



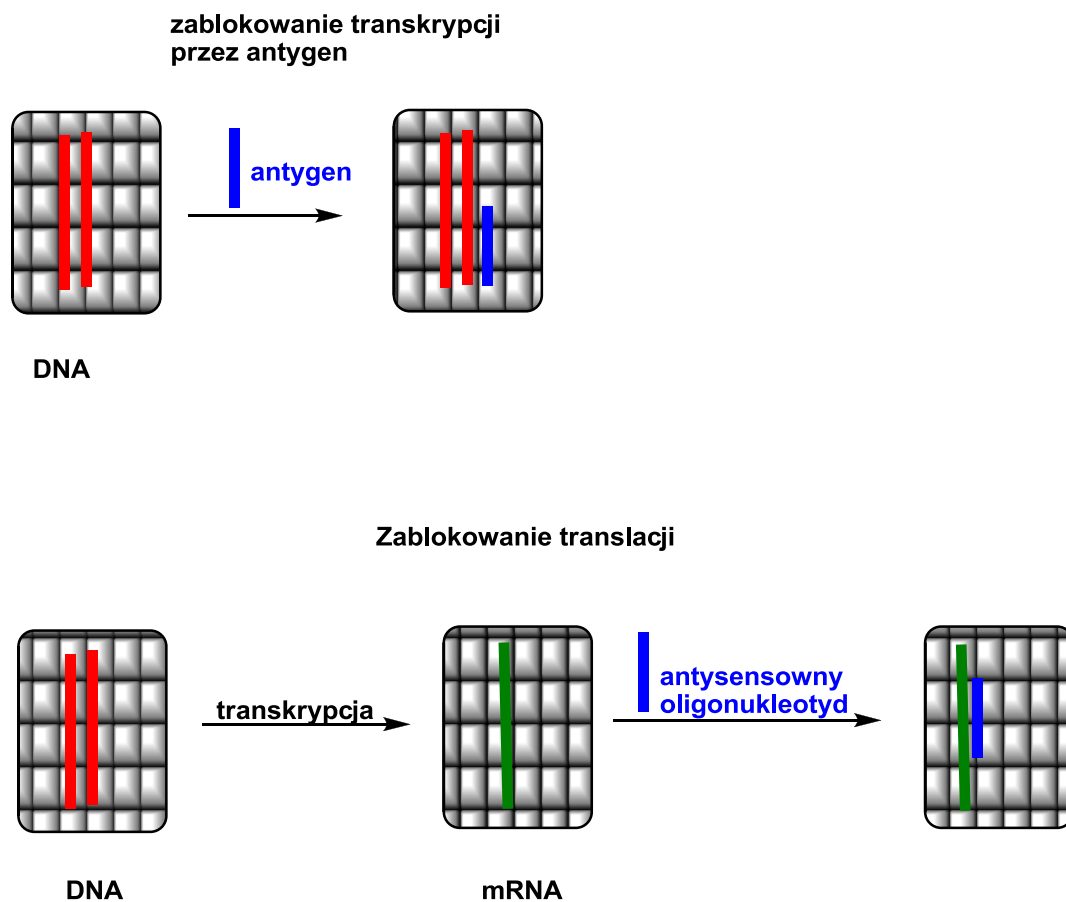
Peptydowe kwasy nukleinowe (PNA)

Normalny przekaz informacji genetycznej w komórce następuje według ogólnie przyjętego schematu: informacja zawarta w DNA jest przepisywana na informacyjne RNA (proces transkrypcji) a następnie tłumaczona na sekwencje aminokwasów w białkach (proces translacji).



Schemat 1. Przekaz informacji genetycznej w komórce

Mechanizm przekazywania informacji zawartej w DNA opiera się na zasadzie oddziaływań pomiędzy parami komplementarnych nukleozasad zawartych w DNA i kwasach RNA.

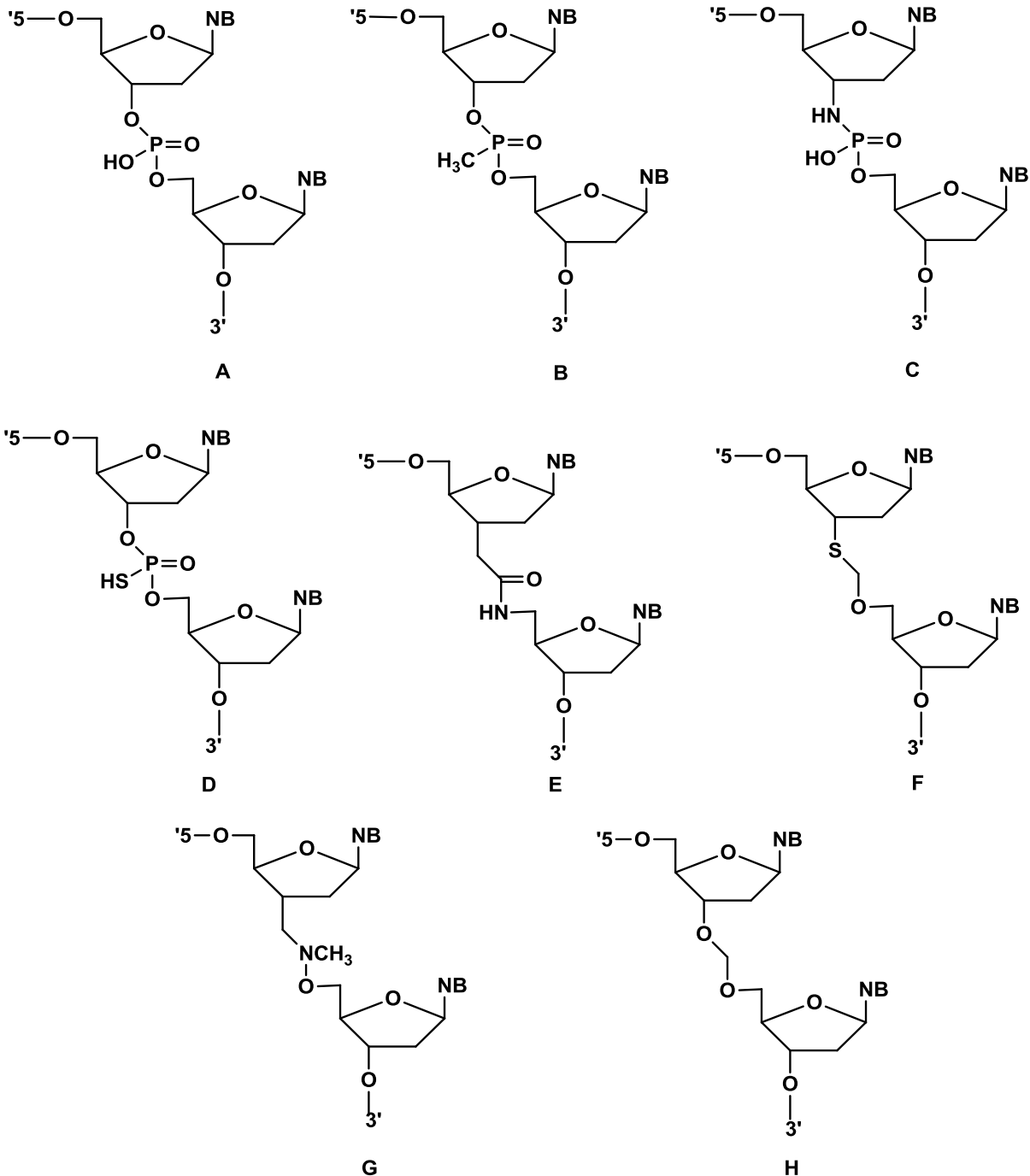


Schemat 2. Blokowanie informacji na poziomie transkrypcji i translacji

Naturalne oligonukleotydy mają właściwości tworzenia trwałych dupleksów zarówno z DNA jak i mRNA, a zatem wykazują właściwości zarówno antygenowe jak i antysensowne in

in vitro. Są jednak szybko degradowane przez nukleazy w żywych komórkach (in vivo). Możliwość zaburzenia tego procesu na obu etapach, zarówno translacji jak i transkrypcji, jest podstawą koncepcji regulacji ekspresji genów, co ma podstawowe znaczenie zwłaszcza w terapii chorób nowotworowych (Schemat 2). Jeśli wprowadzić syntetyczny oligonukleotyd (antygen) zdolny do utworzenia trwałego dupleksu z fragmentem komórkowego DNA, kodującego dane białko, to część ta zostanie wyłączona z procesu transkrypcji. Ten rodzaj regulacji nazywamy inhibicją antygenową. Drugim celem pozwalającym w ingerowanie w prawidłowy przebieg przekazu informacji, jest oddziaływanie syntetycznego oligonukleotydu z informacyjnym RNA (mRNA) i wyłączenie zawartej w nim komplementarnej sekwencji oligonukleotydowej co zaburza naturalną translację genów na konkretne białko. Taki oligonukleotyd zdolny do zablokowania mRNA nazywany antysensownym. Podejmowano różne próby zastąpienia naturalnych kwasów nukleinowych ich analogami (rys. 1). Zakładano, że wprowadzone zmiany strukturalne będą miały wpływ na przebieg procesu ekspresji genów. Chemicznie modyfikowane oligonukleotydy wykazują co prawda odporność na działanie enzymów hydrolitycznych, ale na ogół obserwuje się zmniejszenie trwałości utworzonych dupleksów lub obniżenie zdolności do ich tworzenia.

Podobne rozwiązanie stanowią odkryte w latach 90. Proteinowe kwasy nukleinowe (PNA). W PNA (rys. 2) obecne zasady nukleinowe połączone są poprzez mostek metylenowy z łańcuchem polipeptydowym (w pierwszej wersji poli(*N*-2-aminoetyloglicynowym). Zastąpienie łańcucha składającego się z fosforylowanych sacharydów (D-rybofuranozowego lub 2-deoksy-D-rybofuranozowego) łańcuchem polipeptydowym spowodowało całkowitą odporność na specyficzne dla kwasów nukleinowych enzymy hydrolityczne. Ponieważ łącznikiem nukleozasad jest pochodna glicyny lub inne polipeptydy PNA są praktycznie nietoksyczne. Dodatkowo zastąpienie dysocjującej reszty fosforanowej ugrupowaniem amidowym powoduje, że cząsteczki PNA są obojętne. Terminalne grupy końców C i N można łatwo zmodyfikować do grup obojętnych, co znosi oddziaływania kulombowskie z ujemnie naładowanymi fragmentami kwasów nukleinowych. Rys. 3 przedstawia inne warianty łańcucha PNA.

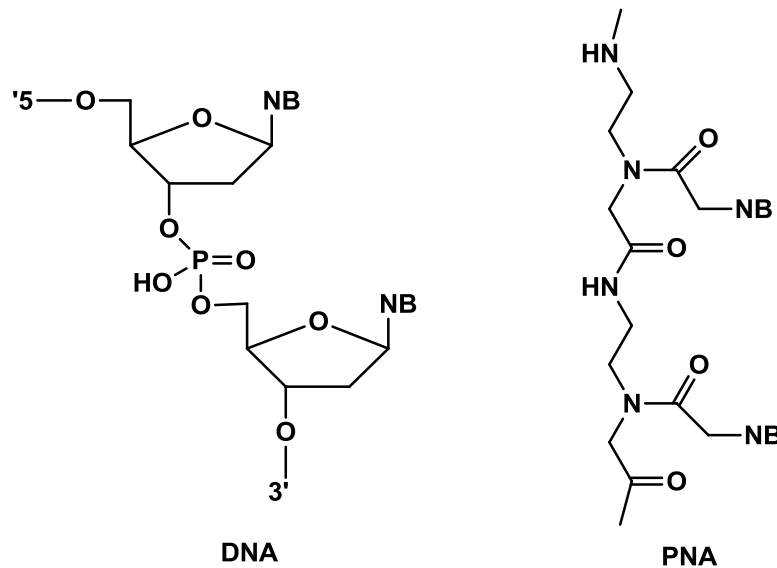


Rys.1. Analogi naturalnych oligonukleotydów

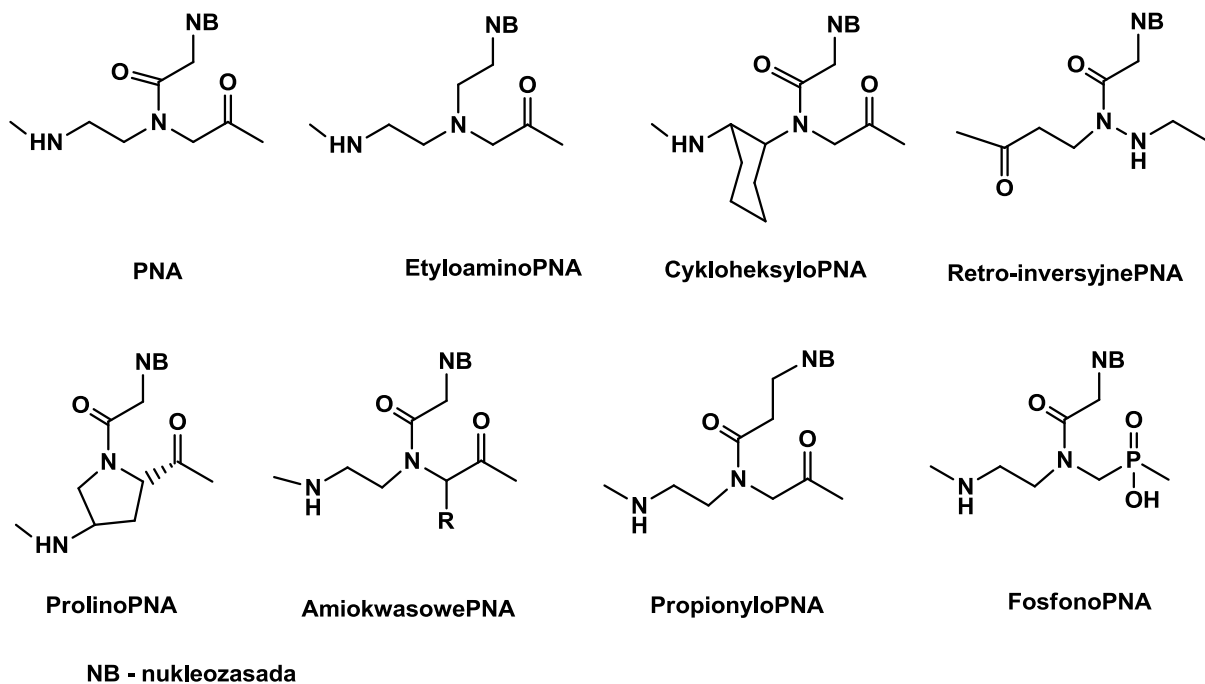
W syntezie PNA wykorzystuje się standardową metodykę stosowaną w syntezie polipeptydów na matrycy polimerowej. Synteza składa się z dwóch procesów: przygotowania prekursora do syntezy łańcucha polipeptydowego oraz syntezy pochodnej nukleozasady. Połączenie tych dwóch fragmentów daje monomer do syntezy PNA. Drugi etap to synteza z polipeptydu na matrycy stałej. Prekursor polipeptydu, zabezpieczoną 2-aminoetyloglicynę, otrzymuje się w reakcji nadmiaru 1,2-diaminoetanu (etylenodiaminy) z bromooctanem tert-



butylu (Schemat 3). Wolną grupę aminową zabezpiecza się grupą fluorenylometoksykarbolynową (FmocNH-) lub *t*-butoksykarbonylową (BocNH-).



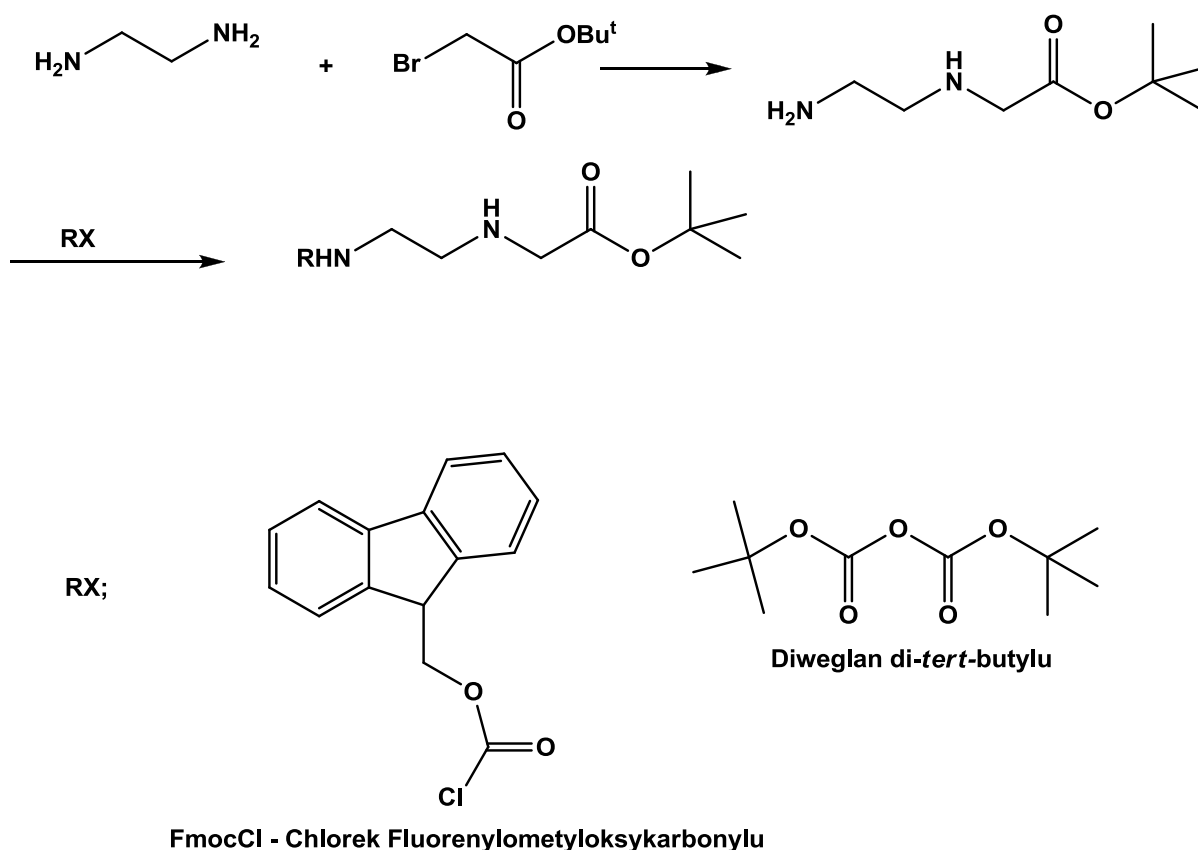
Rys. 2 Porównanie oligonukleotydu DNA i PNA



Rys. 3 Modyfikacje łańcucha PNA

Nukleozasady obecne w PNA otrzymuje się w dwuetapowej reakcji. Uracyl lub tyminę alkiluje się na atomie azotu N1 bromooctanem etylu w obecności zasady np. węglanu potasu. Do kondensacji z łańcuchem bocznym, rozszczepia się ester etylowy i syntezuje ester z pentafluorofenolem. Grupa pentafluorofenoksylowa jest grupą łatwo odchodzącą w reakcji

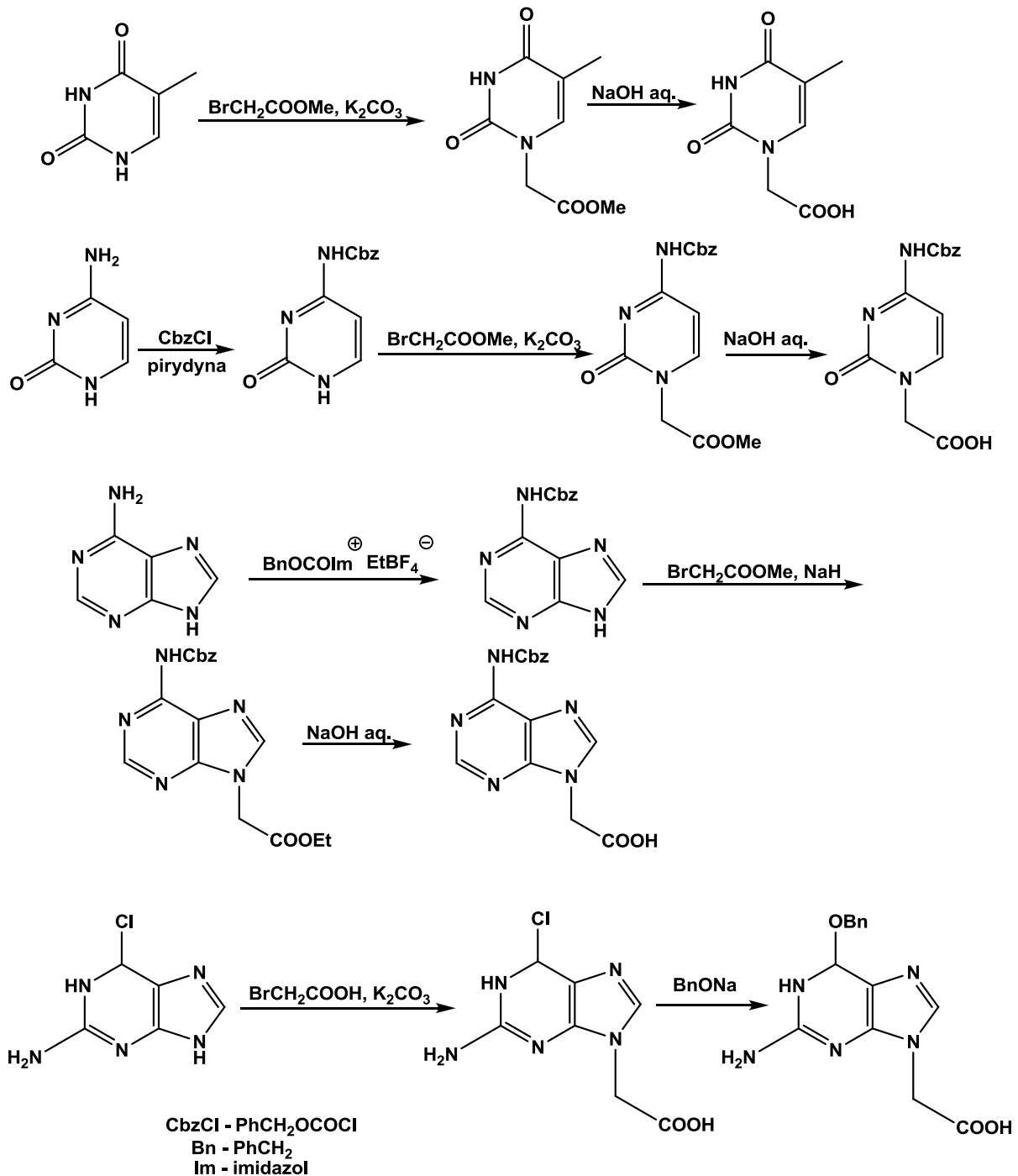
łączenia reszty kwasu (uracyl-1-ilo)octowego lub (tyminyl-1-ilo)octowego z zabezpieczoną 2-aminoetyloglicyną. W cytozynie i adeninie, posiadających egzocykliczną grupę aminową, przed alkirowaniem bromooctanem, zabezpiecza się grupę aminową. Do tego celu stosuje się chlorek karboksybenzylowy (CbzCl). Acylowanie adeniny przeprowadzono stosując tetrafluoroboran *N*-(benzylotykarbonylo)-*N'*-etyloimidazoliowy jako reagent acylujący. W przypadku guaniny, która nie alkirowuje się regioselektywnie, reakcji z kwasem bromooctowym poddaje się 2-amino-6-chlorpurynę, którą przekształca się w ostatnim etapie w guaninę (Schemat 4). Łączenie fragmentu zabezpieczonej 2-aminoetyloglicyny z pochodną nukleozasady (kwasem pirymidynoiloctowym lub purynylooctowym) wymaga aktywacji w trakcie reakcji kondensacji, ze względu na obniżoną nukleofilowość drugorzędowej grupy aminowej w 2-aminoetyloglicynie. W przypadku pirymidyn stosuje się aktywację 3,4-dihydro-3-hydrokso-4-okso-1,2,3-benzotriazyną (DhbtOH) w kombinacji z DCC.



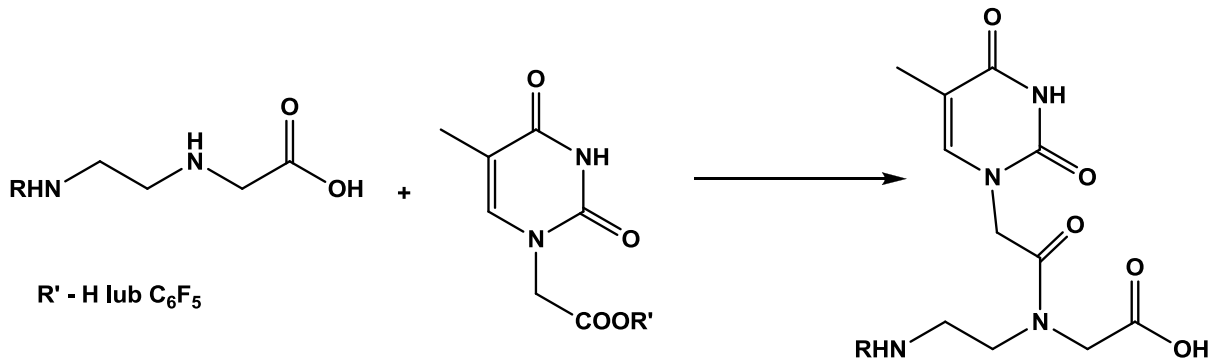
Schemat 3. Synteza prekursora polipeptydowego



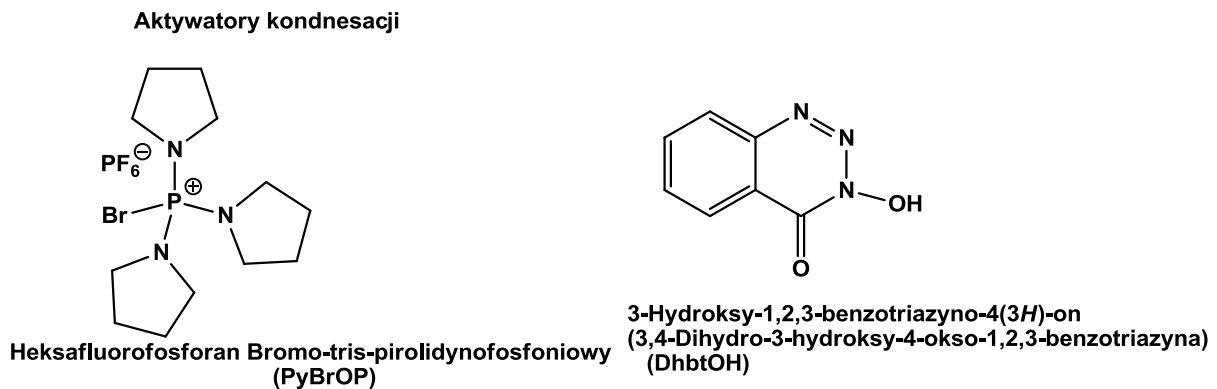
Kwas [2-amino-6-(benzyloksy)puryn-9-yl]octowy, prekursor guaniny kondensowano z pochodną 2-aminoetyloglicyny w obecności heksafluorofosforanu bromotris(pirolidyno)-fosfoniowego (PyBrop)



Schemat 4. Przygotowanie pochodnych nukleozad

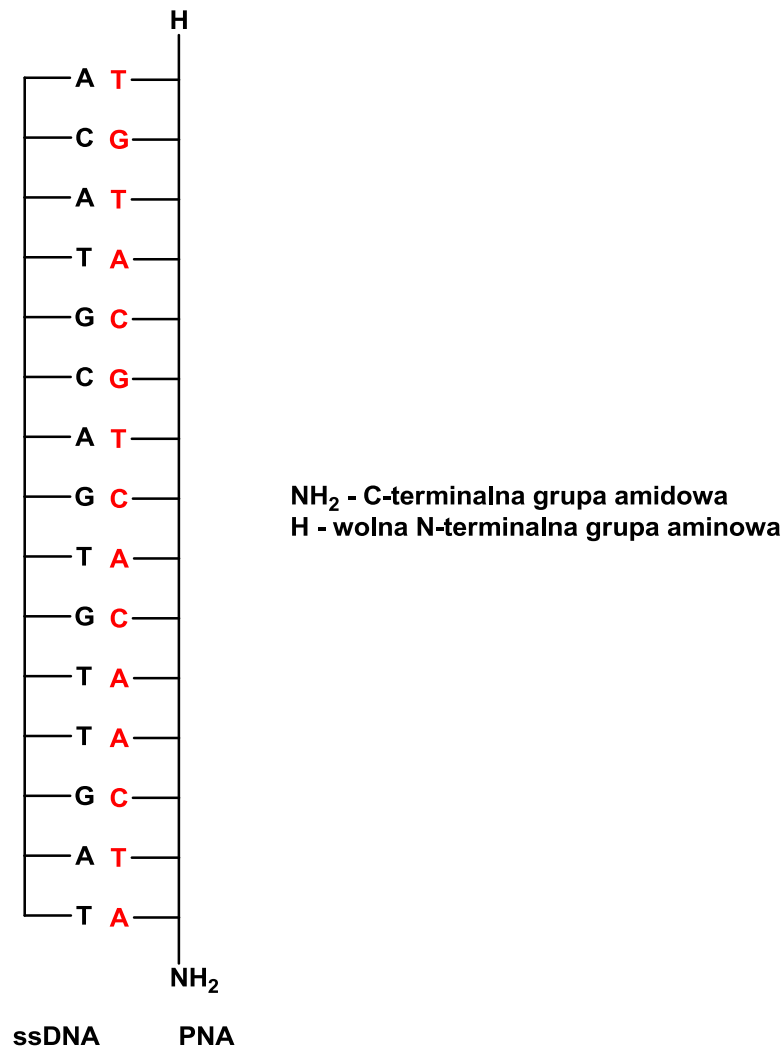


Schemat 5. Synteza monomeru tyminowego do syntezy PNA



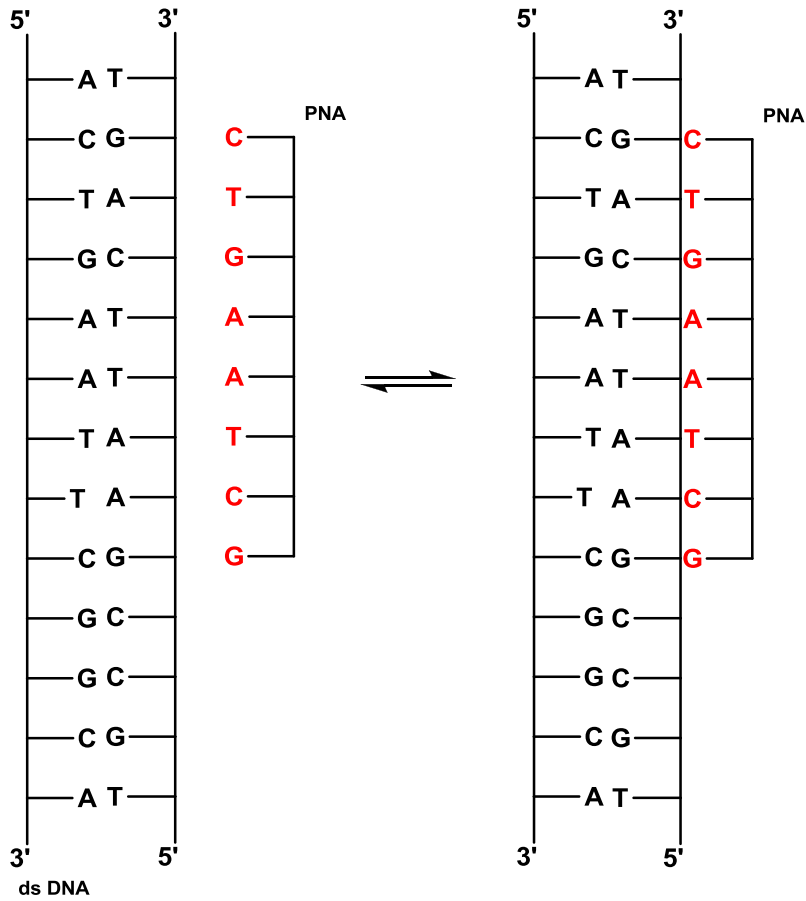
Schemat 6. Aktywatory reakcji kondensacji

Peptydowe kwasy nukleinowe wykazują odporność na działanie nukleaz, enzymów, które są zdolne do hydrolizowania naturalnych kwasów nukleinowych. Brak ugrupowania fosfordiestrowego sprawia, że są one praktycznie niepolarne. Natomiast nukleozasady wykazują normalną zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z komplementarnymi zasadami. Badania przeprowadzone nad trwałością dupleksów składających się z jednej nici naturalnego oligonukleotydu DNA i komplementarnego PNA wykazują dużą trwałość, a tzw. temperatura mięknięcia T_m jest wyższa od naturalnego dupleksu DNA. Pentadekamer PNA o strukturze H-TGTACGTCACA ACTA-NH₂ tworzy dupleks o $T_m = 69.5$ °C (Schemat 7). Analogiczny kompleks DNA ma $T_m = 56.1$ °C, (Egholm, M; Buchardt, O; Christensen, L; Behrens, C; Freier, S.M; Driver, D.A; Berg, R. H; Kim, S. K; Norden, P; Nielsen, P. E., Nature, 1993, 365, 566). Oligomery homopirymidynowe lub zawierające znaczną przewagę pirymidyn nad purynami zdolne są do tworzenia bardzo stabilnych tripleksów z DNA o strukturze (PNA)₂DNA. Stabilność tych kompleksów rośnie proporcjonalnie wraz ze

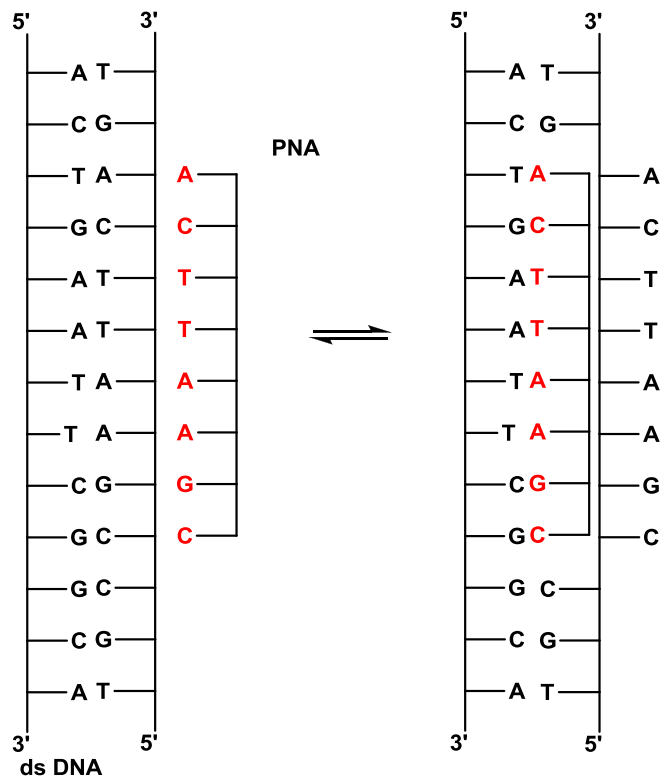


Schemat 7. Tworzenie dupleksu DNA-PNA

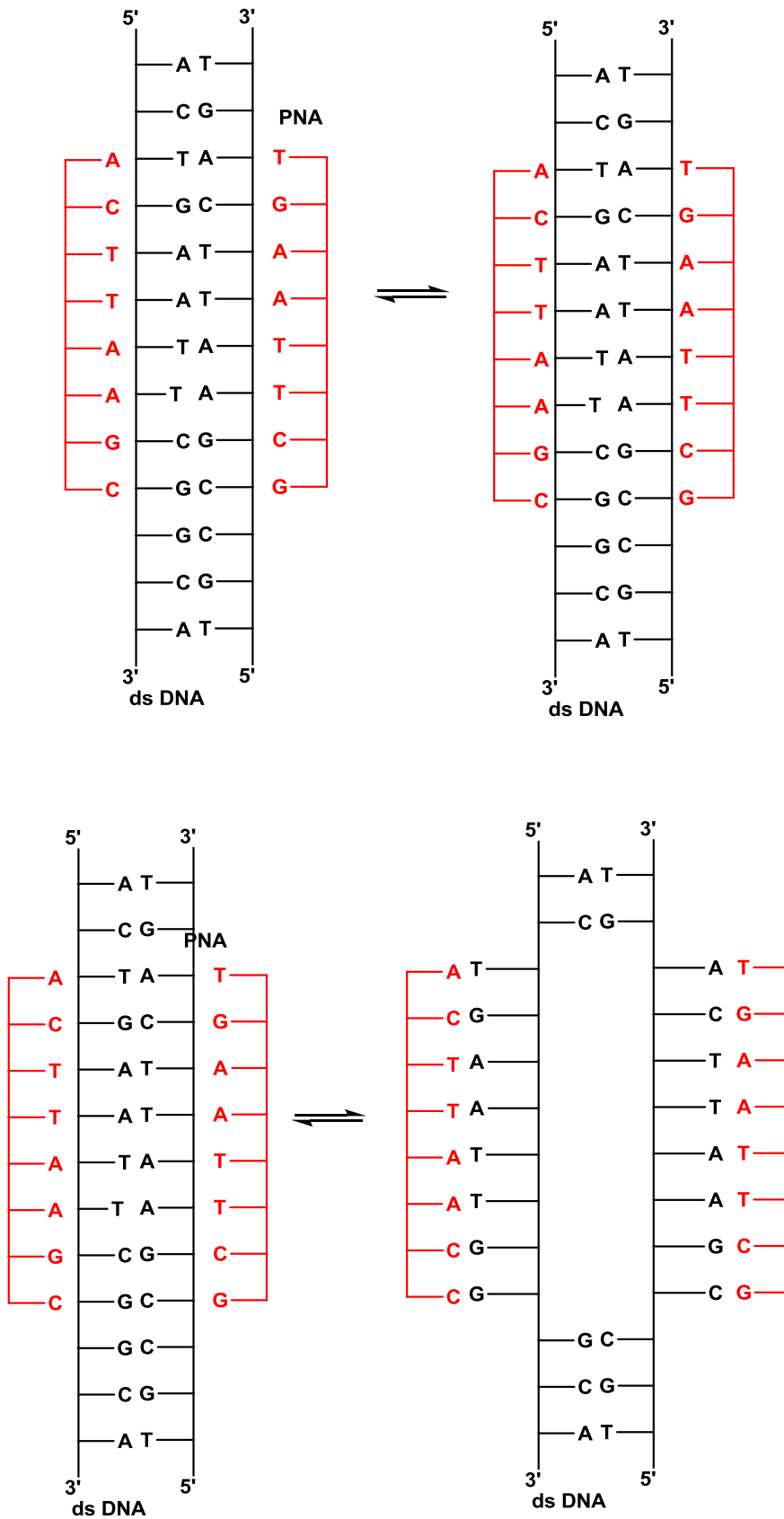
wzrostem łańcucha oligomeru w proporcji 10 oC na każdą parę nukleozasad. Duża stabilność kompleksów między peptydowymi kwasami nukleinowymi a DNA powoduje możliwość zamiany komplementarnego fragmentu DNA na odpowiedzni fragment PNA (schematy 8 – 10). PNA są także zdolne do tworzenia kompleksów typu PNA-PNA, z zachowaniem komplementarności par zasad Watsona-Crick'a. W takich kompleksach zachowana jest antyrównoległa orientacja obu łańcuchów.



Schemat 8. Tworzenie kompleksów DNA-PNA



Schemat 9. Podstawienie łańcucha w DNA



Schemat 10. Różne warianty podstawienia fragmentu w DNA przez PNA