tisztítását Shimadzu típusú HPLC, LiChrosper RP Select B oszlopot felhasználva C18 töltet segítségével végeztem. A tisztított tx4t-oligomert nano-ESI-Q-TOF tömegspektrometriás technikával vizsgáltuk Micromass MALDI Q-TOF Premier tömegspektrométer segítségével. Az így előállított PNS oligomerek 4-metoxibenzil illetve 4nitrobenzil védőcsoporttal voltak ellátva, valamint az elkészült oligomerekkel elvégzett analitikai vizsgálatok az említett védőcsoportok jelenlétében történtek. A xantin 7N-en lévő 4metoxibenzil és 4-nitrobenzil védőcsoportok eltávolítására tett kísérletek mind monomer mind pedig oligomer szinten, korábban kudarcba fulladtak. A benzil védőcsoporttal ellátott 3szubsztituált xantin tartalmú PNS oligomerek szilárd fázisú szintézise, benzil védőcsoport eltávolítása, majd az elkészült védetlen PNS oligomerek MS és NMR vizsgálatai magasabb rendű szerkezetek kialakulásának igazolása céljából jelenleg folyamatban vannak.

4. Kísérleti rész

4.1. Általános kísérleti rész

Az NMR spektrumok felvétele Bruker DRX 400 és DRX 500 készülékkel történt (¹H: 400,13 MHz, 500,13 MHz, ¹³C: 100,61 MHz, 126 MHz, ³¹P: 202 MHz). A mérésekhez használt deuterált oldószerek a következőek voltak: dimetil-szulfoxid: DMSO-d₆, acetonitril: CD₃CN, kloroform: CDCl₃. A spektrumok leírásánál felhasznált rövidítések: * : felcserélhető atomok; d: dublett; s: szingulett; br. s: széles szingulett; dd: dupla dublett; ddd: dupla dublett; t: triplett; pt: pszeudo triplett és m: multiplett. Az NMR spektrumok kiértékeléséhez ACDLabs NMR Manager 6.0 – 12.0 szofvereket használtam.

A rutin tömegspektrumok Finnigan TSQ 7000, a nagy felbontású mérések Waters Premier Q-TOF készülékkel készültek ESI (elektrospray ionizációs) technikával. A reakciótermékek elválasztása és tisztítása Merck Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm) típusú álló fázissal töltött oszlopon, valamint Personal OPLC 50TM (túlnyomásos rétegkromatográfia) segítségével történtek.

A reakciók lefutását vékonyréteg-kromatográfiával követtem. [Kieselgel 60, 0,2 mm, (MERCK),]. A kromatogramok előhívására H₂SO₄/EtOH (20 v/v%) és ninhidrin/etanol (5 m/v%) reagenseket használtam. A szenesedő jeleket 0,5 perces 200–300 °C-on történő melegítéssel hívtam elő.

Az R_f értékek megállapítása 254 - 365 nm hullámhosszúságú UV-fényben észlelt foltok alapján történt. A vékonyréteg lapok kifejlesztéséhez a következő oldószerelegyeket használtuk: diklórmetán; etil-acetát/diklórmetán; metanol/diklórmetán; etil-acetát/hexán; 2-propanol/toluol; n-hexán/etil-acetát/diklór-metán/trietil-amin; butanol/ecetsav/víz és acetonitril/metanol/víz.

4.2. Anyagok és módszerek

4.2.1. A 3-metilxantin előállítása

7-Benzilguanin hidroklorid (7)



Egy 1 L-es gömblombikba guanozin-hidrátot (6) (20,00 g, 70,61 mmol) mértem majd vízmentes dimetil-szulfoxidban (120 ml) szuszpendáltam és 10 percen keresztül ultrahangoztam. Amikor beoldódott, benzil-bromidot (21,12 ml, 30,00 g, 176,52 mmol, 2,5 ekv.) csepegtettem hozzá erőteljes kevertetés mellett. Az így kapott reakcióelegyet 24 órán keresztül szobahőmérsékleten mágneses keverő segítségével kevertettem. A reakció előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiás (VRK) módszerrel követtem, a reakcióidő lejárta után tömény sósavat (50 ml) csepegtettem az elegyhez. 30 perc elteltével lassú csapadékkiválás volt észlelhető, majd 12 óra szobahőmérsékleten való kevertetés után kivált a sárgás-fehér színű termék (7). Az így kapott reakcióelegyet hideg metanolra (500 ml) öntöttem, majd 60-120 percre mélyhűtőbe helyeztem. A kivált fehér színű csapadékot kiszűrtem, majd jéghideg metanollal mostam, és exszikkátorban szárítottam (P_2O_5): (19,16 g, 99%). Az analitikai vizsgálatok során kapott adatok (MS, NMR) teljes mértékben megegyeztek az irodalomba foglaltakkal.¹⁰¹

7-Benzilxantin (8)



Egy 1 L-es lombikba 7-benzilguanin hidrokloridot (**7**) (20,00 g, 72,18 mmol) mértem majd 96%-os ecetsav (404 ml) és víz (44 ml) elegyében fűthető mágneses keverő segítségével 120 °C-ra melegítettem és 1 órán keresztül erőteljesen kevertettem. A reakcióelegyet visszahűtöttem 50 °C-ra majd erőteljes kevertetés mellett lassan hozzácsepegtettem a nátriumnitrit (18,05 g, 261,59 mmol, 3,6 ekv. 44 ml vízben oldva) vizes oldatát. A reakció nagyon heves, barna nitrózus gőzők keletkezése figyelhető meg. Kis idő elteltével (1-2 óra) csapadékkiválás indult meg, majd 12 óra szobahőmérsékleten való kevertetés után teljesen kivált a termék. Az így kapott terméket kiszűrtem, jeges vízzel mostam (100 ml), majd exszikkátorban szárítottam (P₂O₅, KOH/NaOH). Az így keletkezett termék 13,96 g (80%). Az analitikai vizsgálatok során kapott adatok (MS, NMR) teljes mértékben megegyeztek az irodalomba foglaltakkal.¹⁰¹

3-Metil-7-benzilxantin (9a)



(A.) Módszer

Egy 250 ml-es lombikba 7-benzilxantint (**8**) (0,90 g, 3,71 mmol) és kálium-karbonátot (0,61 g, 4,46 mmol, 1,2 ekv.) mértem, majd vízmentes dimetil-formamidban (20 ml) ultrahangoztam az oldatot. A kapott heterogén reakcióelegyet 1 órán keresztül 45-50 °C-on fűthető mágneses keverő segítségével erőteljesen kevertettem. Ezek után metil-jodidot (0,23 ml, 0,52 g, 3,71 mmol, 1 ekv.) vízmentes dimetil-formamidban (20 ml) heves kevertetés mellett lassan hozzácsepegtettem az oldathoz, majd ezt követően a reakcióelegyet 24 órán keresztül 45-50 °C-on kevertettem. A reakció előrehaladását VRK módszer segítségével ellenőriztem: (hexán:EtOAc:MeOH-50:40:10). A reakció során egy nem kívánt melléktermék, az 1,3-dimetil származék (**9b**) keletkezése volt megfigyelhető, melyet oszlopkromatográfiás módszerrel sikerült elválasztani a terméktől. A reakcióidő lejárta után az oldatot bepároltam, majd etanollal illetve acetonitrillel párolva a maradék dimetil-formamidtól is megszabadultam. A bepárlási maradékot
vízben (500 ml) oldottam, majd etil-acetáttal (5×100 ml) extraháltam. A kapott szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, majd szárazra pároltam vákuumbepárló segítségével. A nyersterméket oszlopkromatográfiás módszer segítségével tisztítottam, 5-20 v/v% EtOAc-CH₂Cl₂ eluens rendszer felhasználásával. A megtisztított termék (**9a**) (155 mg, 16%) illetve melléktermék (**9b**) (150 mg, 14 %). A tisztítás során elért termeléseket alapul véve, megállapítható volt, hogy a kiindulásianyag (**8**) nagy része elreagálatlanul maradt (0,62 g, 2,55 mmol, 68%).

3-metil-7-benzilxantin (9a): Olvadáspont.: 274.2-277.2 °C (irodalom: 272-275 °C). ESI-MS (m/z): 256.65 (100, $[M+H]^+$). A ¹H NMR értékek teljes mértékben megegyeztek az irodalomban ismerttel.¹⁰⁴

1,3-dimetil-7-benzilxantin (9b): Olvadáspont: 158.2-159.2 °C (irodalom: 158.6-159.4 °C). ESI-MS (m/z): 270.66 (100, $[M+H]^+$). A ¹H és ¹³C NMR adatok teljes mértékben megegyeztek az irodalomban ismerttel.^{102,103}

(**B**.) Módszer

7-Benzilxantint (**8**) (0,90 g, 3,71 mmol) feloldottam vízben (12 ml) és nátrium-hidroxid oldatban (1 M, 4,50 ml, 1,2 ekv.) ultrahang illetve melegítés segítégével (20 perc, 50 °C). A kapott heterogén elegyet egy peptid-rázóedénybe (100 ml) töltöttem és metil-jodidot (0,23 ml, 0,53 g, 3,71 mmol, 1 ekv.) csepegtettem hozzá, majd a reakcióelegyet 2 órán keresztül intenzíven rázogattam egy peptid-rázópad segítségével. A reakció előrehaladását VRK módszer segítségével követtem. Az (*A*.) módszerben leírtakhoz hasonlóan ebben az esetben is megjelent az 1,3-dimetil származék, melyet kromatográfiás úton választottam el a terméktől. A reakcióidő lejárta után az elegyet vízzel higítottam (500 ml), majd etil-acetáttal (5×100 ml) extraháltam. A szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, majd szárazra pároltam. A nyerstermék tisztítása oszlopkromatográfiás módszer segítségével történt, 5-20 v/v% EtOAc-CH₂Cl₂ eluensrendszert felhasználva. A tisztított termék (**9a**) (0,30 g, 31%), melléktermék (**9b**) (0,15 g, 14 %) illetve elreagálatlan kiindulóanyag (**8**) (0,48 g, 1,99 mmol, 53%). Az analitikai vizsgálatok adatai (¹H, ¹³C NMR, MS) megegyeztek az *A* módszer esetén kapott értékekkel.

3-Metilxantin (10)^{97,98}



(A.) Módszer

3-Metil-7-benzilxantint (**9a**) (0,50 g, 1,95 mmol) feloldottam 1,4-dioxánban (50 ml) vagy ecetsavban (50 ml), majd Pd(OH)₂ katalizátort (0,96 g, Pearlman- katalizátor) mértem hozzá, és a reakcióelegyet átmostam egy mágneses keverővel ellátott autoklávba (100 ml). Az autoklávot feltöltöttem hidrogénnel (75-100 bar) majd egy fűthető mágneses keverő segítségével a reakcióelegyet 24 órán keresztül 90 °C-on kevertettem. A 24 óra elteltével a reakcióelegyet leszűrtem, majd a szűrletet szárazra pároltam acetonitrillel való bepárlás segítségével. VRK módszer segítségével megállapítottam (hexán:EtOAc:MeOH-50:40:10), hogy a kiindulóanyag teljes mértékben elreagált a várt termék keletkezését eredményezve. A nyers terméket oszlopkromatográfiás módszer segítségével megtisztítottam (20 v/v% MeOH-CH₂Cl₂). A keletkezett, megtisztított terméket (**10**) (150 mg, 46%) forró vízből átkristályosítottam. Olvadáspont >300 °C. ESI-MS (m/z): 167 ([M+H]⁺), ¹H, ¹³C és ¹⁵N NMR adatok, lásd 3.2.5. fejezet (3, 4. táblázatok).

(B.) Módszer

3-Metil-7-benzilxantint (9a) (25 mg) feloldottam 15 v/v% ecetsav-etil-acetát (25 ml) elegyében. A redukcióhoz használt H-Cube® reaktor (ThalesNano, Budapest, Hungary, http://www.thalesnano.com/products/h-cube) katalizátor oszlopa Pearlman-katalizátorral lett megtöltve (Pd(OH)₂/C, 20 % Pd, Alfa Aesar kat. sz. 042578, 20 mg). A katalizátort 15 percig H₂ atmoszférában (100 bar) előaktiváltam. A debenzilezési reakció folyamatos folyadékáramban történt, 90 °C-on, 100 bar H₂ nyomáson, 1 ml/perc áramlási sebesség mellett 25 percen keresztül. Α reakcióidő lejártával, VRK módszer segítségével megállapítottam (eluens: hexán:EtOAc:MeOH-50:40:10), hogy a kiindulóanyag teljes egészében elreagált, a kívánt főtermék keletkezését eredményezve. Az H-Cube® folyamatos folyadékáramú hidrogénező reaktorban használt katalizátor több alkalommal felhasználható. A keletkezett nyersterméket (20-25 mg) OPLC segítségével megtisztítottam (eluens: 20 v/v% MeOH-CH₂Cl₂) majd az így kapott tiszta terméket (**10**) forró vízből átkristályosítottam (14,58 mg, 90%). Az analitikai vizsgálatok adatai (¹H, ¹³C NMR, MS) teljes mértékben megegyeztek az A módszer esetén kapott adatokkal.

4.2.2. A 3-szubsztituált xantin tartalmú DNS monomer előállítása

Metil-2-dezoxi-D-ribofuranozid (12)¹¹¹



Egy 1 L-es gömblombikba 2-dezoxi-D-ribózt (**11**) (13,60 g 101,44 mmol) mértem, majd metanolban (243 ml) feloldottam. Ezek után 1% HCl/MeOH-t (27 ml) csepegtettem hozzá, majd 20 percen keresztül szobahőmérsékleten erőteljesen kevertettem mágneses keverő segítségével. A reakcióidő lejárta után ezüst-karbonátot (5,00 g, 29,78 mmol) mértem az elegyhez és további 5 percen keresztül erőteljesen kevertettem. Az így kapott oldatot leszűrtem, majd szárazra bepároltam acetonitril segítségével. A reakció előremenetelét VRK módszer segítségével ellenőríztem. A bepárlási maradékot (15,03 g) amely egy sárga olajszerű folyadék (**12**), azonnal felhasználtam a következő lépéshez.

Metil-2-dezoxi-3,5-di-O-(p-toluoil)-D-ribofuranozid (13)¹¹¹



Az előző lépésből kapott sárgás olajszerszerű metil-glikozidot (**12**) (15,03 g) feloldottam piridinbe (80 ml), majd jeges hűtést alkalmazva 0 °C-ra hűtöttem az elegyet. Ezután a lehűtott elegyhez lassan hozzácsepegtettem *p*-toluoil-kloridot (29,00 ml, 34,00 g, 199,30 mmol, 2 ekv.),

majd 1 órán keresztül 0 °C-on tartva az elegyet, erőteljesen kevertettem. A reakcióelegyet fokozatosan melegítettem fel szobahőmérsékletre, majd további 12 órán keresztül kevertettem. A reakcióidő lejárta után az elegyet jégre (300 ml) öntöttem, majd dietil-éterrel (3×100 ml) extraháltam. Az éteres fázist vízzel (100 ml), 1 M sósav oldattal (100 ml) illetve 10 m/v% nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (100 ml) extraháltam. A szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem majd acetonitril segítségével szárazra pároltam. A reakció, VRK módszer alapján teljes mértékben a kivánt terméket (**13**) eredményezte: (10 v/v% 2-propanol-toluol). Az analitikai vizsgálatok adatai teljes mértékben megegyeztek az irodalomban ismerttel.

2-Dezoxi-3,5-di-*O*-(*p*-toluoil)-α-D-ribofuranozil-klorid (14)¹¹¹



Az előző lépésből kapott toluoilezett metil-glikozidot (**13**) (38,99 g) feloldottam jégecetben (40 ml) egy 250 ml-es gömblombikba, majd sósavval telített ecetsav oldatot (80 ml) öntöttem hozzá. Tömény kénsav és tömény sósav oldat segítségével, sósav gázt allítottam elő majd szárítás után bevezettem a reakcióelegybe és egy mágneses keverő segítségével erőteljesen kevertettem. A reakció 30 perc alatt lejátszódott szobahőmérsékleten, 10 perc reakcióidő után csapadékkiválás volt megfigyelhető. A kapott csapadékot Ar atmoszféra alatt kiszűrtem, majd vízmentes dietil-éterrel (200 ml) mostam, végül exikátorban szárítottam (P₂O₅/Na₂CO₃). A szárított terméket (**14**) [16,00 g, 41,22 mmol, (41%, 3 lépésre számítva)] exszikkátorban tároltam, illetve 48 órán belül felhasználtam a következő lépéshez, elkerülve ezzel a levegő nedvességtartalmára megjelenő bomlástermékek kialakulását. A (**14**) vegyület esetében a nedvességtartartalomra való érzékenysége miatt nem történt szerkezetvizsgálat.





7-Benzil xantint (8) (3.11 g, 12.84 mmol) feloldottam vízmentes 1,4-dioxánban (50 ml) egy 250 ml-es gömblikba, majd nátrium-hidridet (618 mg, 25.69 mmol, 2 ekv., 55-60%) mértem hozzá és egy fűthető mágneses keverő segítségével 30 percen keresztül 45 °C-on erőteljesen kevertettem. A sóképzés után toluoilezett-glikozil-kloridot (14) (5,00 g, 12.84 mmol, 1 ekv.) feloldottam vízmentes 1,4-dioxánban, majd Ar atmoszféra alatt lassan hozzácsepegtettem a már előkészített elegyhez és a reakcióelegyet intenzív kevertetés mellett 2 órán keresztül 45 °C-on kevertettem. A reakcióidő lejárta után az elegyet bepároltam szárazra, etil-acetátban (500 ml) feloldottam, majd az elegyet 10%-os citromsav oldattal (250 ml), telített nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (250 ml), végül telített sóoldattal (250 ml) extraháltam. Az így kapott szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, majd bepároltam szárazra. VRK módszer segítségével megállapítható volt, hogy a kiindulóanyag nagy része elreagált a kívánt termék keletkezése közben (eluens: 10 v/v% EtOAc-CH₂Cl₂). A tiszta termék tömege (15) 2,00 g (3,36 mmol, 26%), amorf hab.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,36 (s, 3 H, C<u>H</u>₃); 2,39 (s, 3 H, C<u>H</u>₃); 2,90 (m, 0,2 H, H-2'a* mellék rotamer); 3,06 (m, 0,2 H, H-2'b* mellék rotamer); 3,34 (ddd, *J*_{2'a,2'b}=13,0 Hz, *J*_{2'a,1'} =6,7 Hz, *J*_{2'a,3'}=6,3 Hz, 0,8 H, H-2'a* fő rotamer); 4,44 (m, 1 H, H-5'a); 4,52 (dd, *J*_{4',3'}=11,0 Hz, *J*_{4',5'a}= *J*_{4',5'b}=6,1 Hz, 1 H, H-4'); 4,62 (m, 0,8 H, H-5'b fő rotamer); 4,97 (m, 0,2 H, H-5'b mellék rotamer); 5,47 (s, 2 H, BnC<u>H</u>₂); 5,53 (m, 0,3 H, H-3' mellék rotamer); 5,87 (m, 0,7 H, H-3' fő rotamer); 6,66 (pt, *J*_{1',2'a}=*J*_{1',2'b}=6,7 Hz, 0,3 H, H-1' mellék rotamer); 6,71 (pt, *J*_{1',2'a}=*J*_{1',2'b}=6,7 Hz, 0,3 H, H-1' mellék rotamer); 7,86 (m, 4 H, arom.); 8,21 (s, 0,7 H, H-8 fő rotamer); 8,26 (s, 0,2 H, H-8 mellék rotamer); 11,34 (br. s., 0,2 H, N<u>H</u> mellék rotamer); 11.37 (br. s., 0,71 H, N<u>H</u> fő rotamer). H-2'b fő rotamert vízjel takarja el. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 21,5 (<u>C</u>H₃); 21,5 (<u>C</u>H₃); 34,3 (C-2'); 49,3 (Bn<u>C</u>H₂); 64,3 (C-5'); 74,7 (C-3'); 81,0 (C-1'); 83,1 (C-4'); 107,4 (C-5); 126,7 (arom. Cq); 126,9 (arom. Cq); 127,9 (arom.); 128,4 (arom.); 129,0 (arom.); 129,5 - 129,7 (arom., C-8); 137,0 (Bn Cq); 144,1 (CH₃<u>C</u>q); 144,4 (CH₃<u>C</u>q); 148,5 (C-4); 150,6 (C-2); 154,9 (C-6); 165,8 (<u>C</u>O); 165,9 (<u>C</u>O). C₃₃H₃₀N₄O₇, MS (ESI): m/z 595 (100%, [M + H]⁺).

3-[3',5'-Di-*O*-(*p*-toluoil)-β-D-ribofuranozil]-xantin (16)



(15) (1,20 g, 2,01 mmol) feloldottam 1,4-dioxánban (100 ml), majd az oldatot átmostam egy kisebb méretű autoklávba (100 ml). Az előkészített oldathoz Pd(OH)₂ katalizátort (1.20 g, Pd(OH)₂/C, 20 % Pd, Pearlman-katalizátor) mértem, majd a rendszert feltöltöttem hidrogénnel és egy fűthető mágneses keverő segítségével 24 órán keresztül 90 °C-on kevertettem. A reakcióidő lejárta után az elegyet leszűrtem, majd acetonitriles bepárlás segítségével szárazra pároltam. A reakció lejátszódását VRK módszer igazolta, a kiindulóanyag teljes mennyisége elreagált a kívánt termék keletkezése közben (5 v/v%MeOH-CH₂Cl₂). А nyersterméket oszlopkromatográfiás módszer segítségével tisztítottam, (30 v/v% EtOAc-CH2Cl2). A tiszta termék tömege (16) 1,00 g (1,98 mmol, 98%), amorf hab. MS (ESI): m/z 505 (100%, $[M + H]^+$), $527 (20 \%, [M + Na]^+), 543 (8 \%, [M + K]^+).$

3-(β-D-Ribofuranozil)-xantin (17)



16 Nukleozidot (1,00 g, 1,98 mmol) feloldottam metanolban (20 ml) ultrahang segítségével, majd ehhez az elegyhez 40%-os vizes metilamin oldatot (20 ml) csepegtettem. Az előkészített reakcióelegyet egy fűthető mágneses keverő segítségével 24 órán keresztül, 45 °C-on kevertettem. A reakcióidő lejárta után az elegyet bepároltam szárazra, majd acetonitriles bepárlás segítségével a reakcióelegyben maradt vizet is eltávolítottam. VRK segítségével nyomon követhető volt a kiindulóanyag teljes mértékű elreagálása, a kívánt termék keletkezése mellett, (10 v/v% MeOH-CH₂Cl₂). A keletkezett nyersterméket oszlopkromatográfiás úton tisztítottam, (20 v/v% MeOH-CH₂Cl₂). A tiszta termék tömege: 0.50 g (1,86 mmol, 94%), amorf hab. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,95 (ddd, *J*_{2'a,2'b}=13,3 Hz, *J*_{2'a,1'}=7,2 Hz, *J*_{2'a,3'}=4,6 Hz, 0,7 H, H-2'a* fő rotamer); 2,84 (ddd, J_{2'b,2'a}=13,3 Hz, J_{2'b,1'}=7,2 Hz, J_{2'b,3'}=6,1 Hz, 0,7 H, H-2'b* fő rotamer); 4,14 (m, 1 H, H-5'a*); 4,37 (m, 1 H, H-5'b*); 4,87 (m, 0,3 H, H-3' mellék rotamer); 5,35 (m, 0,6 H, H-3' fő rotamer); 6,49 (pt, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 7,2$ Hz, 0,4 H, H-1' mellék rotamer); 6,55 (pt, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 7,2$ Hz, 0,7 H, H-1' fő rotamer); 8,02 (s, 0,6 H, H-8 fő rotamer); 8,06 (s, 0,3 H, H-8 mellék rotamer); 11,26 (br. s., 1 H, NH). A H-2'a - H-2'b mellék rotamerereket szennyeződés, a H-4 protont vízjel takarja el. Hidroxilcsoportok a spektrumban nem látszódnak. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 36,9 (C-2' rotamer); 37,2 (C-2' rotamer); 61,9 (C-5' rotamer); 62,7 (C-5' rotamer); 71,4 (C-3' rotamer); 71,7 (C-3' rotamer); 83,1 (C-1' rotamer); 83,9 (C-1' rotamer); 87,1 (C-4' rotamer); 87,9 (C-4' rotamer); 108,5 (C-5 rotamer); 108,7 (C-5 rotamer); 129,5 (C-8 rotamer); 129,7 (C-8 rotamer); 147,26 (C-4 rotamer); 147,35 (C-4 rotamer); 150,9 (C-2 rotamer); 151,1 (C-2 rotamer); 154,9 (C-6). $C_{10}H_{12}N_4O_5$, MS (ESI): m/z 269 (100%, $[M + H]^+$), 537 (20 %, $[2M + H]^+$), 559 (35 %, $[2M + Na]^+$).

N^7 , 5'-O-Di-(4,4'-dimetoxitritil)- 3-(β -D-ribofuranozil)-xantin (18)



17 Vegyületet (0,40 g, 1,492 mmol) feloldottam piridinben (10 ml) egy 100 ml-es gömblombikban, majd frissen kristályosított 4,4'-dimetoxitritil-kloridot (1,26 g, 3.73 mmol, 2.5 ekv.) csepegtettem hozzá piridinben (10 ml). Az így előkészített reakcióelegyhez trietilamint (0.52 ml, 0.38 g, 3.73 mmol, 2.5 ekv.) mértem és 3 órán keresztül szobahőmérsékleten intenzíven kevertettem. VRK segítségével megállapítható volt a kiindulóanyag teljes mértékű elreagálása a bisztritilezett származék keletkezése közben. A reakcióidő lejárta után az elegyet bepároltam szárazra acetonitril segítségével, majd a bepárlási maradékot etil-acetátban oldottam (200 ml) és 5% nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (100 ml), vízzel (100 ml) illetve telített sóoldattal (100 ml) extraháltam. A szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, végül acetonitril segítségével szárazra bepároltam. A nyersterméket gyors oszlopkromatográfiával tisztítottam, kevés szilikagélt, illetve 5-10% trietilamint tartalmazó eluenst felhasználva (hexán:EtOAc:DCM:TEA-10:4,5:4,5:1) megelőzve ezzel a szilikagél savasságára bekövetkező nem kívánatos 4,4'-dimetoxitritil hasadást. A keletkezett tiszta termék 0.45 g (18) (0.51 mmol, 34%), amorf hab. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 2,06 (m, 1 H, H-2'a*); 2,93 (ddd, $J_{2'b,2'a}=12,4$ Hz, $J_{2'b,1'}=6,4$ Hz, $J_{2'b,3'}=6,3$ Hz, 1 H, H-2'b*); 3,18 (d, $J_{5'a,4'}=J_{5'b,4'}=4,65$ Hz, 2 H, H-5'a, H-5'b); 3,68 (s, 3 H, CH₃); 3,69 (s, 3 H, CH₃); 3,74 (s, 6 H, 2 x CH₃); 3,89 (dd, J_{4',3'} =10,0 Hz, $J_{4',5'a} = J_{4',5'b} = 4,65$ Hz, 1 H, H-4'); 4,41 (m, 1 H, H-3'); 5,13 (d, $J_{OH,3'} = 4,9$ Hz, 1 H, O<u>H</u>); 6,61 (pt, *J*_{1',2'a} = *J*_{1',2'b} = 6,4 Hz, 1 H, H-1'); 6,76 - 7,40 (m, 27 H, arom., H-8); 10,69 (s, 1 H, N<u>H</u>). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 36,5 (C-2'); 54,9 (CH₃); 55,0 (CH₃); 64,2 (C-5'); 71,0 (C-3'); 75,6 (N arom.Cq); 82,9 (C-4'); 85,2 (N arom. Cq); 85,3 (C-1'); 109,1 (C-5); 112,9 (arom.); 113,0 (arom.); 126,4 - 130,4 (arom., C-8); 133,5 (arom. Cq); 135,8 (arom. Cq); 135,9 (arom. Cq); 141,7 (arom. Cq); 144,9 (arom. Cq); 149,8 (C-4); 150,1 (C-2); 152,2 (C-6); 157,9

(<u>C</u>qOCH₃); 158,3 (<u>C</u>qOCH₃). C₅₂H₄₈N₄O₉, MS (ESI): *m*/*z* 303 (100%, [DMTr]⁺), 879 (25 %, [M + Li]⁺).

A termékről 2D NMR mérések is készültek (COSY, HSQC, HMBC és NOESY).

Bisz-5'-*O*,7-*N*-(4,4'-dimetoxitritil)-3-(2'-dezoxi-β-D-ribofuranozil)xantin-3'-*O*-il-(*O*-2cianoetil)-*N*,*N*-diizopropil-foszforamidit (19)



18 Vegyületet (350 mg, 0,40 mmol) feloldottam foszfor-pentoxidról frissen desztillált vízmentes diklórmetánban (15 ml) Ar atmoszféra alatt, majd az előkészített elegyhez bisz-amidit reagenst (0,14 ml, 0,13 g, 0,44 mmol, 1,1 ekv.) csepegtettem. Az így előkészített reakcióelegyhez végül 1*H*-tetrazolt (14,00 mg, 0,20 mmol, 0,5 ekv.,) mértem, majd egy mágneses keverő segítségével 2 órán keresztül kevertettem Ar atmoszféra alatt. A reakcióidő lejárta után VRK módszer alapján a reakcióelegyben még bőven maradt elreagálatlan kiindulóanyag, ezért további bisz-amidit reagenst (0,13 ml, 0,12 g, 0,40 mmol, 1 ekv.,) illetve 1*H*-tetrazolt (14,00 mg, 0,20 mmol, 0,5 ekv.) mértem az elegyhez. Újabb 2 óra reakcióidő után, VRK alapján megállapítható volt, hogy a kiindulóanyag teljes mértékben elreagált a várt termék keletkezése közben. A reakcióidő lejárta után az elegyet bepároltam, majd gyors-oszlopkromatográfiás módszer segítségével tisztítottam, kevés szilikagélen 5-10% trietil-amint tartalmazó eluens (hexán:EtOAc:DCM:TEA-20:4,5:4,5:1) segítségével. A megtisztított nedvességre érzékeny terméket vízmentes acetonitril segítségével 45 °C-on szárazra pároltam, majd Ar atmoszféra alatt -20°C-on tároltam. A keletkezett tiszta termék 400 mg (**19**) (0,37 mmol, 92%), amorf hab. ³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN) δ ppm 13,0 (<u>P</u>-H-foszfonát); 16,2 [P(V)];

148,5 és 148,9 [P(III) diasztereomerek]. ³¹P, ¹H és ¹³C NMR alapján a kívánt termék azonosítható, oligonukleotid szintézishez felhasználható, ám a jelen levő szennyeződések miatt a ¹H és ¹³C NMR spektrumok nehezen értékelhetőek. C₆₁H₆₅N₆O₉P, MS (ESI): m/z 303 (100%, [DMTr]⁺), 1079,5 (35 %, [M + Na]⁺).

4.2.3. A 3-szubsztituált xantin/timintartalmú PNS monomerek előállítása

Etil-(7-benzil-3-xantinil)-acetát (20a)



Egy 500 ml-es gömblombikba 7-benzilxantint (8) (6,00 g, 24,78 mmol) és káliumkarbonátot (4,00 g, 29,74 mmol, 1,2 ekv.) mértem, majd ultrahang segítségével vízmentes dimetil-formamidban (100 ml) feloldottam. A kapott heterogén oldatot fűthető mágneses keverő segítségével 1 órán keresztül 45 °C-on mechanikus keverő segítségével erőteljesen kevertettem. A sóképzés után az előkészített reakcióelegyhez etil-bróm-acetátot (3,01 ml, 4,55 g, 27,26 mmol, 1,1 ekv.) csepegtettem vízmentes dimetil-formamidban (100 ml) 1 órán keresztül, intenzív kevertetés mellett. A reagens hozzáadása után az elegyet 24 órán keresztül 45 °C-on kevertettem. A reakcióidő lejárta után, VRK módszer segítségével megbizonyosodtam a kiindulóanyag jelentős részének az elreagálásáról, illetve a kivánt termék keletkezéséről, majd 50%-os ecetsav oldatot (20,5 ml) csepegtettem az elegyhez, a maradék kálium-karbonát semlegesítése céljából. Az így kapott reakcióelegyet bepároltam, majd a desztillációs maradékot etanollal illetve acetonitrillel pároltam a maradék dimetil-formamid eltávolítása céljából. Ezek után etil-acetátban oldottam (500 ml), majd vízzel (200 ml) és telített nátrium-klorid oldattal (200 ml) extraháltam. A szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, majd acetonitril segítségével szárazra pároltam. A reakció során egy nem kívánt melléktermék, a bisz-alkilezett származék (20b) keletkezése volt megfigyelhető, ami nehezebbé tette a kívánt termék tisztítását. A kapott nyers terméket oszlopkromatográfiás módszer segítségével tisztítottam (20 v/v% EtOAc-CH₂Cl₂). A megtisztított észter 3,00 g (**20a**) (9,13 mmol, 37%) illetve bisz-alkilezett származék 3,00 g (**20b**) (7,23 mmol, 29%), valamint az átalakulatlan kiindulóanyag 2,03 g (**8**) (8,38 mmol, 34%). Az analitikai vizsgálatok adatai (¹H, ¹³C NMR, MS) megegyeztek az irodalomban szereplő adatokkal.¹⁰¹ MS (ESI): m/z 328 (100%, [M + H]⁺), 367 (8 %, [M + K]⁺), 679 (30 %, [2M + Na⁺]).

7-Benzil-xantin-3-il-ecetsav (21)



Egy 250 ml-es gömblombikba **20a** észtert (3,00 g, 3,04 mmol) feloldottam tetrahidrofuránban (20 ml), majd 5 %-os sósavoldatot (100 ml) mértem hozzá. A vizes oldat hozzáadására a kiindulóanyag kicsapódott, de a reakcióelegy 80 °C-ra való melegítése után újra beoldódott. Az így előkészített elegyet fűthető mágneses keverő segítségével 24 órán keresztül 80 °C-on intenzíven kevertettem. A 24 óra elteltével a termék fehér csapadékként kivált, majd a reakcióelegyet visszahűtöttem szobahőmérsékletre. A terméket vákuum segítségével kiszűrtem, majd mostam jéghideg vízzel, illetve hideg *n*-hexánnal. VRK szerint a kiindulóanyag teljes mértékben átalakult az általunk várt termékké (**21**), (CH₃CN : MeOH : H₂O-5 : 4 : 1). A tiszta termék 2.60 g (8.65 mmol, 95%).¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 4,56 (s, 2 H, H-1'a, H-1'b); 5,45 (s, 2 H, BnC<u>H</u>₂); 7,08 - 7,56 (m, 5 H, arom.); 8,22 (s, 1 H, H-8); 11,29 (s, 1 H, N<u>H</u>); 13,11 (br. s., 1 H, O<u>H</u>). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 42,8 (C-1'); 49,1 (BnC<u>H</u>₂); 106,0 (C-5); 127,7 (arom.); 128,0 (arom.); 128,7 (arom. C-8); 136,8 (arom. Cq); 149,5 (C-4); 150,6 (C-2); 154,7 (C-6); 169,1 (COOH). C₁₄H₁₂N₄O₄, MS (ESI): *m/z* 301 (100%, [M + H]⁺).¹⁰¹

terc-Butil-2-((2-aminoetil)amino)acetát (23)¹¹²



Egy 500 ml-es gömblombikba etilén-diamint (**22**) (30,04 ml, 449,36 mmol, 8 ekv.) mértem és diklór-metánban (200 ml) oldottam, majd a reakcióelegyet jeges hűtés segítségével 0 °C-ra hűtöttem. A lehűtött elegyhez, heves kevertetés mellett *terc*-butil-brómacetátot (8,30 ml, 56,17 mmol) csepegtettem diklór-metánban (40 ml) 5 órán keresztül. A reagens hozzáadása után a reakcióelegyet lassan szobahőmérsékletre melegítettem majd 12 órán keresztül intenzíven kevertettem. A 12 óra elteltével a reakcióelegyet vízzel (3×150 ml) extraháltam, majd az így keletkezett szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem és végül acetonitril segítségével szárazra bepároltam. A bepárlás után visszamaradt terméket (**23**) egyből felhasználtam a következő lépéshez. A keletkezett termék 6,50 g (37,30 mmol, 66 %).

terc-Butil-2-(N-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)karbonil)amino)etil)amino)acetát (24)



Az előző lépésben előállított *terc*-butil-észtert (**23**) (5,00 g, 28,73 mmol) feloldottam diklór-metánban (200 ml) egy 500 ml-es gömblombikban, majd *N*,*N*-diizopropil-etilamint (4,75 ml, 3,52 g, 27,29 mmol, 0.95 ekv.) csepegtettem hozzá. Az előkészített elegyhez 9-fluorenilmetil-szukcinimidil-karbonátot (9,20 g, 27,29 mmol, 0,95 ekv.) csepegetettem diklór-metánban (50 ml) 2 órán keresztül, intenzív kevertetés mellett. A reagens hozzáadása után az elegyet 12 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. A 12 óra reakcióidő után a reakcióelegyet 1 M-os HCl-oldattal (3×200 ml), vízzel (200 ml), végül telített sóoldattal (200 ml) extraháltam. A szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem majd bepároltam a szerves fázis 50 %-át és 12 órán keresztül -20 °C-on tároltam. Kis idő elteltével a termék kristályosodása volt

megfigyelhető, majd 12 óra kristályosodás után a kivált terméket kiszűrtem és jéghideg diklórmetánnal (200 ml) mostam. A tiszta végtermék (**24**) 10,00 g (25,28 mmol, 88 %). Az analitikai vizsgálatok adatai, teljes mértékben megegyeznek az irodalomban szereplő adatokkal.¹¹²

terc-Butil-2-(*N*-(2-((((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)karbonil)amino)etil)-2-(7-benzil-2,6-dioxo-1*H*-purin-3(2*H*,6*H*,7*H*)-il)acetamido)acetát (25)



Egy 250 ml-es gömblombikba 21 savat (1,50g, 4,99 mmol) feloldottam vízmentes dimetil-formamidban (50 ml), majd HOBT-t (1,52 g, 9,99 mmol, 2 ekv.) és HBTU-t (3,79 g, 9,99 mmol, 2 ekv.) mértem az elegyhez és mágneses keverő segítségével erőteljesen kevertettem. Ezek után (24) (1,97 g, 4,99 mmol, 1 ekv.) feloldottam diklór-metánban (50 ml) majd telített nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (20 ml) extraháltam. A kapott szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, majd N,N-diizopropil-etilamint (1,74 ml, 9,99 mmol, 2 ekv.) csepegtettem hozzá és az oldatot intenzív kevertetés mellett, lassan hozzácsepegtettem az előkészített reakcióelegyhez, majd 48 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. VRK alapján a reakcióidő lejárta után a kiindulóanyag jelentős része elreagált a kívánt termék keletkezése közben. Ezek után a reakcióelegyet bepároltam, majd a bepárlási maradékot feloldottam diklórmetánban (300 ml) és 1 M sósav-oldattal (300 ml), telített nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (300 ml), végül telített sóoldattal (300 ml) extraháltam. A kapott szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, majd acetonitril segítségével szárazra bepároltam. A nyerstermék tisztítását oszlopkromatográfiás módszer segítségével végeztem (20 v/v% EtOAc-nexán). A tisztított termék (25) 1,38 g (2,03 mmol, 41 %), amorf hab. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,33 (s, 6 H, t-Bu CH₃ fő rotamer); 1,44 (s, 3 H, t-Bu CH₃ mellék rotamer); 3,06 (m, 0,7 H, Fmoc NHCH₂*CH₂N mellék rotamer); 3,26 (m, 2 H, Fmoc NHCH₂CH₂*N); 3,45 (m, 1,4 H, Fmoc

NHC<u>H</u>₂*CH₂N fő rotamer); 3,87 (m, 1 H, Fmoc C<u>H</u>CH₂); 4,20 (m, 2 H, C<u>H</u>₂COOtBu); 4,27 (m, 0,7 H, Fmoc CHC<u>H</u>₂ mellék rotamer); 4,29 (m, 1,3 H, Fmoc CHC<u>H</u>₂ fő rotamer); 4,67 (s, 0,6 H, xantinil C<u>H</u>₂ mellék rotamer); 4,82 (s, 1,1 H, xantinil C<u>H</u>₂ fő rotamer); 5,40 (s, 2 H, BnC<u>H</u>₂); 7,32 (m, 10 H, arom., Fmoc N<u>H</u>); 7,64 (d, *J*=7,3 Hz, 2 H, arom.); 7,84 (t, *J*=6,4 Hz, 2 H, arom.); 8,10 (s, 0,5 H, H-8 rotamer); 8,1 (s, 0,5 H, H-8 rotamer); 11,25 (br. s., 1 H, N<u>H</u>-1).¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 27,9 (*t*-Bu CH₃); 42,8 (Fmoc NHCH₂CH₂N); 47,0 (Fmoc CHCH₂); 47,4 (CH₂COO*t*Bu); 49,2 (Fmoc NHCH₂CH₂N); 49,5 (xantinil-CH₂); 50,3 (BnCH₂); 65,8 (Fmoc CHCH₂ rotamer); 65,9 (Fmoc CHCH₂ rotamer); 81,45 (*t*-Bu Cq rotamer); 82,5 (*t*-Bu Cq rotamer); 106,4 (C-5); 120,4 (arom.); 125,4 (arom.); 127,4 - 129,0 (arom., C-8); 137,1 (Bn Cq); 141,1 (arom. Cq); 144,2 (arom. Cq); 150,3 (C-4); 151,3 (C-2); 155,2 (C-6); 156,5 (Fmoc COO rotamer); 156,9 (Fmoc COO rotamer); 167,0 (xantinil CH₂CO); 167,4 (xantinil CH₂CO ortamer); 168,4 (COO*t*Bu rotamer); 168,8 (COO*t*Bu rotamer). C₃₇H₃₈N₆O₇, MS (ESI): MS (ESI): *m/z* 679 (100%, [M + H]⁺), 701 (20 %, [M + Na]⁺).

terc-Butil-2-(*N*-(2-((((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)karbonil)amino)etil)-2-(7-benzil-2,6-dioxo-1*H*-purin-3(2*H*,6*H*,7*H*)-il)acetamido)ecetsav (26)



Egy 250 ml-es gömblombikba **25** észtert (1,30 g, 1,91 mmol) mértem és feloldottam diklór-metánban (130 ml) majd ehhez az oldathoz trifluor-ecetsavat (27,69 ml) és vizet (1,37 ml) csepegtettem és intenzív kevertetés mellett 6 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. VRK módszer alapján a reakcióidő lejárta után a kiindulóanyag teljes mértékben átalakult az általunk várt termékké. A kapott elegyet bepároltam, majd ismételt acetonitriles bepárlással eltávolítottam a reakcióelegyben maradt trifluor-ecetsavat. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam, (20 v/v% 2-propanol-hexán). A megtisztított termék (**26**):

0,60 g (0,96 mmol, 50%), amorf hab. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,28 (m, 2 H, Fmoc NHCH₂CH₂*N); 3,46 (m, 2 H, Fmoc NHCH₂*CH₂N); 3,94 (m, 1 H, Fmoc CHCH₂); 4,14 - 4,37 (m, 4 H, CH₂COO*t*Bu, Fmoc CHCH₂); 4,68 (s, 0,6 H, xantinil CH₂ mellék rotamer); 4,83 (s, 1,2 H, xantinil CH₂ fő rotamer); 5,40 (s, 2 H, BnCH₂); 7,32 (m, 10 H, arom., Fmoc NH); 7,64 (d, J=7,32 Hz, 2 H, arom.); 7,84 (t, J=6,41 Hz, 2 H, arom.); 8,08 (s, 0,54 H, H-8 fő rotamer); 8,11 (s, 0,40 H, H-8 mellék rotamer); 11,23 (br.s., 0,29 H, NH-1 mellék rotamer); 11,25 (br.s., 0,69 H, NH-1 fő rotamer). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 42,9 (Fmoc NHCH₂CH₂N); 47,0 (Fmoc CHCH₂); 47,2 (CH₂COO*t*Bu); 47,9 (Fmoc NHCH₂CH₂N); 49,3 (BnCH₂*); 49,4 (xantinil CH₂*); 65,8 (Fmoc CHCH₂ rotamer); 65,9 (Fmoc CHCH₂ rotamer); 106,4 (C-5); 120,4 (arom.); 125,5 (arom.); 127,4 - 129,1 (arom., C-8); 137,1 (BnCq); 141,0 (arom. Cq); 144,1 (arom Cq.); 167,3 (xantinil CH₂CO rotamer); 170,9 [COOC(CH)₃ rotamer]; 171,2 [COOC(CH)₃ rotamer]. C₃₃H₃₀N₆O₇, MS (ESI): *m*/*z* 623 (100%, [M + H]⁺), 645 (20 %, [M + Na]⁺).

Timin-1-il-ecetsav (29)



Egy 500 ml-es gömblombikba timint (**27**) (29,00 g, 229,93 mmol) és kálium-karbonátot (31,77 g, 229,93 mmol, 1 ekv.) mértem, majd 200 ml vízmentes dimetil-formamidban feloldottam ultrahang fürdő segítségével. A sóképzés után a heterogén elegyhez etilbrómacetátot (25,43 ml, 38,40 g, 229,93 mmol, 1 ekv.,) csepegtettem erőteljes kevertetés mellett. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem 4 órán keresztül, majd az elegyet leszűrtem és szárazra pároltam, amíg egy fehér színű teljesen száraz desztillációs maradékot kaptam. A maradékot vizes nátrium-hidroxid oldattal kezeltem (500 ml 2 M) 20 percen keresztül forralás mellett. Ezek után az elegyet 0 °C-ra hűtöttem, majd 30 percen keresztül vizes sósavoldat hozzáadása után (500 ml, 4 M) intenzíven kevertettem. A timin-1-il-ecetsavat, ami fehér

csapadék formájában keletkezett, leszűrtem, majd mostam hideg vízzel és exszikkátorban szárítottam (foszfor-pentoxid). A keletkezett fehér kristályos termék (**29**) 29,23 g (70%). Az analitikai vizsgálatok eredményei (¹H, ¹³C NMR, MS) teljes mértékben megegyeznek az irodalomban leírttal.¹¹³⁻¹¹⁵

terc-Butil-2-(*N*-(2-((((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)karbonil)amino)etil)-2-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)acetamido)acetát (30)



Egy 250 ml-es gömblombikba 29 savat (2,00 g, 10,86 mmol) feloldottam vízmentes dimetil-formamidban (100 ml), majd HOBt-t (3,30 g, 21,72 mmol, 2 ekv.) és HBTU-t (8,25 g, 21,72 mmol, 2 ekv.) mértem az elegyhez és mágneses keverő segítségével erőteljesen kevertettem. Ezek után 24 vegyületet (4,30 g, 10,86 mmol, 1 ekv.) feloldottam diklór-metánban (100 ml), majd telített nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (20 ml) extraháltam. A kapott szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, majd N,N-diizopropil-etilamint (3,78 ml, 21,72 mmol, 2 ekv.) csepegtettem hozzá és az oldatot intenzív kevertetés mellett lassan hozzácsepegtettem a reakcióelegyhez, majd 48 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. VRK alapján a reakcióidő lejárta után a kiindulóanyag jelentős része elreagált a kívánt termék keletkezése közben. Ezek után a reakcióelegyet bepároltam, majd a bepárlási maradékot feloldottam diklórmetánban (300 ml) és 1 M sósavoldattal (300 ml), telített nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (300 ml), végül telített sóoldattal (300 ml) extraháltam. A kapott szerves fázist szárítottam (Na₂SO₄), szűrtem, majd acetonitril segítségével szárazra bepároltam. A nyerstermék tisztítását oszlopkromatográfiás módszer segítségével végeztem, 2 v/v% MeOH - DCM eluens rendszer felhasználásával. A tisztított termék (30): 2,50 g (4,44 mmol, 41%). Az analitikai vizsgálatok adatai (¹H, ¹³C NMR, MS) megegyeznek az irodalomban foglalt adatokkal.¹¹⁰

2-(*N*-(2-((((9*H*-Fluoren-9-il)metoxi)karbonil)amino)etil)-2-(5-metil-2,4-dioxo-3,4dihidropirimidin-1(2H)-il)acetamido)ecetsav (31)



Egy 500 ml-es gömblombikba **30** vegyületet (2,10 g, 3,73 mmol) mértem és ultrahangfürdő segítségével feloldottam diklór-metánban (200 ml) majd ehhez az oldathoz trifluor-ecetsavat (43,61 ml) és vizet (2,42 ml) csepegtettem és intenzív kevertetés mellett 6 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. VRK alapján a reakcióidő lejárta után a kiindulóanyag teljes mértékben átalakult az általunk várt termékké. A kapott elegyet bepároltam, majd ismételt acetonitriles bepárlással (20×50 ml) eltávolítottam a reakcióelegyben maradt trifluor-ecetsavat. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam, 10 v/v% MeOH-DCM eluens rendszer felhasználásával. A megtisztított termék (**31**) 0,97 g (1,91 mmol, 51%). Az analitikai vizsgálatok eredményei (¹H, ¹³C NMR, MS) megegyeznek az irodalomban foglaltakkal.¹¹⁰

4.2.4. DNS oligonukleotid szintézis

Szilárd fázisú oligomer szintézist alkalmazva, modell DNS oligomer szekvenciákat állítottam elő foszforamidit módszer segítségével, egy Expedite 8909 típusú szintetizátor felhasználásával. A felhasznált szilárd hordozó kontrollált porozitású üveg (CPG) volt, melynek pórusmérete 500 Å, kapacitása 40-50 µmol/g.

A szokásos foszforamidit szintézis négy lépéses ciklusában felhasznált reagensek:

1. Átmeneti védőcsoport eltávolítás: a dezoxiribóz 5'-DMTr átmeneti védőcsoportjának eltávolítása 3% triklórecetsavat tartalmazó diklór-metánnal történt (kb. 1200-1500 µl, 60-90 s)

2. Kapcsolás: a száraz acetonitrillel alaposan lemosott oszlopra kerül a monomer (ebben az esetben a 3-szubsztituált xantin-és timin-tartalmú monomerek) 0,1 M-os száraz acetonitriles oldatából 80-100 μl, valamint az aktivátorként használt 1*H*-tetrazol 0,45 M-os száraz acetonitriles oldatából 100-150 μl. Kapcsolási idő 30-300 s.

3. Lefedés (capping) lépés: az elreagálatlan 5'-hidroxil csoportok lefedése kb. 400-400 μ l ecetsavanhidrid-tetrahidrofurán (1:9 v/v%) és tetrahidrofurán-piridin-*N*-metilimidazol 8:1:1 (v/v/v%) elegyek keverékével történik (30 s).

4. Oxidáció: a P(III)-P(V) oxidációs lépés 0,02 M-os jód oldattal történt (tetrahidrofurán-piridinvíz 89,6:10:0,4 v/v/v%), kb. 300 μ l, 30 s alatt.

A kívánt szekvencia elérése után az elkészült nyers oligomer szilárd hordozóról történő hasítása vizes 25%-os ammónium-hidroxid oldattal történt 55 °C-on egy éjszakán át (16 h). A szilárd hordozóról való hasítást követően a nyers oligomerek tisztítását PolyPak oszlopon vagy HPLC-vel (Shimadzu típusú HPLC, LiChrosper RP Select B oszlop, C18 töltet, eluens A: 0,1 M TEAAc vízben pH=7,0, eluens B:ACN, gradiens 0-50% B 50 perc alatt) végeztem.

4.2.5. PNS oligomer szintézis

Az általános szilárd fázisú peptidszintézis segítségével előállított tx₄t modell PNS oligomer előállításánál az Fmoc-kémiában alkalmazott általános védőcsoport hasítási, aktiválási illetve kapcsolási körülményeket alkalmaztam. A PNS oligomerek minden esetben kézi peptidszintézis segítségével készültek, egy házilag készített peptid rázópad illetve Merrifield edény felhasználásával, illetve szilárd hordozóként Fmoc-védett Rink-amide-MBHA gyantát alkalmaztam, amelynek borítottsága 0,50 mmol/g. A szilárd fázisú szintézis lépései és a felhasznált reagensek a következők:

Szilárd hordozó: Rink-amide-MBHA gyanta (0,50 mmol/g borítottságú, 25 mg, 0,0125 mmol)

1. *Fmoc csoport hasítás*: 20%-os piperidin (1,50 ml, 25 perc), mosás dimetil-formamid (10 ml) illetve diklór-metán (10 ml) segítségével, majd a gyanta duzzasztása diklormetán-dimetil-formamid elegyében (10-10 ml).

2. *Fmoc-Glicin kapcsolás*: Fmoc-glicin (11,14 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.), HATU (14,25 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.), DIPEA (6,53 µl, 4,84 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) illetve lutidin (4,34 µl, 4,01 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) diklór-metán és dimetil-formamid (5-5 ml) oldatában 15 perc szobahőmésékleten való előaktiválás után, hozzácsepegtettem a duzzasztott gyantához, majd 2 órán keresztül szobahőmérsékleten rázattam. A reakcióidő lejárta után mostam: dimetil-formamid (10 ml), diklórmetán (10 ml). A negatív ninhidrin teszt után Fmoc-csoport hasítása következett a már említett reakciókörülmények között, majd a gyanta duzzasztása diklór-metán és dimetil-formamid (10-10 ml) elegyében.

3. *t-PNS kapcsolás*: t-PNS (18,99 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) HATU (14,25 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.), DIPEA (6,53 µl, 4,84 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) illetve lutidin (4,34 µl, 4,01 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) diklórmetán és dimetil-formamid (5-5 ml) oldatában 15 perc szobahőmésékleten való előaktiválás után, hozzácsepegtettem a duzzasztott gyantához, majd 2 órán keresztül szobahőmérsékleten rázattam. A reakcióidő lejárta után mostam: dimetil-formamid (10 ml), diklórmetán (10 ml), metanol (10 ml). A negatív ninhidrin teszt után Fmoc-csoport hasítása következett a már említett reakciókörülmények között, majd a gyanta duzzasztása diklórmetán és dimetil-formamid (10-10 ml) elegyében.

4. *x-PNS kapcsolás:* x-PNS (23,42 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) HATU (14,25 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.), DIPEA (6,53 µl, 4,84 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) illetve lutidin (4,34 µl, 4,01 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) diklórmetán és dimetil-formamid (5-5 ml) oldatában 15 perc szobahőmésékleten való előaktiválás után, hozzácsepegtettem a duzzasztott gyantához, majd 2 órán keresztül szobahőmérsékleten rázattam. Mivel a tervezett szekvencia három xantin-PNS egységet tartalmazott ezért az x-PNS kapcsolását háromszor végeztem el, az említett reakciókörülmények betartásával. A reakcióidő lejárta után mostam: dimetil-formamid (10 ml) diklór-metán (10 ml), metanol (10 ml). A negatív ninhidrin teszt után Fmoc-csoport hasítása következett a már említett reakciókörülmények között, majd a gyanta duzzasztása diklór-metán és dimetil-formamid (10-10 ml) elegyében.

5. *t*-*PNS kapcsolás*: t-PNS (18,99 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) HATU (14,25 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.), DIPEA (6,53 μl, 4,84 mg, 0,0375 mmol, 3 ekv.) illetve lutidin (4,34 μl, 4,01 mg, 0,0375

mmol, 3 ekv.) diklórmetán és dimetil-formamid (5-5 ml) oldatában 15 perc szobahőmésékleten való előaktiválás után, hozzácsepegtettem a duzzasztott gyantához, majd 2 órán keresztül szobahőmérsékleten rázattam. A reakcióidő lejárta után mostam: dimetil-formamid (10 ml), diklór-metán (10 ml), metanol (10 ml). A negatív ninhidrin teszt után az Fmoc-csoport hasítása következett a már említett reakciókörülmények között. Minden kapcsolási lépést követően ecetsavanhidrides lefedést alkalmaztam (5% ecetsavanhidrid, 1,5 ml, 25 perc), az elreagálatlan aminocsoportok lefedése céljából.

6. *elkészült oligomer hasítása*: az elkészült Fmoc-hasított tx₄t oligomer gyantáról való hasítása trifluorecetsav-diklór-metán (50% TFA-DCM, 10 ml, 3 óra) elegyével történt. A reakcióidő lejártával az elegyet bepároltam acetonitril segítségével, a bepárlási maradék dietil-éterrel való kicsapása után az elegyet leszűrtem, majd a leszűrt oligomert (acetonitril:víz:ecetsav-1:1:1, 10 ml) beoldottam majd az így kapott homogén oldatot liofilizáltam.

5. Összefoglalás

Az önszerveződő képességekkel rendelkező molekulák, széles körben felhasználhatóak a szupramolekuláris kémia, orvosi kémia, szerkezeti biológia és a nanotechnológiai alkalmazások terén. A G-tetrádok azonosítása óta, elméleti számolásokra és kísérleti eredményekre alapozva, nagyszámú kvadruplex szerkezetet azonosítottak. Az új szerketetek számos módosítást tartalmaznak, kezdve a guanin nukleobázison történő változtatásoktól egészen a teljes monomer egység helyettesítéséig. Minden esetben bebizonyosodott, hogy a kationok nagyon fontos szerepet játszanak a kialakult kvadruplex szerkezetek stabilitásában, beékelődve a tapadó tetrád szerkezetek közzé, valamint negatív töltéssel rendelkező molekulák kölcsönhatása a kvadruplex szerkezetekkel tovább növelheti a szerkezet stabilitását. Az említett esetek mindegyikében a kialakuló kvadruplex szerkezet elektromos szempontból semleges volt. A töltéssel rendelkező kvadruplex szerkezetek fontosak lehetnek nemcsak a különböző ionok megkötése céljából, hanem új lehetőségeket nyitnak a magasabb rendű szerkezetek tervezése terén is (nano-drótok). Az eddigi megállapítások szerint a G-kvartett szerkezetek a legmegfelelőbb molekulák a tapadó kölcsönhatások kialakulására, mert a guanin egységek erős kölcsönhatással kapcsolódnak egymáshoz, ami egy optimális síkbeli alakot biztosít a szerkezetnek. Más purin alapú tetramereket is megvizsgáltak (adenin, inozin), de minden esetben ezek a szerkezetek gyengébb kölcsönhatásokat tartalmaztak, illetve kevésbé síkbeli alkattal rendelkeznek. A kevésbé síkbeli alkat kialakulása érthető ezekben a szerkezetekben, hiszen a nukleobázisok csak egy hidrogénkötéssel kapcsolódnak egymáshoz ezekben a tetramerekben, ami nagyobb flexibilitást illetve a síkalkattól eltérő szerkezetet biztosít a molekulának. Jelen dolgozatban bemutattuk, hogy a xantin tartalmú szerkezetekben két alacsony potenciálgátú hidrogénkötés kialakulására van lehetőség a szomszédos xantin egységek között, valamint azt, hogy a természetben előforduló húgysav képes a tetramer képzésre xantin segítségével illetve nélküle. Következtetésképpen a kialakuló rendszer egy pozitív töltéssel fog rendelkezni, ami erős kölcsönhatás kialakulásával jár. Elméleti számítógépes számításokra alapozva, olyan kvartett rendszerek kialakulását feltételeztük, amelyek pozitív töltéssel illetve töltés nélkül alakulnak ki xantin (9-metilxantin) illetve húgysav származékokból. Az elvárásainknak megfelelően a kialakuló szerkezetek képesek különböző anionokkal való kölcsönhatásra, valamint a monomerek közötti két erős hidrogénkötés kialakulása síkbeli alkatot kölcsönözhet a szerkezeteknek. A legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan tetramer amelyben, a pozitív töltés a tetramer szerkezethez tartozik, nem pedig a központi fémionhoz.

Jelen dolgozatban a 3-szubsztituált xantinok (purinszármazékok) magasabbrendű szerkezetekbe való önszerveződésének képességeit vizsgáltuk. A 3-szubsztituált xantinok domináns 7*H*-tautomer formája lehetővé teszi, hogy a kialakult tetrád szerkezetben a szomszédos xantin egységek két hidrogénkötéssel kapcsolódjanak egymáshoz, hasonlóan a guanin tetrádok kialakulásához. Ezek alapján feltételeztük, hogy a kialakuló magasabb rendű szerkezetben, a xantin egységek között erős kölcsönhatások, és teljesen sík alkatú szerkezet alakul ki gázfázisban is. Az említett vizsgálatok elvégzéséhez a legegyszerűbb purin modellt, a 3-metilxantint választottuk (lásd 3.2.1 fejezet, 38. ábra) kationokkal és kationok nélkül. A 3-szubsztituált xantinok magasabb rendű rendszerekbe való önszerveződésének lehetőségeit eddig még nem vizsgálták. Elméleti számítógépes vizsgálatokkal kezdve, majd kísérletileg megvalósítva, megvizsgáltuk a 3-szubsztituált xantinok- tetramer illetve oktamerképző sajátságait.

A QUILD program keretein belül, számítógépes molekulamodellezési és sűrűségfunkcionál-elmélet számításokat (DFT) végeztünk a 3-metilxantinra, a 3-szubsztituált xantinok családjának egyik legegyszerűbb képviselőjére. A kialakult tetrádok közül a központi fémion nélküli tetrád szerkezet is stabilnak bizonyult gázfázisban, valamint a különböző kationok hasonló hatást gyakoroltak a kialakult szerkezetekre, mint a guanin tetrádok esetében; nevezetesen a nátriumionok igyekeztek a kialakult tetrád síkjában maradni, viszont a kálium- és ammóniumionok a tetrád síkján kívül helyezkedtek el. A Na⁺ ion jelenlétében kialakuló oktád szerkezet volt a leginkább sík alkatú szerkezet, valamint a központi fémionok nélküli szerkezet volt a leghajlottabb. Minden esetben az oktád szerkezetekben lévő (3MX)₄ komplex bizonyult a leginkább sík alkatúnak. Az oktád szerkezetet kialakító két réteg között közel középen helyezkedtek el a kationok, és minden aggregátum esetén a kialakuló két réteg közötti elfordulás szöge megközelítőleg 17°. Megjegyzendő, hogy két (3MX)₄ egység között kialakuló tapadó kötési energia -47,0 kcal/mol, ami erősebb kölcsönhatásnak bizonyult, mint a megfelelő tapadó kötési energia a 9-metilguanin egységekből kialakuló oktamer klaszter szerkezet (9MG)8 esetében (-35,4 kcal/mol). A tetrád és oktád szerkezetek esetében kapott elméleti eredmények késztettek a (3MX)₄ és (3MX)₈ szerkezetek kísérleti vizsgálatára a megfelelő kationok jelenlétében illetve kationok nélkül.

Az elméleti számítások következtetéseit alapul véve, 3-metilxantint állítottunk elő (lásd 3.2.3. fejezet), majd a magasabb rendű szerkezetek kialakulásának a vizsgálatára nano-ESI-MS tömegspektroszkópiás és oldatfázisú NMR módszereket használtunk.

A 3MX egységekből a magasabb rendű tetrád szerkezetek kialakulását kísérletileg először tömegspektroszkópiás eljárással, egy nano-ESI ionforrással ellátott Q-TOF tömegspektométer segítségével vizsgáltuk. Annak ellenére, hogy csak NH₄⁺ ionokat tartalmazó vizes-metanolos rendszerben dolgoztunk az NH4-adduktumok detektálása céljából, a tömegspektrumban megjelenő legintezívebb csúcsszéria tartalmazott Na⁺ adduktumokat is, valószínűleg a használt boroszilikát kapilláris felületén bekövetkezett ioncsere miatt (lásd 3.2.4. fejezet, 41.ábra). Az így kapott eredmények tökéletesen megegyeznek az elméleti számolások eredményeivel, amelyek szerint a Na⁺ ionok kötődtek a legerősebben a kialakult tetrád szerkezethez. Érdekes módon a csúcsintenzitások növekedését figyeltük meg a kialakult adduktumok $[3MX+Na]^+$, $[(3MX)_2+Na]^+$, $[(3MX)_3+Na]^+$ és $[(3MX)_4+Na]^+$ sorozatában, ellentétben a "hagyományos" esettel, amikor nincs tetrádképződés. Továbbá, а tömegspektrumban a [(3MX)₄+Na]⁺ csúcs fölött egy magasabb tömegtartományban a következő legintenzívebb csúcssorozat, a [(3MX)₈+kation]⁺ adduktumokhoz tartozik, ami a négy 3MX egységből kialakuló tetrád megnövekedett stabilitását tükrözi. Az 1012 és 1041 közötti m/z tartományban, nagyon kis intenzitású jelek (1-4%) figyelhetőek meg, amelyek a $[(3MX)_{12}+2Na]^+$, $[(3MX)_{12}+Na+K]^+$ és $[(3MX)_6+NH_4]^+$ adduktumokhoz tartoznak (lehetséges még $[(3MX)_6+Na]^+$ és $[(3MX)_6+K]^+$ klaszterek kialakulása is, 3.2.4. fejezet, 42. ábra).

Teljes körű ¹H, ¹³C, ¹⁵N NMR-spektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk a 3MX esetében, deuterált dimetil-szulfoxidban (DMSO-d₆, 300 K) standard HMBC technika alkalmazásával. Az így kapott adatok alátámasztják a 3MX tautomer formáit (lásd 3.2.5. fejezet, 43. ábra). A tömegspektroszkópiás vizsgálatok eredményeként kapott adatok megerősítéseként (3MX)_n × kation⁺ aggregátumok (n = 4, 8; kation⁺ = NH₄⁺, Na⁺, K⁺), néhány további NMR-spektroszkópiás vizsgálatra került sor. Diffúziós NMR-spektroszkópiás (DOSY) módszert alkalmaztunk az oldatban keletkezett aggregátumok molekulatömegeinek az azonosítására, amelyhez referenciaként tetrametilszilánt használtunk. Deuterált dimetil-szulfoxid oldatban, 300 K-en dolgozva, a (3MX)₄ aggregátumra jellemző 667 Da molekulatömeg helyett 920 Da molekulatömeget azonosítottunk. Az elméleti és gyakorlati (mért) értékek között különbség, valószínűleg a kialakult 3MX klaszterek és az alkalmazott oldószer aggregációjának tulajdoníthatóan. Abban az esetben, amikor 0,4 ekv. kálium-pikrátot adtunk a rendszerhez, az azonosított molekulatömeg növekedését tapasztaltuk 1130 Da-ra. Tovább növelve a hozzáadott kálium-pikrát mennyiségét 1,04 ekv.-re, a molekulatömeg 1300 Da-ra emelkedett. Ezekkel ellentétben, megnövelve a hőmérsékletet 315 K-re, az azonosított molekulatömeg csökkent 710 Da-ra. Megemlítendő, hogy a diffúziós NMR-spektroszkópiás technika alkalmazásakor 10-15% hiba jelentkezhet, amelyet többszöri mérésekkel igazoltunk. Egyéb oldószerek (víz, dimetilformamid, metanol, kloroform) alkalmazása esetén a 3MX oldhatósága minimálisra csökkent, továbbá nem tapasztaltunk asszociációra jellemző molekulatömegeket híg vizes-dimetilszulfoxid $[(\varepsilon = 78,4 \text{ (víz)}, \varepsilon = 46,45 \text{ (DMSO)}]$ alkalmazása esetén sem. A kialakult intramolekuláris hidrogén kötések azonosítása céljából, deuterálási izotópeltolódást mértünk az akceptor karbonil részeken, viszont a molekulán belül "versengő" intramolekuláris kötések miatt ez nem volt szignifikáns. Az NH protonok kémiai eltolódásának a hőmérsékletfüggését vizsgálva megállapítottuk, hogy a kapott értékek a hidrogénkötésekre jellemző értékektől nem különböztek lényegesen (N7H = -4,5 ppb/K, N1H = -6,1 ppb/K). További egydimenziós NOESY vizsgálatokat végezve, jelentős mágnesezettség-transzfert észleltünk az N7H és a vízmolekulák között, ami viszont az N1H esetében elhanyagolható volt. Következtetésképpen azt feltételeztük, hogy a kialakuló (3MX)₄ szerkezetekben a "belső" hidrogénkötéseknek (N1H…O6) erősebbnek kell lenniük, mint a "külső" (N7H…O2) hidrogénkötéseknek. Ez a feltételezés összhangban van a gázfázisban elvégzett elméleti vizsgálatok eredményeivel, amelyek szerint a kialakuló "belső" hidrogénkötések minden esetben rövidebbek a "külső" hidrogénkötéseknél (lásd 3.2.2. fejezet, 2. táblázat).

A homonukleáris NOE-nak köszönhetően az elvégzett egydimenziós NOESY kísérletek során csak egy kisebb NOE kölcsönhatás figyelhető meg az N1H és N3CH₃ csoportok között, valamint egy nagyobb, intramolekuláris kölcsönhatás az N7H és a C8H atomok között. Stacionárius fázisú ¹³C {¹H} heteronukleáris NOE-t alkalmazva, 14% és 44%-os heteronukleáris NOE kölcsönhatást észleltünk a C6 és C2 atomok között, abban az esetben, ha az N1H telített volt, viszont ezek az atomok nem mutattak "aktivitást" az N7H és C-5 kölcsönhatásakor, ebben az esetben a két kötés heteronukleáris NOE interakciója 17%-al növekedett. További ¹⁵N, ¹³C HMBC módszerek alkalmazásával nem tapasztaltunk csatolásokat az intermolekuláris hidrogénkötések között.

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a DOSY NMR-spektroszkópiás módszer segítségével igazolni lehetett a $(3MX)_4 \times kat^+$ és a lehetséges $(3MX)_8 \times kat^+$ (kat⁺ = K⁺, kation nélkül) klaszter szerkezeteket deuterált dimetil-szulfoxid felhasználásával. Ahhoz, hogy növelni tudjuk a kölcsönhatásokat a 3-metilxantinból kialakuló önszerveződő tetrád/kvadruplex szerkezetekben, a xantin 3-as helyzetében lévő metil szubsztituens helyett más szubsztituensek jelenlétét is vizsgálnunk kell. Az említett vizsgálatok kivitelezése céljából, 3-szubsztituált xantin tartalmú DNS és PNS monomereket állítottunk elő (lásd 3.2.6., 3.2.7. fejezetek), majd megkezdtük az elkészült monomerek beépítését oligomerekbe, illetve ezek MS és NMR vizsgálatát magasabb rendű, önszerveződő rendszerek kialakulásának igazolása céljából. Az elkészült 3-szubsztituált xantintartalmú DNS oligomerek szilárd fázisú szintézise és analitikai vizsgálatai jelenleg folyamatban vannak.

6. Summary

Higher-ordered structures, based on self-recognition and self-assembly of simpler molecules, are of potential interest in a variety of fields ranging from structural biology, to medicinal chemistry, supramolecular chemistry, nanotechnology and molecular-scale devices. The guanine (G) base present in nucleic acids is well known for its ability to participate in the formation of tetrads and quadruplex structures, as well as more complex motifs, owing to its multiple hydrogen bonding pattern, stacking and ion-binding capacity. Since the discovery of the G tetrad, several other quadruplex structures have been reported, based on experimental results or theoretical considerations. These new structures cover a wide range of changes from small modification in the guanine base to the complete substitution of the whole monomeric building block. It was also shown that in most of the cases cations play a stabilizing role in the formation of quadruplex strands by intercalating into the stacking tetrads. In these situations, quadruplex structures were always neutral, and according to our knowledge an intercalating anion has been reported only in one case. Charged quadruplexes can be important not just because of the intercalation of ions but they also provide new possibilities in the design of novel higher ordered structures (e.g. nano-wires). It was also pointed out that the G quartet is one of the most suitable structures for stacking since guanine quartets are strongly bound (there are two H-bonds between neighbouring molecules) and already posses a planar equilibrium structure. Other purine-based tetramers (e.g. adenine or inosine) have also been investigated, however these structures have been found less stable and they tend to adopt non-planar geometries. This non-planarity is understandable since the nucleobases in these tetramers are connected to each other by only one H-bond which yields a flexible structure. In the present thesis, we point out that if one takes xanthine instead of hypoxanthine (which was used previously to model inosine nucleoside), two H-bonds can be formed between neighbouring xanthines by low-barrier hydrogen bond (LBHB). Moreover, naturally occurring uric acid can be also involved in tetramer formation with or without xanthine.

Consequently, the system will have an additional positive charge and this provides a very strong interaction. Herein, based on theoretical considerations we propose new quartet systems possessing positive or zero charge, which are composed of xanthine (9-methylxanthine) and uric acid derivatives. According to our expectation, these systems are capable to bind anions

naturally. Moreover, since the monomers in the tetrad are connected through two H-bonds, they can form strongly bonded, planar structures. To our knowledge, this is the first example of a quartet in which the positive charge is supported by the tetramer structure itself, and not by an additional intercalating ion. This opens new possibilities in the design of novel nanostructures.

In this thesis, we propose 3-substituted xanthines as potential tetrad and quadruplex forming purine derivatives. The dominant 7*H* tautomeric form of a 3-substituted xanthine can bind to each neighboring xanthine moiety with two H-bonds in a tetrad, similarly to guanine. Therefore, we have anticipated that these assemblies should yield strong interactions and a planar geometry in gas phase. As the simplest model, 3-methylxanthine (3MX) was chosen for our computational and experimental studies (Chapter 3.2.1, Scheme 38) with or without additional cation. However, the properties of 3-substituted xanthine derivatives in tetrads/quadruplexes have not been investigated so far. We examine herewith the tetrad and octad forming capacity of a 3-substituted xanthine starting from theoretical studies prior to experimental realization and detection.

First, computational investigations have been performed for 3MX, as the simplest representative of the family of 3-substituted xanthines, at BLYP-D/TZ2P level of dispersioncorrected Density Functional Theory with ADF and QUILD programs. The optimized tetrad structures have been found to be bent even in the ion-free case but cations show similar behavior to guanine tetrads. Namely, sodium ion tends to stay in the plane of the tetrad while potassium and ammonium ions occupy an out-of-plane position. Regarding the octads, the most planar structure was found with the sodium ion, and the structure without any intercalating ion has the most bent optimum. In all cases the (3MX)₄ complex turned to be more planar in the octad structure. Cations have been found close to the midpoint between the layers and the rotation of the two layers in octads is ca. 17° in each aggregate. The distances between the layers have also been found to be very similar in each complex, thus neither the metallic ions nor the NH₄⁺ affect the optimum stacking distance. Note that the pure stacking bond energy between two (3MX)₄ tetrads is -47.0 kcal/mol. This is stronger than the corresponding stacking energy of the octameric 9-metylguanine cluster (9MG)₈ (-35.4 kcal/mol). Together with the theoretical results for tetrads, this prompted us to investigate the existence of (3MX)₄ and (3MX)₈ structures with or without intercalating cations experimentally.

Following the theoretical considerations, 3MX has been synthesized (Chapter 3.2.3.) and the formation of higher-ordered structures has been investigated in gas (nano-ESI-MS) and solution phase (NMR). The tetrad formation of 3MX was first examined experimentally by mass spectrometry using a Q-TOF instrument equipped with a nano-ESI ion source. Although only NH_4^+ was intentionally added as an adduct forming ion in aq. methanol, the most intense peak series in the mass spectrum contains Na⁺, possibly due to an ion-exchange on the surface of the borosilicate capillary (Chapter 3.2.4., Scheme 41). This is in good accordance with the calculations, where the sodium ion is bound most strongly to the tetrad. Interestingly, the peak intensities increased along the series of adduct ions of $[3MX+Na]^+$, $[(3MX)_2+Na]^+$, $[(3MX)_3+Na]^+$, and $[(3MX)_4+Na]^+$, in contrast to the "normal" case for compounds not forming tetrads. Furthermore, beyond the $[(3MX)_4+Na]^+$ peak, the next most intense peak series in the upper mass region belongs to the $[(3MX)_8+cat]^+$ peaks suggesting an increased stability of the tetrad constructed by four 3MX molecules. In the region m/z 1012-1041 signals with very low intensity (1-4%) could also be observed that correspond to $[(3MX)_{12}+2Na]^{2+}$ and $[(3MX)_{12}+Na+K]^{2+}$ beyond the $[(3MX)_6+NH_4]^+$, (potentially $[(3MX)_6+Na]^+$) and $[(3MX)_6+K]^+$ clusters (Chapter 3.2.4., Scheme 42).

Full ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR assignment of 3MX has been accomplished using standard HMBC techniques in DMSO-d₆ solution at 300 K. These data support the tautomeric form as shown in Chapter 3.2.5. (Scheme 43). Since the MS study suggests $(3MX)_n \cdot at^+$ aggregates (n = 4, 8; cat⁺ = NH₄⁺, Na⁺, K⁺), several additional NMR experiments were carried out to disclose these features. Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) was used to determine the apparent molecular mass of the aggregates in solution. As an internal mass reference, tetramethylsilane was used because of its inertness and spherical structure. As apparent MW, 920 Da was obtained in DMSO-d₆ solution at 300 K. For a $(3MX)_4$ aggregate MW = 664 Da is expected and the difference between the experimental and theoretical values may be attributed to solvent molecules associated to the clusters of 3MX. When 0.4 equiv. of potassium picrate was added to the solution, the apparent MW increased to 1130 Da. Further increasing the potassium picrate concentration to 1.04 equiv. did increase the apparent MW up to 1300 Da. To the contrary, increasing the temperature to 315 K decreased the apparent MW as it was estimated from repeated experiments. In other solvents (water, DMF, methanol, chloroform) the solubility was generally

poor. We did not observe association e.g. in dilute water-DMSO solution [$\varepsilon = 78.4$ (water), $\varepsilon =$ 46.45 (DMSO)]. To observe the intermolecular H-bonding in the self-assemblies we measured the deuteration isotope shifts on the acceptor carbonyls but this was not indicative because of the concurrent two- and three-bond intramolecular effects. Similarly, NH proton chemical shift temperature dependences were not well above the accepted limits for H-bonding (N7H = -4.5ppb/K, N1H = -6.1 ppb/K). In selective transient 1D NOESY experiments we observed significant magnetization transfer between N7H and water due to exchange while in the case of N1H this transfer was negligible. Consequently, we suppose that the "internal" H-bonds (N1H---6) in the (3MX)₄ structures must be stronger than the "external" H-bonds (N7H---O2). This was also the case for the gas phase theoretical results according to which the "internal" H-bonds have always been shorter than the "external" ones (Chapter 3.2.2., Scheme 2). Concerning the homonuclear NOEs from the same 1D NOESY experiments, only a small NOE is seen between N1H and the N3CH₃ group, and a stronger intramolecular effect between N7H and C8H can be observed. Using steady state ${}^{13}C{}^{1}H$ heteronuclear NOE, we observed 14% and 44% heteronuclear NOE at C6 and C2, respectively, when N1H was saturated, while these carbons were "silent" when N7H was irradiated though at C-5 the two-bond hetero NOE yielded 17% enhancement. Furthermore, no couplings via intermolecular H-bonds were detected in either ¹⁵N or ¹³C HMBC experiments.

In summary, the DOSY experiments seem to support the presence of $(3MX)_4 \cdot cat^+$ and possibly of $(3MX)_8 \cdot cat^+$ (cat⁺ = none or K⁺) clusters in DMSO-d₆ solution. Our gas-phase computational studies suggest that 3MX is a good candidate for tetrad and quadruplex structures. 3MX has been synthesized and the existence of $(3MX)_4 \cdot cat^+$ and $(3MX)_8 \cdot cat^+$ (cat⁺ = NH₄⁺, Na⁺, K⁺) aggregates in the gas phase has been indeed observed (MS). Detailed NMR studies have also verified that the ,,internal" H-bonds (N1H···O6) in the $(3MX)_4$ structures must be stronger than the ,,external" H-bonds (N7H···O2). Clearly, to achieve stronger interactions in tetrads/quadruplexes composed of 3-substituted xanthines, substituents in position 3 other than methyl should be present to allow for further stabilization. To examine the predicted stronger interactions, our aims was the preparation and examination (MS, NMR) of 3-substituted xanthine containing DNA and PNA monomers (Chapters 3.2.6., 3.2.7.) and their oligomers. The preparation of 3-substituted xanthine containing DNA oligomers are in progress.

7. Irodalomjegyzék

- 1 M. Hollósi, I. Laczkó, B. Asbóth, *Biomolekuláris kémia*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2005, pp. 101-216.
- 2 L. Kovács, Z. Kupihár, G. Tóth and J. Wölfling, *Természetes vegyületek kémiája*, JATEPress, Szeged, 2011.
- 3 J. T. Davis, Angew. Chem., Int. Edit. Engl., 2004, 43, 668-698.
- 4 W. Guschlbauer, J. F. Chantot and D. Thiele, J. Biomol. Struct. Dyn., 1990, 8, 491-511.
- 5 D. E. Gilbert and J. Feigon, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999, **9**, 305-314.
- 6 J. Suhnel, *Biopolymers*, 2001, **61**, 32-51.
- 7 M. A. Keniry, *Biopolymers*, 2000, **56**, 123-146.
- 8 C. C. Hardin, A. G. Perry and K. White, *Biopolymers*, 2000, 56, 147-194.
- 9 R. H. Shafer and I. Smirnov, *Biopolymers*, 2000, **56**, 209-227.
- 10 T. Simonsson, *Biol. Chem.*, 2001, **382**, 621-628.
- 11 H. Arthanari and P. H. Bolton, *Chem. Biol.*, 2001, **8**, 221-230.
- 12 L. M. Greig and D. Philp, *Chem. Soc. Rev.*, 2001, **30**, 287-302.
- 13 V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo and J. F. Stoddart, *Angew. Chem., Int. Edit. Engl.*, 2000, **39**, 3349-3391.
- 14 S. L. Forman, J. C. Fettinger, S. Pieraccini, G. Gottareli and J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 4060-4067.
- 15 F. W. Kotch, J. C. Fettinger and J. T. Davis, Org. Lett., 2000, 2, 3277-3280.
- 16 X. D. Shi, J. C. Fettinger and J. T. Davis, J. Am. Chem. Soc., 2001, **123**, 6738-6739.
- 17 X. Shi, J. C. Fettinger and J. T. Davis, *Angew. Chem., Int. Edit. Engl.*, 2001, **40**, 2827-2831.
- 18 A. Wong, J. C. Fettinger, S. L. Forman, J. T. Davis and G. Wu, J. Am. Chem. Soc., 2002, **124**, 742-743.

- 19 A. Calzolari, R. Di Felice, E. Molinari and A. Garbesi, *Physica E*, 2002, **13**, 1236-1239.
- 20 T. J. Pinnavaia, H. T. Miles and E. D. Becker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 7198-7200.
- 21 T. J. Pinnavaia, C. L. Marshall, C. M. Mettler, C. I. Fisk, H. T. Miles and E. D. Becker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 3625-3627.
- 22 J. L. Sessler, M. Sathiosatham, K. Doerr, V. Lynch and K. A. Abboud, *Angew. Chem., Int. Edit. Engl.*, 2000, **39**, 1300-1303.
- 23 K. J. Koch, T. Aggerholm, S. C. Nanita and R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.*, 2002, **37**, 676-686.
- 24 T. Aggerholm, S. C. Nanita, K. J. Koch and R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.*, 2003, **38**, 87-97.
- 25 M. P. Horvath and S. C. Schultz, J. Mol. Biol., 2001, 310, 367-377.
- 26 S. Haider, G. N. Parkinson and S. Neidle, J. Mol. Biol., 2002, 320, 189-200.
- 27 J. M. Lehn, *Science*, 2002, **295**, 2400-2403.
- 28 P. Mariani, C. Mazabard, A. Garbesi and G. P. Spada, J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 6369-6373.
- 29 S. Bonazzi, M. Capobianco, M. M. Demorais, A. Garbesi, G. Gottarelli, P. Mariani, M. G. P. Bossi, G. P. Spada and L. Tondelli, J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 5809-5816.
- 30 G. Gottarelli, G. Proni, G. P. Spada, S. Bonazzi, A. Garbesi, F. Ciuchi and P. Mariani, *Biopolymers*, 1997, **42**, 561-574.
- 31 Y. Wang and D. J. Patel, *Biochem.*, 1992, **31**, 8112-8119.
- 32 F. Aboulela, A. I. H. Murchie and D. M. J. Lilley, *Nature*, 1992, **360**, 280-282.
- 33 J. Gu, J. Leszczynski and M. Bansal, Chem. Phys. Lett., 1999, 311, 209-214.
- 34 N. Spackova, I. Berger and J. Sponer, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 5519-5534.
- 35 D. Sen and W. Gilbert, *Nature*, 1990, **344**, 410-414.

- 36 P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.
- 37 B. Datta, C. Schmitt and B. A. Armitage, J. Am. Chem. Soc., 2003, **125**, 4111-4118.
- 38 F. Seela, Y. M. Chen and C. Mittelbach, *Helv. Chim. Acta*, 1998, **81**, 570-583.
- 39 H. Liu, A. Matsugami, M. Katahira and S. Uesugi, J. Mol. Biol., 2002, 322, 955-970.
- 40 M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999, **9**, 324-329.
- 41 Y. F. Li and D. Sen, *Biochem.*, 1997, **36**, 5589-5599.
- 42 D. Y. Sun, B. Thompson, B. E. Cathers, M. Salazar, S. M. Kerwin, J. O. Trent, T. C. Jenkins, S. Neidle and L. H. Hurley, *J. Med. Chem.*, 1997, **40**, 2113-2116.
- 43 E. Gavathiotis, R. A. Heald, M. F. G. Stevens and M. S. Searle, *Angew. Chem.*, *Int. Edit. Engl.*, 2001, **40**, 4749-+.
- 44 C. M. Niemeyer, Angew. Chem., Int. Edit. Engl., 2001, 40, 4128-4158.
- 45 C. M. Niemeyer and M. Adler, *Angew. Chem., Int. Edit. Engl.*, 2002, **41**, 3779-3783.
- 46 V. Sidorov, F. W. Kotch, M. El-Khouedi and J. T. Davis, *Chem. Commun.*, 2000, 2369-2370.
- 47 K. G. Zulak, D. K. Liscome, H. Ashihara and P. J. Facchini, in *Plant secondary metabolites: occurrence structure, and role in the human diet*, A. Crozier, M. N. Clifford and H. Ashihara, eds., Blackwell, Oxford, 2006, pp. 102-136.
- 48 H. Ashihara and A. Crozier, *Adv. Bot. Res.*, 1999, **30**, 118-205.
- 49 H. Ashihara and A. Crozier, J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 3425-3431.
- 50 H. Ashihara and T. Suzuki, Front. Biosci., 2004, 9, 1864-1876.
- 51 B. H. Schulthess, P. Morath and T. W. Baumann, *Phytochemistry*, 1996, **41**, 169-175.
- 52 H. Ashihara, *Phytochemistry*, 1993, **33**, 1427-1430.
- 53 Y. Koyama, Y. Tomoda, M. Kato and H. Ashihara, *Plant Physiol. Biochem.*, 2003, **41**, 977-984.

- 54 N. Yoneyama, H. Morimoto, C. X. Ye, H. Ashihara, K. Mizuno and M. Kato, *Mol. Genet. Genom.*, 2006, **275**, 125-135.
- 55 K. Mizuno, A. Okuda, M. Kato, N. Yoneyama, H. Tanaka, H. Ashihara and T. Fujimura, *FEBS Lett.*, 2003, **534**, 75-81.
- 56 H. Uefuji, S. Ogita, Y. Yamaguchi, N. Koizumi and H. Sano, *Plant Physiol.*, 2003, **132**, 372-380.
- 57 A. A. McCarthy and J. G. McCarthy, *Plant Physiol.*, 2007, **144**, 879-889.
- 58 H. Ashihara, M. Kato and Y. Chuang-Xing, J. Plant Res., 1998, 111, 599-604.
- 59 C. A. Keya, A. Crozier and H. Ashihara, *FEBS Lett.*, 2003, **554**, 473-477.
- 60 C. Koshiishi, A. Kato, S. Yama, A. Crozier and H. Ashihara, *FEBS Lett.*, 2001, **499**, 50-54.
- 61 O. Negishi, T. Ozawa and H. Imagawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994, **58**, 1277-1281.
- 62 C. Stasolla, R. Katahira, T. A. Thorpe and H. Ashihara, *J. Plant Physiol.*, 2003, **160**, 1271-1295.
- R. Zrenner, M. Stitt, U. Sonnewald and R. Boldt, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006, 57, 805-836.
- 64 P. Kalberer, *Nature*, 1965, **205**, 597-598.
- 65 T. Suzuki and G. R. Waller, J. Sci. Food Agric., 1984, 35, 66-70.
- 66 H. Ashihara, A. M. Monteiro, T. Moritz, F. M. Gillies and A. Crozier, *Planta*, 1996, **198**, 334-339.
- H. Ashihara, F. M. Gillies and A. Crozier, *Plant Cell Physiol.*, 1997, **38**, 413-419.
- 68 A. P. Vitoria and P. Mazzafera, *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 1998, **33**, 1957-1961.
- 69 Caffeine metabolism. KEGG map 00232, http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/0232.html, 2009.
- E. Ito, A. Crozier and H. Ashihara, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1336**, 323-330.

- 71 J. W. Steed and J. L. Atwood, *Supramolecular chemistry*, John Wiley and Sons, Chichester, 2000.
- 72 C. Fonseca Guerra, T. van der Wijst, J. Poater, M. Swart and F. M. Bickelhaupt, *Theor. Chem. Acc.*, 2010, **125**, 245-252.
- 73 B. C. Pan, K. Shi and M. Sundaralingam, J. Mol. Biol., 2006, 363, 451-459.
- 74 F. C. Meng and X. Zhao, J. Mol. Struct. (Theochem), 2008, 869, 94-97.
- 75 W. Pfleiderer and G. Nübel, *Liebigs Ann. Chem.*, 1961, **647**, 155-160.
- 76 S. Gogia, A. Jain and M. Puranik, J. Phys. Chem. B, 2009, 113, 15101-15118.
- 77 W. Pfleiderer, *Liebigs Ann. Chem.*, 1974, 2030-2045.
- 78 D. Gningue and J.-J. Aaron, *Talanta*, 1985, **32**, 183-187.
- 79 E. Kulikowska, B. Kierdaszuk and D. Shugar, *Acta Biochim. Polon.*, 2004, **51**, 493-531.
- 80 R. C. Smith, J. Z. Gore, M. McKee and H. Hargis, *Microchem. J.*, 1988, **38**, 118-124.
- 81 J. T. Davis and G. P. Spada, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 296-313.
- 82 S. Lena, S. Masiero, S. Pieraccini and G. P. Spada, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 7792-7806.
- 83 M. Franceschin, Eur. J. Org. Chem., 2009, 2225-2238.
- B. C. Pan, Y. Xiong, K. Shi, J. P. Deng and M. Sundaralingam, *Structure*, 2003, 11, 815-823.
- 85 T. van der Wijst, B. Lippert, M. Swart, C. Fonseca Guerra and F. M. Bickelhaupt, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2010, **15**, 387-397.
- 86 S. Mezzache, S. Alves, J. P. Paumard, C. Pepe and J. C. Tabet, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, **21**, 1075-1082.
- 87 F. W. Smith and J. Feigon, *Biochem.*, 1993, **32**, 8682-8692.
- 88 F. W. Smith, P. Schultze and J. Feigon, *Structure*, 1995, **3**, 997-1008.
- 89 C. J. Cheong and P. B. Moore, *Biochem.*, 1992, **31**, 8406-8414.

- 90 E. L. Zins, S. Rochut and C. Pepe, J. Mass Spectrom., 2009, 44, 813-820.
- 91 E. L. Zins, S. Rochut and C. Pepe, J. Mass Spectrom., 2009, 44, 40-49.
- 92 P. K. Patel and R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 2457-2464.
- 93 P. K. Patel, N. S. Bhavesh and R. V. Hosur, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **270**, 967-971.
- 94 J. Sponer and N. Spacková, *Methods*, 2007, **43**, 278-290.
- 95 J. D. Gu and J. Leszczynski, Chem. Phys. Lett., 2002, 351, 403-409.
- 96 J. Song, K. U. Park, H. D. Park, Y. Yoon and J. Q. Kim, *Clin. Chem.*, 2004, **50**, 2176-2179.
- 97 B. S. Lindsay, A. M. P. Almeida, C. J. Smith, R. G. S. Berlinck, R. M. da Rocha and C. M. Ireland, *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**, 1573-1575.
- 98 K. Lafleur, D. Z. Huang, T. Zhou, A. Caflisch and C. Nevado, J. Med. Chem., 2009, **52**, 6433-6446.
- 99 M. Swart and F. M. Bickelhaupt, Int. J. Quantum Chem., 2006, 106, 2536-2544.
- 100 M. Swart and F. M. Bickelhaupt, J. Comp. Chem., 2008, 29, 724-734.
- 101 P. K. Bridson, G. Richmond and F. Yeh, Synth. Commun., 1990, 20, 2459-2467.
- 102 M. N. S. Rad, A. Khalafi-Nezhad, S. Behrouz, M. A. Faghihi, A. Zare and A. Parhami, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 1778-1785.
- 103 M. N. S. Rad, A. Khalafi-Nezhad, S. Behrouz, Z. Asrari, M. Behrouz and Z. Amini, *Synthesis*, 2009, 3067-3076.
- 104 J. H. Lister, Aust. J. Chem., 1979, 32, 387-397.
- 105 C. S. Johnson, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 1999, 34, 203-256.
- 106 D. H. Wu, A. D. Chen and C. S. Johnson, J. Magn. Reson., Ser. A, 1995, 115, 260-264.
- 107 G. A. Morris and H. Barjat, in Methods for structure elucidation by highresolution NMR, G. Batta, K. E. Kövér and C. Szántay Jr., eds., Elsevier, Amsterdam, 1997, pp. 209-226.

- 108 K. E. Kövér and G. Batta, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1987, **19**, 223-266.
- H. B. Seba, P. Thureau, B. Ancian and A. Thevand, *Magn. Reson. Chem.*, 2006, 44, 1109-1117.
- 110 G. Kovács, Z. Timár, Z. Kupihár, Z. Kele and L. Kovács, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2002, 1266-1270.
- 111 C. C. Bhat, in *Synthetic procedures in nucleic acid chemistry*, W. W. Zorbach and R. S. Tipson, eds., John Wiley and Sons, New York, 1968, Vol. 1, pp. 521-522.
- 112 S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe and S. A. Noble, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 6179-6194.
- 113 L. Kosynkina, W. Wang and T. C. Liang, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 5173-5176.
- 114 P. J. Finn, N. J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton and T. Brown, *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 3357-3363.
- 115 Y. Wu and J. C. Xu, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 8107-8113.
8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki Dr. Kovács Lajos tudományos főmunkatársnak, témavezetőmnek a kifogástalan szakmai irányításáért. Köszönöm, hogy beavatott a szerves kémiával és laboratóriumi munkákkal kapcsolatos fontos tudnivalókba, és önállóságot biztosított munkám során.

Köszönettel tartozom Dr. Kupihár Zoltánnak aki nélkülözhetetlen szakmai tanácsaival, támogatásával alapvetően hozzájárult a szakmai fejlődésemhez és munkámhoz.

Hálával tartozom az Orvosi Vegytani Intézet munkatársainak, akikhez bármikor fordulhattam a munkám során felvetődő gondjaimmal, kérdéseimmel.

Köszönettel tartozom Dr. Paragi Gábornak az elméleti számítogépes vizsgálatok elvégzéséért, Dr. Pádár Petrának az NMR spektrumok felvételéért és a hatékony kiértékelésért valamint Dr. Kele Zoltánnak a tömegspektometriai mérések elvégzéséért.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek az áldozatvállalást, megértést és támogatást, amelyet tanulmányaim során nyújtott.