Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Modyfikowane nukleotydy - obiecujące narzędzie diagnostyczne

Kwasy nukleinowe są zbudowane z nukleotydów. Odpowiadają one za przechowywanie informacji genetycznej organizmu, a także pośredniczą w produkcji białek. Dzięki poznaniu struktury kwasów nukleinowych oraz zrozumieniu ich udziału w cyklu życiowym komórki, dały możliwość pojawienia się nowych strategii diagnostycznych, a także określenia uwarunkowań molekularnych dość znacznej ilości chorób genetycznych. Zdobyta wiedza odnośnie mechanizmów powstawania schorzeń mających podłoże genetyczne pozwala na zaprojektowanie leków, które będą zapobiegać rozwojowi tych chorób [1].

Alternatywną metodą leczenia jest terapia antysensowa polegająca na użyciu krótkich fragmentów DNA lub RNA w celu wyciszenia ekspresji genów powodujących choroby. Rolą tej strategii jest wykorzystanie specjalnie zaprojektowanych oligonukleotydów do zablokowania biologicznych funkcji cząsteczek mRNA, które są odpowiedzialne za powstanie danego schorzenia. Wyróżnia się trzy zasadnicze rodzaje strategii w terapii antysensowej: wykorzystanie rybozymów w celu specyficznej hydrolizy wiązań w docelowej cząsteczce RNA, zastosowanie cząsteczek siRNA indukujących degradację mRNA oraz zastosowanie jednoniciowych, antysensowych oligonukleotydów. W wymienionych podejściach terapeutycznych narzędziem jest oligonukleotyd, który w odróżnieniu od tradycyjnych leków, bezpośrednio oddziałuje na cząsteczkę mRNA [1].

Strategia ta w swoim zastosowaniu ma pewne ograniczenia. Dotyczą one docelowej cząsteczki mRNA, która musi posiadać dostępne oraz dobrze poznane miejsca oddziaływania z oligonukleotydem. Poza tym oligonukleotydy powinny być dobrze rozpuszczalne w wodzie, odporne na działanie nukleaz komórkowych oraz wykazywać niską toksyczność. Oprócz tego muszą być one łatwo dostarczane do miejsca oddziaływania z docelową cząsteczką RNA, a także cechować się wysoką trwałością termodynamiczną oddziaływania z danym fragmentem cząsteczki mRNA. Ograniczenia te przyczyniły się do poszukiwania modyfikacji, których wprowadzenie do oligonukleotydów, spowodowałoby zmiany ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych [2].

Modyfikowane oligonukleotydy ze względu na swe unikalne właściwości stanowią cenne narzędzie terapeutyczne, a także diagnostyczne. Przyczynia się do tego przede wszystkim ich zdolność do zwiększania trwałości termodynamicznej dupleksów, a także selektywność wykazywana w czasie hybrydyzacji. Jest bardzo ważne, żeby przy wprowadzonej modyfikacji nie zmniejszyć możliwości hybrydyzacyjnych oligonukleotydu [2].

Modyfikowane nukleotydy

Nukleotydy posiadają złożoną budowę chemiczną co sprzyja dużym możliwościom wprowadzenia modyfikacji. Zmiana struktury chemicznej oligonukleotydów może odnosić się do wiązania internukleotydowego, zasady heterocyklicznej lub jednostki cukrowej [3].

Zwiększenie bądź zmniejszenie trwałości termodynamicznej dupleksu, w którego skład wchodzi modyfikowany oligonukleotyd jest możliwe w zależności od miejsca wprowadzenia modyfikacji oraz jej charakteru. Czynnikami decydującymi o trwałości termodynamicznej dupleksów są głównie wiązania wodorowe, efekty steryczne i elektrostatyczne, oddziaływania warstwowe, stężenie soli, pH roztworu, a także solwatacje. Wiązania wodorowe i oddziaływania warstwowe są czynnikami stabilizującymi dupleksy, w czasie gdy oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dwoma ujemnie naładowanymi łańcuchami kwasów nukleinowych zmniejszają trwałość termodynamiczną. W trakcie powstawania dupleksu dochodzi do tworzenia się oddziaływania warstwowego i wiązania wodorowego, co pozytywnie wpływa na entalpię tego procesu. Jednak proces taki jest niekorzystny entropowo. Tak więc suma entropii oraz entalpii procesu hybrydyzacji decyduje o powstaniu dupleksu [3].

Za pośrednictwem wiązań wodorowych łączą się zasady heterocykliczne. Oddziaływania te sprzyjają zapobieganiu dysocjacji łańcuchów kwasów nukleinowych i odpowiadają za specyficzność procesu hybrydyzacji. W sytuacji parowania się zasad typu Watsona-Cricka, adenozyna oddziałuje z urydyną bądź tymidyną zawsze poprzez dwa wiązania, a guanozyna z cytydyną oddziałuje poprzez trzy wiązania wodorowe. Sądzi się, że jedno wiązanie wodorowe zmienia trwałość termodynamiczną dupleksu o -0,7 do -1,6 kcal/mol lub o -0,25 kcal/mol, jako wkład w energię swobodną pojedynczego wiązania wodorowego, która może być zmienna [3].

Oddziaływania warstwowe także zwiększają trwałość termodynamiczną dupleksów. W porównaniu z wiązaniami wodorowymi mogą one mieć większy wkład w energię swobodną dupleksu. Pomiędzy pierścieniami aromatycznymi zasad heterocyklicznych oddziaływania warstwowe stabilizowane są przez siły Van der Waalsa. Na ich siłę mają wpływ również efekty elektrostatyczne, a także solwatacja. Zakłada się, że z uwagi na większą powierzchnię pierścienia aromatycznego i większą polaryzowalność, puryny oddziałują ze sobą silniej niż pirymidyny. Ustalono też, że oddziaływania warstwowe mają więcej niż połowę wartości wkładu pojedynczej pary zasad w energię swobodną dupleksu [3].

Otoczenie dupleksu również ma istotny wpływ na trwałość termodynamiczną. Jako przykład można podać obecność w roztworze jonów metali jednowartościowych, które stabilizują dupleksy. Powodem tego jest zobojętnianie ładunku ujemnego wiązania internukleotydowego przez te jony. Ze wzrostem stężenia jonów jednowartościowych, rośnie również temperatura topnienia dupleksu. W przypadku gdy stężenie jonów przekroczy wartość około 1 M dostrzega się destabilizację. Jest ona spowodowana solwatacją zasad heterocyklicznych przez aniony, które pochodzą z soli. Oddziaływania te kierują do przeminięcia równowagi konformacyjnej dupleksu w stronę pojedynczych nici [3].

Trwałość termodynamiczna dupleksów mających zakres pH 5-9 jest właściwie stała. W niższych wartościach pH roztworu następuje protonacja cytozyny i adeniny, natomiast w wyższych deprotonacja guaniny, uracylu i tyminy. Przez takie zmiany zachodzą zaburzenia parowania się zasad, co powoduje przesuwanie równowagi konformacyjnej dupleksu w kierunku jednoniciowej formy [3]. Modyfikacje części zasadowej nukleozydu Modyfikacje zasady heterocyklicznej nukleozydu mogą opierać się na wprowadzeniu do niej dodatkowych grup funkcyjnych, bądź zamianie istniejącej grupy na inną. Mogą też polegać one na całkowitym zastąpieniu pierścienia zasady innym związkiem [3,4].

Modyfikacje nukleotydów pirymidynowych

Możliwą modyfikacją pirymidyn jest wprowadzenie dodatkowej grupy w pozycję 5 bądź zlikwidowanie istniejącej, na przykład tymidyny. W podstawnikach alkilowych znajdujących się w pozycji 5 pierścienia pirymidyn zaobserwowano, że wraz ze zwiększaniem się długości łańcucha

nasila się trwałość termodynamiczna dupleksów DNA. Długość łańcucha jest ograniczona i dla grup dłuższych niż nheksylowa znacząco zaczyna spadać trwałość termodynamiczna dupleksów [3,4].

Najbardziej stabilizującą spośród modyfikacji wprowadzanych w pozycję 5 pierścienia pirymidynowego jest prawdopodobnie grupa propynylowa –C=C-CH3, której obecność wpływa na wzrost trwałości termodynamicznej dupleksów. Grupa ta jest zasobna w elektrony i występuje w dużej bruździe, gdzie oddziałuje z atomami pierścienia i sąsiednimi nukleozasadami. Poza tym grupa 5-propynylowa w łańcuchu DNA formuje niewielki rowek z wiązaniem fosforanodiestrowym. W wyniku odpowiedniego ułożenia przestrzennego możliwe jest jej oddziaływanie z resztą fosforanu z udziałem cząsteczki wody. W rezultacie trwałość całego dupleksu zwiększa dodatkowa hydratacja. Zwiększenie oddziaływań warstwowych pomiędzy modyfikowaną pirymidyną a sąsiednimi zasadami heterocyklicznymi powoduje, że grupy 5-propynylowe mają stabilizujący charakter. Przyczyną tego jest wielkość chmury elektronowej 5-propynylowanej zasady, przez co silniejsze są oddziaływania warstwowe [3,4].

Następnym rodzajem modyfikacji nukleozydów pirymidynowych jest zastąpienie atomów tlenu O2 w tymidynie, cytydynie i urydynie, a także 04 w tymidynie i urydynie innymi atomami bądź grupami funkcyjnymi. Zastąpienie atomu 02 urydyny atomem siarki przyczynia się między innymi do zwiększenia trwałości termodynamicznej tworzonych dupleksów bez względu od pozycji 2-tiourydyny w dupleksach RNA/RNA i 2'-0-metylo-RNA/RNA. Podobnie dzieje się w przypadku dupleksów DNA/DNA i 2-tiotymidyny. Wzrost oddziaływań warstwowych powoduje obecność bardziej polaryzowalnego od tlenu, atomu siarki. Jego mniejsza elektrofilowość wywiera wpływ na zwiększanie się kwasowości iminowego protonu, który związany jest z atomem N3. Wskazuje to na wzrost siły wiązania wodorowego tworzonego z udziałem atomu N3 [5].

Atom siarki w pozycji 2 urydyny oddziałuje z atomem N1 sąsiadującego nukleozydu. Ma on możliwość powiększania częściowego ładunku ujemnego na grupie karbonylowej. Wówczas wiązanie wodorowe tworzone z udziałem tej grupy staje się silniejsze. Poza tym 2-tiourydyna przedkłada konformację cukru C3'-endo, typowego dla formy A RNA. Zmiana konformacji zachodzi także na przyległych nukleotydach od strony 3' modyfikacji, w wyniku czego cała struktura dupleksu ma zwiększone usztywnienie [5]. Podstawienie pozycji 04 i 02 pirymidyn innymi atomami niż atomu siarki wpływa na znaczący spadek trwałości termodynamicznej dupleksów. Obecność na przykład atomu węgła uniemożliwia tworzenie wiązań wodorowych w tym miejscu [5].

- **Modyfikacje nukleotydów purynowych**

W modyfikacjach puryn najbardziej stabilizujące są 7-halogeno-7-deaza oraz 7-propynylo-7-deaza. Obecność 7-podstawionych 7-deazapuryn może mieć wpływ na zwiększanie trwałości termodynamicznej tworzonych dupleksów DNA. Wyniki otrzymane z modelowania molekularnego wykazują, że grupa funkcyjna obecna w pozycji 7 takich związków znajduje się w dupleksie. Jest to miejsce zbliżone jak grupa propynylowa w deoksyurydynie oraz deoksycytydynie w heterodupleksie RNA/DNA [3,6].

Następnym rodzajem modyfikacji jest zmiana położenia jednego z endocyklicznych atomów azotu pierścienia purynowego. Przykładem takim jest 8-aza-7-deazaadenozyna z wiązaniem glikozydowym pomiędzy atomami N8 zasady heterocyklicznej a C1' deoksyrybozy. Po wprowadzeniu do dupleksu DNA przyczynia się do spadku jego trwałości termodynamicznej. Interesujący jest fakt, że związek ten z podobną energią oddziałuje z czteroma głównymi nukleotydami, z tego powodu jest zaliczany do tzw. uniwersalnych nukleotydów. Podczas parowania się 8-aza-7-deazaadenozyny z każdą

z czterech naturalnie występujących zasad, różnica trwałości termodynamicznej dupleksów nie wynosi więcej niż 0,7 kcal/mol. Udowodniono, że ten analog deoksyadenozyny może tworzyć z zasadami standardowe jak i odwrócone pary Watsona-Cricka, a także układy par zasad Hoogsteena, co powoduje, że nie ma dyskryminacji jednych zasad w stosunku do innych [7].

- **Analogi zasad heterocyklicznych**

W zasadach heterocyklicznych i części cukrowej oprócz punktowego wprowadzania miejscowych modyfikacji można również zastosować całkiem inne związki, które w niedużym stopniu przypominają naturalne nukleotydy. Takim przykładem mogą być interkalacyjne kwasy nukleinowe (INA), gdzie odpowiadającą nukleotydowi jednostkę tworzy (1-pirenylometylo)glicerol, włączający się do naturalnej nici DNA lub RNA. Ustalono, że obecność takiej modyfikacji, tworzącej pojedyncze wybrzuszenie w środkowej pozycji dupleksu DNA, w widoczny sposób wpływa na zwiększenie jego trwałości termodynamicznej. Jednak w czasie hybrydyzacji do nici RNA zaobserwowano niezbyt dużą destabilizację. Fakt ten powoduje, że INA jest jedną z niewielu modyfikacji, dyskryminujących RNA od DNA. Poza tym w dupleksie DNA obecność IPN jako niesparowanego końca powoduje zwiększenie temperatury topnienia o 10,9^{o}C. Poprzez interkalację części pirenowej z helisą DNA, IPN zwiększa trwałość tworzonych dupleksów przedkładając interkalację z pierścieniem puryn z uwagi na ich większy pierścień aromatyczny [3,8].

Modyfikacje dotyczące części cukrowej nukleozydu

Część cukrowa nukleotydów jest najczęściej modyfikowana przez wprowadzenie atomu albo dodatkowej grupy funkcyjnej w jedną z możliwych pozycji pentafuranozy bądź zastąpienia innym układem cyklicznym pięcioczłonowego pierścienia [3].

- **Modyfikacje pierścienia cukrowego w pozycji 2’**

Wywołany obecnością dodatkowego podstawnika w szkielecie cukru efekt termodynamiczny jest zależny przede wszystkim od jego właściwości, do których zaliczyć można wielkość, elektroujemność, a także umiejscowienie w cząsteczce. Dupleks RNA/DNA lub RNA w pozycji 2’pierścienia rybozy posiada grupę hydroksylową, umiejscowioną w małej bruździe. Przypuszcza się, że podstawniki w tej pozycji mogą mieć możliwość oddziaływania ze szkieletem fosforanocukrowym, a także ze znajdującymi się na powierzchni dupleksu częściami zasad heterocyklicznych [2,3].

Poprzez wprowadzenie atomu fluoru uzyskuje się w pozycji 2' pierścienia cukru jedną z najsilniejszych stabilizacji dupleksów DNA, RNA i DNA/RNA. Wzrost trwałości termodynamicznej dla dupleksów DNA przez wprowadzenie jednej takiej modyfikacji waha się w granicach 1-2,5°C. W przypadku podstawnika 2'-0-alkilowego obserwuje się zbliżony efekt, z tą różnicą, że wraz ze wzrostem długości łańcucha maleją jego właściwości stabilizacyjne. Uważa się, że grupy 2'-0-alkilowe, dłuższe od propylu, destabilizują dupleks. Podstawniki w wymienionych przypadkach poprzez wykazanie wysokiej elektroujemności przesuwają równowagę konformacyjną rybozy w kierunku formy C3'-endo, typowej dla struktury A-RNA. Oprócz tego mogą one przyjąć rolę akceptora w tworzeniu wiązań wodorowych, stabilizując oddziaływania dupleksu z cząsteczkami wody. Biorąc pod uwagę destabilizację związaną z obecnością większego podstawnika 2'-0-alkilowego możliwe jest spowodowanie jej przez pojawienie się zawady przestrzennej. Z tym z kolei związane są zniszczenia warstwy hydratacyjnej w mniejszej bruździe bądź też niekorzystne

oddziaływanie z innymi częściami dupleksu. Skutki tego prowadzą do zmniejszenia trwałości termodynamicznej dupleksu. Jednym z przykładów podstawnika 2'-0-alkilowego jest grupa 2'-0-propylowa, zwiększająca trwałość termodynamiczną dupleksu DNA o 1,8°C, a dupleksu DNA/RNA o 3,1°C. W stosunku do niemodyfikowanego dupleksu podstawnik znajdujący się w pozycji 2' pierścienia cukru może przyczyniać się do zmiany entalpii bądź entropii. Ten przypadek świadczy, że podwyższona trwałość termodynamiczna jest spowodowana efektem entropowym, to znaczy głównie zmianą konformacji cząsteczki, a także jej oddziaływaniem z rozpuszczalnikiem oraz jonami znajdującymi się w roztworze [3,9].

Wprowadzenie drugiego atomu tlenu do podstawników 2’-O-alkilowych również działa stabilizująco, co ma związek z występowaniem motywu glikolu etylenowego. Podstawnik składający się z czterech takich jednostek, pomimo istotnego wzrostu długości, w dalszym ciągu wykazuje właściwości stabilizacyjne. Podstawnik typu 2’-O-(CH2)-O-CH3 zwiększa trwałość dupleksu gdy n = 2, jednak ma mały wpływ gdy n = 1 lub 3. Działanie takie związane jest z efektem gauche, gdzie drugi atom tlenu glikolu etylenowego wpływa na konformację łańcucha bocznego zgodną z utworzeniem dupleksu. Jako przykładu można tu podać grupę 2'-0-metoksyetylową (-CH2-CH2-O-CH3), która wywiera wpływ na wzrost trwałości dupleksów DNA, a także DNA/RNA odpowiednio o 2°C i 4°C. Elektroujemny podstawnik przesuwa równowagę konformacyjną cukru w kierunku C3’-endo, typowej dla formy A-RNA. Poza tym obecność w małej bruździe modyfikacji stabilizuje strukturę poprzez powiększenie hydratacji całego szkieletu [9].

Grupa aminowa jest również jednym z rodzajów modyfikacji nukleotydów w pozycji 2’. Dupleksy RNA, jak i DNA w tej grupie są destabilizowane odpowiednio o 4,3°C i > 8°C. Stwierdzono, że tak modyfikowane nukleotydy istnieją w konformacji C2’-endo, typowej dla helisy DNA, co wyjaśnia destabilizujący wpływ na dupleksy RNA. Nie tłumaczy to jednak powodów zmniejszenia trwałości termodynamicznej dupleksów DNA [9].

- **Modyfikacje pierścienia cukrowego w pozycji 3' i 4'**

Do destabilizacji dupleksów w większości przypadków prowadzi wprowadzenie podstawnika w pozycję 3'-β. Trwałość dupleksów zmniejszana jest przez grupy 3’-β-metylową, a także 3'P-alkilową odpowiednio o 0,1-1,5°C i 1-4°C. W przypadku wprowadzenia tych grup do dupleksów zaobserwowany efekt przypisuje się przyjmowaniu przez nukleotydy konformacji cukru C2'-endo a także nieodpowiednim oddziaływaniom przestrzennym. Istotny wpływ na zwiększenie destabilizacji dupleksu ma dodatkowe wprowadzenie w pozycję 2' modyfikowanego nukleotydu grupy metoksylowej, co jest sprzeczne ze znanymi właściwościami stabilizacyjnymi tej grupy. Prawdopodobnie konformacja C2'-endo części cukrowej modyfikowanego nukleotydu robi się mało korzystna energetycznie po wprowadzeniu grupy 2'-0-Me, mającej skłonność do przesuwania równowagi konformacyjnej cukru w kierunku C3'-endo [3,10].

Nukleotydy, w których atom tlenu w pozycji 4' pierścienia rybozy zastępuje się atomem siarki bądź węgla przyjmują konformację podobną do występującej w DNA. Modyfikacje te posiadają zwykle mały wpływ na zmianę trwałości dupleksu, nawet wtedy gdy do atomu węgla w pozycji α dodane są grupy takie jak hydroksylowa, metylowa, bądź hydroksymetylowa. Dodanie 4'-tiocytydyny do dupleksów DNA/RNA bądź RNA/RNA przyczynia się do wzrostu trwałości termodynamicznej o 1-2,5°C. Modyfikowana nić 4’-tio-RNA wykazuje zwiększone właściwości stabilizacyjne podczas wiązania się z łańcuchem RNA aniżeli DNA. Ustalono, że w tej modyfikacji pierścień cukru jest obecny w konformacji C3'-endo. Jej obecność w dupleksie wywołuje tylko minimalne, miejscowe zmiany w geometrii całej cząsteczki, które wynikają z większych wymiarów atomu siarki porównując z atomem tlenu. Przypuszcza się, że wzrost trwałości termodynamicznej wynika z korzystnej entalpii

tworzenia dupleksu. W trwałości modyfikowanych dupleksów różnica może wynikać z powodu utrudnionej hydratacji dupleksu 4’-tio-RNA/DNA względem 4’-tio-RNA/RNA [3,11].

- **Analogi rybozy oraz deoksyrybozy**

Ryboza zastąpiona sześcioczłonowym pierścieniem 2',3'-dideoksy-1',5'-anhydro -D-arabinoheksitolu, osiąga wzrost trwałości termodynamicznej dupleksów. Pierwszymi modyfikacjami mieszczącymi sześcioczłonowy pierścień są kwasy nukleinowe typu HNA. Wiążą się one selektywnie i silnie z komplementarnym łańcuchem RNA. Stabilizacja struktury całkowicie zmodyfikowanego dupleksu HNA/RNA stanowi około 3°C na modyfikację, jednak zależnie od zmian w sekwencji wartość tu mieści się w granicach 0,9-5,8°C [3,12].

W szeregu HNA/HNA > HNA/RNA > HNA/DNA trwałość termodynamiczna dupleksów ulega zmniejszeniu. Nukleotydy HNA wskutek zasady przestrzennej, wywołanej obecnością atomów tlenu w modyfikowanym pierścieniu, posiadają zasadę heterocykliczną w konformacji aksjalnej. Skutkuje to zwiększeniem siły oddziaływań warstwowych zasad heterocyklicznych, w następstwie czego dochodzi do usztywnienia struktury całego dupleksu. Poza tym sześcioczłonowy pierścień znajduje się w konformacji C3'-endo, typowej dla dupleksów w formie A, co oznacza wyższą trwałość termodynamiczną dupleksów HNA/RNA od HNA/DNA [3,12].

Kwasy nukleinowe posiadające usztywnioną konformację pierścienia rybozy - LNA należą do najsilniej stabilizujących modyfikacji jakie dotychczas poznano. Posiadają one pomiędzy atomami O2' i C4’ pierścienia rybozy dodatkowy mostek metylenowy. Pojedyńcza modyfikacja LNA wpływa na zwiększenie trwałości termodynamicznej dupleksów o około 3-11°C. Jednak większy efekt stabilizacyjny dostrzegany jest w czasie hybrydyzacji z nicią RNA aniżeli z nicią DNA. Ustalono również addytywność efektów stabilizacyjnych, które są spowodowane przez wprowadzenie więcej niż jednej modyfikacji. Przypadający na pojedynczą modyfikację największy wzrost trwałości dupleksu można zaobserwować, gdy pojedyncza nić ma mniej niż 50% monomerów LNA. Zjawisko to określa się jako nasycenie struktury. Efekt stabilizacyjny zależy również od położenia i rodzaju nukleotydów LNA w cząsteczce, sąsiedztwa, a także od długości oligonukleotydów. Sadzi się, że wprowadzanie modyfikacji typu LNA najbardziej wpływa na trwałość termodynamiczną dupleksów, które składają się maksymalnie z dekamerów. Zakłada się też, że LNA-pirymidyny w większym stopniu stabilizują strukturę aniżeli LNA-puryny, zgodnie z szeregiem C>T>G>A. Usztywnienie pierścienia rybozy w konformacji C3'-endo powoduje obecność mostka metylenowego, co prowadzi do tworzenia się pozytywnych zmian w entropii bądź entalpii podczas tworzeniu dupleksów z RNA oraz DNA [3,12].

Analogicznie w zmodyfikowanych dupleksach, jak w ich naturalnych odpowiednikach, wciąż istnieją pary zasad typu Watsona-Cricka, prawoskrętna konformacja helisy, nukleozasady przyjmują konformację anti oraz zachodzą oddziaływania warstwowe. Na podstawie przeprowadzonych badań NMR dupleksu DNA/RNA wykazano, że wprowadzenie nukleotydu LNA do łańcucha DNA powoduje przesunięcie geometrii łańcucha DNA w stronę formy A. Ten miejscowy efekt powoduje przejście konformacyjne części cukrowej C2'-endo → C3'-endo tylko nukleotydu sąsiadującego z modyfikacją od strony 3’. Powodem takiego przekształcenia może być między innymi próba uniknięcia zawady przestrzennej, jaka powstaje wskutek ukierunkowania mostka metylenowego. Znajduje się on w małej bruździe, w kierunku przyległego od strony 3' nukleotydu. LNA obecne w dupleksie może również zmieniać gęstość elektronową na krawędzi małej bruzdy wskutek wymuszenia zmian konformacyjnych sąsiedniego nukleotydu. Prawdopodobnie innym czynnikiem może być także powstawanie z udziałem cząsteczek wody wiązań wodorowych pomiędzy atomami 02' modyfikacji a 04' sąsiedniego nukleotydu. Wpływa to na stabilizację części cukrowej tego ostatniego

w konformacji C8'-endo. Poza tym następuje zwiększanie siły oddziaływań warstwowych zasad heterocyklicznych poprzez wymuszenie przejścia konformacyjnego C2'-endo → C3'-endo. Wszystkie to zmiany mogą mieć wpływ na podwyższenie trwałości termodynamicznej dupleksów LNA [3,12].

Modyfikacje dotyczące wiązania internukleotydowego

Odpychanie się łańcuchów, będących w składzie dupleksów, spowodowane obecnością ujemnie naładowanych reszt fosforanodiestrowych, w warunkach fizjologicznych wywiera negatywny wkład w energię swobodną hybrydyzacji. Przypuszcza się więc, że usunięcie ładunku ujemnego przyczyni się do wzrostu trwałości takiego dupleksu. Większość modyfikacji odnośnie wiązania internukleotydowego, pomimo usunięcia ładunku ujemnego, ma działanie destabilizujące, co sprawia wrażenie niezgodności ze wspomnianym założeniem. Sprzeczność ta jest jednak zwodnicza ponieważ na trwałość dupleksu ma wpływ wiele czynników, na przykład elastyczność szkieletu i zmiany jego struktury. Przeważnie te czynniki wpływają na ogólną trwałość termo-dynamiczną dupleksów zawierających modyfikacje dotyczące wiązania internukleotydowego [2,3].

- **Pochodne wiązania internukleotydowego**

W kwasach nukleinowych rozpowszechnione jest występowanie wiązania internukleotydowego, które znajduje się między atomami 3' jednego nukleotydu a 5' sąsiedniego. Na zmniejszenie ich trwałości termodynamicznej wpływa obecność w dupleksach DNA i RNA wiązania 2'-5'. Obecność pojedynczej grupy fosforanodiestrowej, wiążącej nukleotydy w pozycjach 2'-5' w dupleksach DNA bądź RNA przyczynia się do zmniejszenia trwałości odpowiednio o 0,5-1,2°C i 0,5-0,7°C. Ustalono, że taka modyfikacja generuje występowanie konformacji C2’-endo w 2’-5' RNA i C3'-endo w 2'-5' DNA, co stanowi odwrotność konformacji ogólnie występujących w naturalnych dupleksach posiadających wiązanie internukleotydowe 3'-5'. Poza tym w modyfikowanych dupleksach udowodniono zmniejszenie siły oddziaływań warstwowych [3,13].

Znaną modyfikacją jest zastąpienie jednego z atomów tlenu grupy fosforanodiestrowej bezpośrednio związanego z częścią cukrową, innym atomem bądź grupą chemiczną. Do przykładów takich modyfikacji zaliczamy N3' → P5' amidofosforany (pnDNA albo pnRNA). Stanowią one trwałe dupleksy z RNA, jak i z DNA, a także pomiędzy sobą. Zasady tu łączą się w pary typu Watsona-Cricka lub Hoogsteena. N3' → P5' amidofosforany mają jednakowy ładunek jak fosforany i nie są chiralne. Trwałość termodynamiczna dupleksów pnDNA/RNA, pnDNA/DNA, i pnDNA/pnDNA wzrasta odpowiednio o 0,5-0,7°C, 1,7-2,7°C i 2,1-2,3°C przeliczając na parę zasad. Dupleksy pnDNA/DNA oraz pnDNA/RNA posiadają temperaturę topnienia wyższą od wzorcowej o 2,3-2,60C w przeliczeniu na jedno wiązanie. Wywołany obecnością N3' → P5' amidofosforanów efekt stabilizacyjny nie jest zależny od sekwencji dupleksu [3,14].

- **Inne łączniki pełniące funkcję wiązania fosforanodiestrowego**

Jednym z rodzajów modyfikacji jest zastąpienie wiązania fosforodiestrowego wiązaniem amidowym w łączniku -CH2-CO-NH-CH2-. Ta pojedyncza zmiana wpływa na wzrost trwałości termodynamicznej dupleksu DNA/RNA o 1,5°C. Prawdopodobnie wiąże się to z pozytywnym wzrostem entalpii wiązania, a także niepolarnym i elektrostatycznym charakterem oddziaływań między dwoma uzupełniającymi się łańcuchami dupleksu. Udowodniono też, że 2'-deoksyryboza w momencie połączenia się z modyfikacją w pozycji 3' ma konformację C3'-endo. Mając stosowną liczbę wprowadzonych

modyfikacji może zmieniać geometrię oligodeoksyrybonukleotydu z formy B w stronę formy A. Uważa się, że obecność amidowego łącznika w oligonukleotydzie DNA przyczynia się do korzystnych dla hybrydyzacji z RNA zmian strukturalnych. Modyfikowana nić może też przyjmować różne konformacje, dające możliwość uniknięcia zbędnych naprężeń, a także zawady przestrzennej przy zgodnie z przyjętymi normami parowaniu się zasad. Zauważono też nieduże zmniejszenie siły oddziaływań warstwowych związanych z obecnością modyfikacji i większą elastyczność modyfikowanego łańcucha DNA [3,15].

Popularnymi modyfikacjami dotyczącymi zarówno wiązania internukleotydowego, jak i pierścienia cukrowego są peptydowe kwasy nukleinowe - PNA. Oligonukleotydy PNA posiadają poliamidowy szkielet, który zbudowany jest z jednostek N-(2-aminoetylo)glicynowych. Poprzez łącznik metylokarbonylowy, zasada heterocykliczna jest połączona ze szkieletem. Takie modyfikowane oligomery budują trwałe termodynamicznie dupleksy z DNA, RNA a także ze sobą o orientacji równoległej bądź antyrównoległej. W tych dupleksach zasady heterocykliczne parują się ze sobą na podstawie oddziaływań typu Watsona- Cricka. Obecność obojętnego szkieletu modyfikacji w odniesieniu do ujemnie naładowanego wiązania internukleotydowego, związana jest ze wzrostem trwałości termodynamicznej dupleksów PNA/DNA bądź PNA/RNA. Reasumując, trwałość termodynamiczna dupleksów wzrasta w szeregu DNA/DNA < RNA/DNA < PNA/DNA < PNA/RNA < PNA/PNA. Charakterystyczną cechą PNA jest strukturalne dostosowanie się do konformacji komplementarnej nici RNA lub DNA. Dupleks PNA/DNA o orientacji równoległej posiada strukturę zgodną z formą E, a dupleks PNA/DNA o orientacji antyrównoległej ma strukturę pośrednią pomiędzy formą A i B. Dupleks PNA/RNA posiada formę A. Natomiast dupleks PNA/PNA przyjmuje strukturę w formie P, która jest zbliżona do pośredniej pomiędzy formą A i B. Oligomer mimo braku pierścienia cukrowego w PNA, wciąż posiada ograniczenia strukturalne oraz konformacyjne, co jest prawdopodobnie spowodowane słabymi oddziaływaniami pomiędzy atomami szkieletu [16].

Podsumowanie

Niewątpliwie większość poznanych obecnie modyfikacji znacznie obniża trwałość termodynamiczną dupleksów. Omawiane przykłady świadczą, że do zwiększania trwałości termodynamicznej dupleksów przyczyniają się również właściwości modyfikowanych nukleotydów. Szczególnie należy tu wymienić:

- zwiększanie liczby wiązań wodorowych w parze A—U;
- zwiększanie siły oddziaływań warstwowych poprzez obecność polaryzowalnych grup w pierścieniu zasad heterocyklicznych;
- zwiększenie stopnia solwatacji dupleksu;
- przekształcanie konformacji szkieletu fosforocukrowego w preferowaną przy tworzeniu dupleksu;
- brak zawady przestrzennej spowodowanej wprowadzeniem dodatkowych grup funkcyjnych;
- zobojętnianie ładunku ujemnego szkieletu fosforocukrowego.

Wiązania wodorowe są głównymi czynnikami korzystnie wpływającymi na energię swobodną dupleksu. Na stabilizację dupleksów istotny wpływ mają również oddziaływania warstwowe. Wobec powyższego, modyfikacje, które wprowadzają dodatkowe wiązania wodorowe bądź zwiększają siłę oddziaływań warstwowych powinny zwiększać trwałość termodynamiczną dupleksów. Zatem modyfikowane nukleotydy mające większą powierzchnię pierścienia aromatycznego względem kanonicznych zasad heterocyklicznych lub w części zasadowej zawierające dodatkowe grupy bądź atomy będące donorami oraz akceptorami wiązań wodorowych, wywierają zwykle korzystny wpływ

na stabilność termodynamiczną dupleksów.

Modyfikacje przesuwające równowagę konformacyjną szkieletu fosforanocukrowego pojedynczego oligonukleotydu w stronę preferowaną podczas hybrydyzacji powodują zbliżony efekt. Modyfikacje te wpływają na zwiększanie liczby cząsteczek w korzystnej podczas hybrydyzacji konformacji. Zmniejszają zarazem populacje tych, które istnieją w konformacji nie dającej możliwości tworzenia dupleksu. Przykładem może być modyfikacja szkieletu fosforanocukrowego, wpływająca na zwiększanie jego sztywności. W wielu przypadkach destabilizuje ona dupleks, co ma związek z negatywną dla procesu hybrydyzacji konformacją całej struktury. Jednakże, częściowe usztywnienie szkieletu fosforanocukrowego upraszcza przekształcenie konformacji pojedynczego oligonukleotydu w preferowaną w czasie tworzenia dupleksu. W przypadku tym usunięty jest niekorzystny efekt entropowy jaki występuje podczas powyższego procesu. Do tworzenia dupleksu wzrasta również powinowactwo pojedynczej nici.

Istotnym czynnikiem jest też oddziaływanie wody z cząsteczką dupleksu. Przypuszcza się, że modyfikacje wpływające na zwiększenie stopnia hydratacji będą pozytywnie oddziaływać na trwałość termodynamiczną dupleksów.

Większość efektów termodynamicznych wywołanych obecnością w dupleksie modyfikowanych nukleotydów posiada zbliżone źródła pochodzenia, trzeba jednak pamiętać, że za każdym razem taki efekt jest złożony i zależy od wielu czynników. Nie jesteśmy w stanie domyślić się konsekwencji wprowadzenia danej modyfikacji do dupleksów. Dlatego koniecznie każdą modyfikację traktować należy jako odmienny przypadek, który będzie wymagał przeprowadzenia serii szczegółowych i solidnie wykonanych doświadczeń.

Autor: Katarzyna Czuba

Literatura:

1. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications, Europ. J. Biochem. 2003. 270, 1628-1644.
2. Freier S.M., Altman K.H. The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA: RNA duplexes. Nucleic Acids Res. 1997. 25, 4429-4443.
3. Pasternak A., Kierzek R. Modyfikowane nukleotydy jako narzędzia molekularne służące do kontrolowanej zmiany właściwości fizykochemicznych RNA i DNA. Na pograniczu chemii i biologii. 2007. Tom XVIII, 41-87.
4. Gyi J.I., Gao D., Conn G.L., Trent J.O., Brown T., Lane A.N. The solution structure of a DNA: RNA duplex containing 5-propynyl U and C; comparison with 5-Me modifications. Nucleic Acids Res. 2003. 31, 2683-2693.
5. Testa S.M., Disney M.D., Turner D.H., Kierzek R. Thermodynamics of RNA-RNA duplexes with 2 or 4-thiouridines: Implications for antisense design and targeting a group I intron. Biochemistry. 1999. 38, 16655-16662
6. Seela P., Horst T. Duplex stabilization of DNA: oligonucleotides containing 7-substituted 7-deazaadenines. Helv. Chim. Acta. 1995. 78, 94-108.
7. Seela F., Debelak H. 8-aza-7-deazaadenine and 7-deazaguanine: synthesis and properties of nucleosides and oligonucleotides with nucleobases linked at position-8. Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids. 2001. 20, 577-585.

8. Nielsen C.B., Petersen M., Pedersen E.B., Hansen P.E., Christensen U.B. NMR structure determination of a modified DNA oligonucleotide containing a new intercalating nucleic acid. Bioconjugate Chem. 2004. 15, 260-269.
9. Sabahi A., Guidry J., Inamati G.B., Manoharan M., Wittung-Stafshede P. Hybridization of 2'-ribose modified mixed-sequence oligonucleotides: thermodynamic and kinetic studies. Nucleic Acids Res. 2001. 29, 2163-2170.
10. Schmit C., Bevierre M.O., De Mesmaeker A., Altman K.H. The effect of 2’- and 3'-alkyl substituents on oligonucleotide hybridization and stability. Bioorg, Med. Chem. Lett. 1994. 4, 1969-1974.
11. Haeberli P., Berger I., Pallan P.S., Egli M. Syntheses of 4'-tchioribonucleosides and thermodynamic stability and crystal structure of RNA oligomers with incorporated 4'-thiocytosine. Nucleic Acids Res. 2005. 33, 3965-3975.
12. Kvaerna L., Wengel J. Antisense molecules and furanose conformations-is it really that simple? Chem. Commun. 2001. 1419-1424.
13. Kandimalla E.R., Manning A., Zhao Q., Shaw D.R., Byrn R.A., Sasisekharan V.J Agrawal S. Mixed backbone anbisense oligonucleotides: design, biochemical and biological properties of oligonucleotides containing 2'-5'-ribo- and 3'-5'-deoxyribo-nucleotide segments. Nucleic Acids Res. 1997. 25, 370-378.
14. Schultz R.G., Gryaznov S.M. Oligo-2'-fluoro-2'deoxynucleotide N3' □ P5' phosphoramidates: synthesis and properties. Nucleic Acids Res. 1996. 24, 2966-2973.
15. Nina M., Fonne-Pfister R., Beaudegnies R., Chekatt H., Jung P.M.J., Murphy-Kossabi F., De Mesmaeker A., Wendeborn S. Recognition of RNA by amide modified backbone nucleic acids: Molecular dynamics simulations of DNA-RNA hybrids in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc. 2005. 127, 6027-6038.
16. Nielsen P.E. Structural and biological properties of peptide nucleic acid (PNA). Pure & Applied Chemistry. 1998. 70, 105-110.
17. http://www.biogeo.uw.edu.pl/nukleotyd/component/content/frontpage

https://laboratoria.net/artykul/19032.html
Informacje dnia: Ile kraje OECD wydają na służbę zdrowia? Fundacją Orlen dla polskich studentów za granicą Bocian Biały „Zwierzęciem Roku 2025” Ubóstwo nie musi nasilać problemów ze zdrowiem psychicznym wśród dzieci Skala wyzwań związanych z imigracją w Polsce jest wyolbrzymiona Najintensywniejszy letni rój spadających gwiazd już aktywny Ile kraje OECD wydają na służbę zdrowia? Fundacją Orlen dla polskich studentów za granicą Bocian Biały „Zwierzęciem Roku 2025” Ubóstwo nie musi nasilać problemów ze zdrowiem psychicznym wśród dzieci Skala wyzwań związanych z imigracją w Polsce jest wyolbrzymiona Najintensywniejszy letni rój spadających gwiazd już aktywny Ile kraje OECD wydają na służbę zdrowia? Fundacją Orlen dla polskich studentów za granicą Bocian Biały „Zwierzęciem Roku 2025” Ubóstwo nie musi nasilać problemów ze zdrowiem psychicznym wśród dzieci Skala wyzwań związanych z imigracją w Polsce jest wyolbrzymiona Najintensywniejszy letni rój spadających gwiazd już aktywny

Partnerzy