

Ksenonukleinske kiseline

Divjak, Toni

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:865048>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Toni Divjak

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

KSENONUKLEINSKE KISELINE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2020. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

29. kolovoza 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

2. listopada 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	VIII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Osnovni pojmovi o nukleinskim kiselinama	1
1.1.1. <i>Struktura nukleinskih kiselina</i>	<i>1</i>
1.1.2. <i>Replikacija DNA</i>	<i>3</i>
1.1.3. <i>Transkripcija.....</i>	<i>5</i>
1.1.4. <i>Translacija</i>	<i>7</i>
1.2. Osnovna tehnika u istraživanju nukleinskih kiselina	8
1.2.1. <i>Lančana reakcija polimeraze.....</i>	<i>8</i>
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	10
2.1. Podjela i struktura ksenonukleinskih kiselina	10
2.1.1. <i>Ksenonukleinske kiseline s modificiranim dušičnim bazama.....</i>	<i>10</i>
2.1.2. <i>Ksenonukleinske kiseline s modificiranim šećernim dijelom</i>	<i>13</i>
2.1.3. <i>Ksenonukleinske kiseline s modificiranom fosfodieterskom vezom.....</i>	<i>16</i>
2.1.4. <i>Ksenonukleinske kiseline s neutralnim mostom</i>	<i>17</i>
2.1.5. <i>Ksenonukleinske kiseline s modificiranom okosnicom.....</i>	<i>18</i>
2.1.6. <i>Osobitosti trodimenzijske strukture ksenonukleinskih kiselina.....</i>	<i>20</i>
2.2. Upotreba ksenonukleinskih kiselina.....	23
2.2.1. <i>Upotreba XNA kao antisense oligonukleotida</i>	<i>23</i>
2.2.2. <i>Upotreba XNA kao oligonukleotida koji sterički blokiraju translaciju</i>	<i>24</i>
2.2.3. <i>Upotreba XNA kao oligonukleotida uključenih u regulaciju ekspresije gena RNA interferencijom.....</i>	<i>24</i>
2.2.4. <i>Upotreba XNA kao oligonukleotida uključenih u proces prekrajanja.....</i>	<i>26</i>
2.3. Zaključak i buduća istraživanja	28
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXX

§ Sažetak

Ksenonukleinske kiseline (XNA) su skupina sintetskih genetičkih polimera odnosno kemijski modificiranih analoga nukleinskih kiselina. Izraz „XNA“ prvi put su upotrijebili Herdewijn i Marlière 2009. godine za kemijske modifikacije dušičnih baza, šećernog dijela, fosfodieterskog mosta ili kombinaciju tih elemenata prirodnih nukleinskih kiselina. Cilj ovog rada je upoznati se s osnovnim vrstama XNA i njihovom strukturom. U drugom dijelu rada je opisano kako se pojedine ksenonukleinske kiseline koriste u kliničke svrhe. U tom području postoji nekoliko pristupa. *Antisense* oligonukleotidi vežu se na mRNA, čime aktiviraju ribonukleazu H (RNazu H), što uzrokuje degradaciju komplementarnih mRNA. S druge strane vezanjem XNA u blizini mjesta inicijacije translacije sterički se blokira translacija. Osim toga, XNA se mogu uključiti u regulaciju ekspresije gena putem RNA interferencija ili u proces prekrajanja (engl. *splicing*).

§ POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – adenin

AGO2 – endonukleaza Argonaut 2

AmNA – nukleinska kiselina s premoštenom amidnom skupinom (engl. *amido-bridged nucleic acid*)

ANA – arabinonukleinska kiselina (engl. *arabinose nucleic acid*)

ASO – *antisense* oligonukleotidi

ATP – adenzin-trifosfat

C – citozin

CeNA – cikloheksenonukleinska kiselina (engl. *cyclohexene nucleic acid*)

cEt nukleotidi – „rigidni“ etil nukleotidi (engl. *costrained ethyl nucleotides*)

DMD – Duchenne mišićna distrofija (engl. *Duchenne muscular dystrophy*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

tc-DNA – triciklička DNA (engl. *tricyclo DNA*)

Ds – 7-(2-tienil)-imidazol[4,5-b]-piridin

F – 2,4-difluorotoluen

FNA – 2'-fluororibonukleinska kiselina

FANA – 2'-deoksi-2'-fluoroarabinonukleinska kiselina (engl. *2'-deoksi-2'-fluoroarabino nucleic acid*)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

isoC – izocitozin (2-amino-4-ketopirimidin)

isoG – izogvanin (6-amino-2-ketopurin)

G – gvanin

GTP – gvanozin-trifosfat

κ – 2,6-diaminopirimidin

LNA – „rigidna“ nukleinska kiselina (engl. *locked nucleic acid*)

MB – molekularna sonda (engl. *molecular beacon*)

MEPNA – oligonukleotidi sa 5'-*O*-metilenfosfatnom vezom (engl. *5'-O-methylenephosphate*)

MOE-RNA – 2'-*O*-metoksietil-RNA

2S-MOP – 2'-*O*-(2S-metoksipropil)-RNA

dP – triaza-isoG

Pa - pirol-2-karbaldehid

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PDB – engl. *Protein Data Bank*

PICS – 7-propinilizokarbostirila

PMO – fosforodiamidatni morfolino oligomeri (engl. *phosphorodiamidate morpholino oligomers*)

PMOplus – modifikacija PMO koja sadrži piperazin u fosforodiamidatnoj vezi

PNA – peptidna nukleinska kiselina (engl. *peptide nucleic acid*)

PPMO – peptidno-konjugirani PMO (engl. *peptide-conjugated PMOs*)

PS – fosforotilatni nukleotidi

RISC – utišavajući kompleks induciran s RNA (engl. *RNA-induced silencing complex*)

RNA – ribonukleinska kiselina

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

miRNA – mikro RNA (engl. *micro RNA*)

rRNA – ribosomska RNA (engl. *ribosomal RNA*)

tRNA – transfer RNA (engl. *transfer RNA*)

siRNAs – male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNAs*)

snRNPs – male jezgrine ribonukleoproteinske čestice (engl. *small nuclear ribonucleoproteins*)

RNAi – RNA interferencija (engl. *RNA interference*)

RNaza H – ribonukleaza H (engl. *ribonuclease H*)

s – 2-amino-6-(2-tienil)purin

T – timin

TNA – treonukleinska kiselina (engl. *threose nucleic acid*)

U – uracil

UNA – „nerigidna“ nukleinska kiselina (engl. *unlocked nucleic acid*)

v – 2-amino-6-(2-tiazol)purin

X – ksantin

x – 2-amino-6-(N,N-dimetilamino)purin

XNA – ksenonukleinska kiselina (engl. *xeno-nucleic acid*)

y – piridin-2-on

Z – 4-metilbenzimidazol

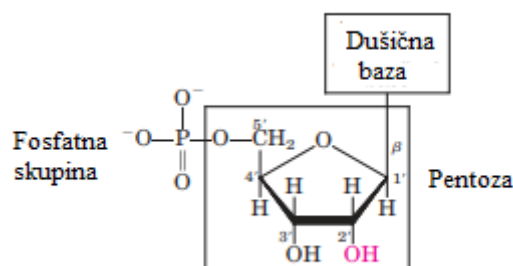
dZ – nitropiridon

§ 1. UVOD

1.1. Osnovni pojmovi o nukleinskim kiselinama

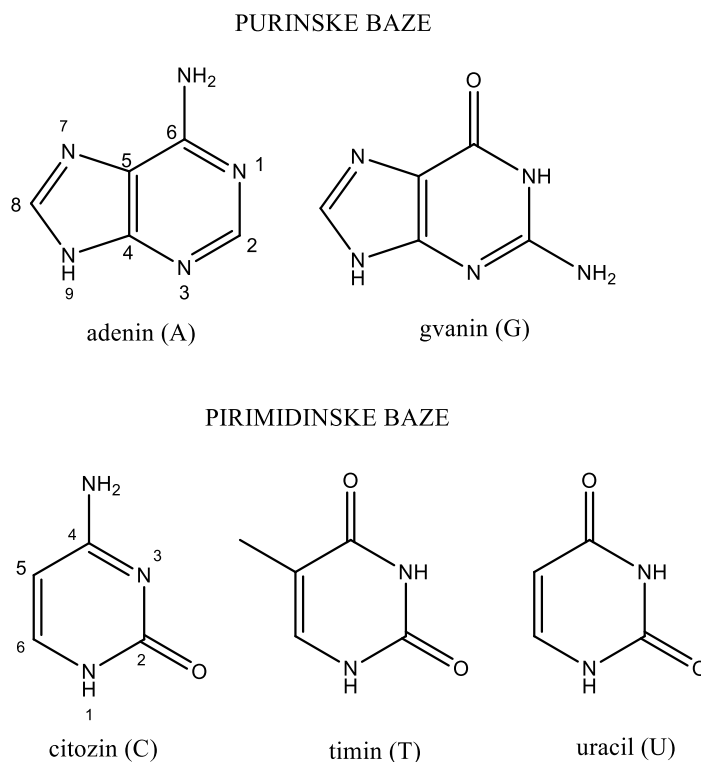
1.1.1. Struktura nukleinskih kiselina

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA) su prema kovalentnoj strukturi linearni polimeri nukleotida. Njihova osnovna uloga je prijenos nasljedne informacije. Nukleotid je jedinica građena od šećera pentoze, fosfatne skupine i dušične baze. Šećer pentoza u RNA je riboza, a u DNA je deoksiriboza. Kao što je prikazano na slici 1., deoksiriboza se od riboze razlikuje prema tome što na 2'-ugljikovom atomu nema hidroksilnu skupinu. Okosnicu nukleinskih kiselina čini niz pentoza povezanih fosfodieterskom vezom. Pri tome je 3'-hidroksilna skupina jednog nukleotida esterificirana fosfatnom skupinom koja je povezana na 5'-hidroksilnu skupinu drugog nukleotida. Zbog toga se položaj pojedinih baza u lancu dogovorno označava od 5'- prema 3'-kraju.^{1,2}



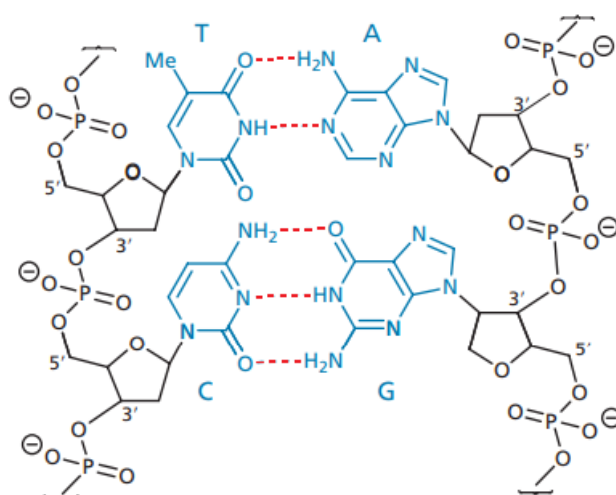
Slika 1. Građa nukleotida – shematski prikazana razlika deoksiribonukleotida od ribonukleotida koji na 2'-ugljikovom atomu ima vodikov atom umjesto hidroksilne skupine (crveno istaknuta) - preuzeto iz²

Na 1'-ugljikovom atomu nukleotida je preko N-β-glikozidne veze povezana dušična baza. Prema strukturi dušične baze dijelimo na purinske i pirimidinske. Purinske baze su gvanin (G) i adenin (A), a pirimidinske baze su citozin (C), timin (T) u slučaju DNA ili uracil (U) u slučaju RNA. Osim prema strukturama koje su prikazane na slici 2. dušične se baze razlikuju prema položaju na koji se veže glikozidna veza. Purinske baze se vežu na N-9, a pirimidinske na N-1. Kako bi se naglasila razlika u položajima atoma u dušičnoj bazi i šećeru pentozi za označavanje atoma u šećeru koristi se oznaka „'“.²



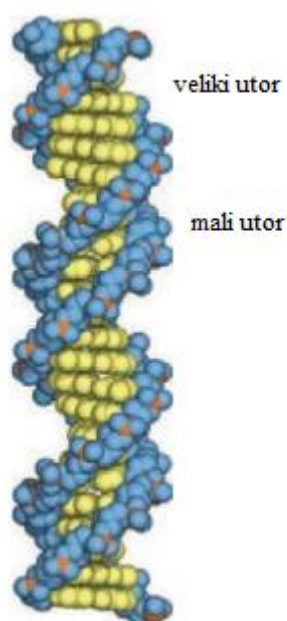
Slika 2. Struktura dušičnih baza - preuzeto iz²

Prema Watson – Crickovom modelu, koji je objavljen 1953. godine DNA je građena od dva lanca, koji sačinjavaju desnu zavojnicu (poznato kao B-DNA zavojnica). Lanci teku u suprotnim smjerovima, pa ih se naziva antiparalenim (prikazano na slikama 3. i 4.). S vanjske strane nalazi se šećerno-fosfatna okosnica, dok su dušične baze smještene u unutrašnjosti. Dušične baze su okomite na os zavojnice, te razmaknute 3,4 Å. U svakom okretu lanca koji je duljine 34 Å nalazi se 10 parova baza, dok je promjer zavojnice 20 Å. Kao što je prikazano na slici 3. dušične baze se povezuju vodikovim vezama – tako da se gvanin sparuje s citozinom trostrukom vodikovom vezom, dok se adenin sparuje s timinom dvostrukom vodikom vezom. Osim toga, dušične baze nalaze se jedna blizu druge što uzrokuje veliki broj privlačnih van der Waalsovih interakcija, što pridonosi stabilnosti dvostruke zavojnice.¹



Slika 3. Sparivanje dušičnih baza (plavo) u dvostrukoj zavojnici DNA

Jednoslovnim kraticama označene su strukture pojedinih dušičnih baza, dok je vodikova veza označena crvenim crticama. Crno je označena šećerno-fosfatna okosnica - prema³

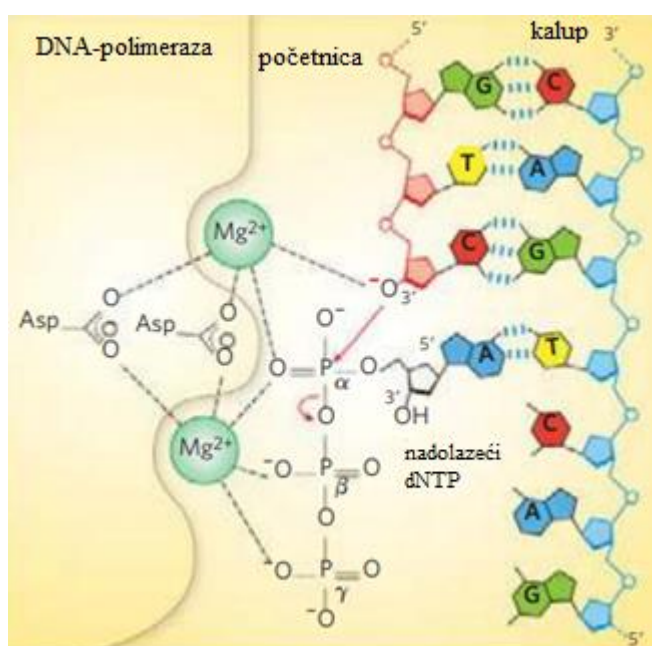


Slika 4. Trodimenzijska struktura DNA – preuzeto iz²

1.1.2. Replikacija DNA

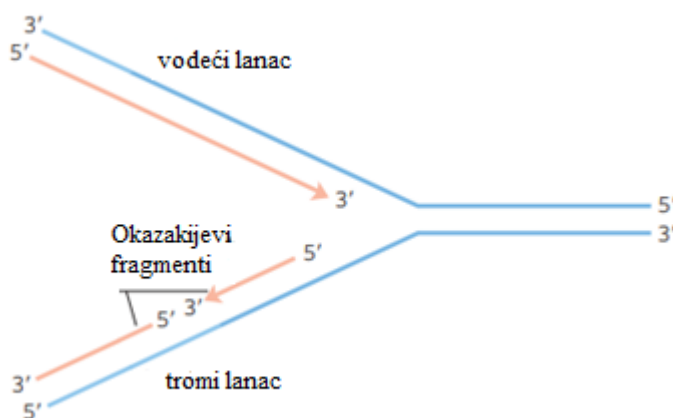
Replikaciju DNA kataliziranu DNA-polimerazom može se opisati semikonzervativnim modelom. To znači da svaki od lanaca dvostruke zavojnice djeluje kao kalup za sintezu novog komplementarnog lanca. Istraživanja su provedena na primjeru bakterije *Escherichia coli* gdje su pronađene tri DNA-polimeraze: DNA-polimeraza I, DNA-polimeraza II i DNA-polimeraza

III. DNA-polimeraza I je prva polimeraza kojoj je određena trodimenzijska struktura, no glavnu replikaciju DNA vrši DNA-polimeraza III. Imaju isti mehanizam u kojem DNA-polimeraza katalizira nukleofilni napad 3'-hidroksilne skupine na kraju polinukleotidnog lanca na α -fosforilnu skupinu nadolazećeg nukleozid-trifosfata, pri čemu se oslobađa pirofosfat koji se pomoću anorganske pirofosfataze hidrolizira čime je osigurana ireverzibilnost ovog procesa (mehanizam prikazan na slici 5.). U aktivnom mjestu nalaze se dva evolucijski očuvana aspartata koji koordiniraju dva iona magnezija. Jedan ion magnezija veže nukleozid-trifosfat i 3'-hidroksilnu skupinu početnice, pri čemu se stabilizira negativni naboj u pentakoordiniranom prijelaznom stanju, a drugi ion magnezija veže se na nukleozid-trifosfat pri čemu stabilizira negativni naboj oslobođenog pirofosfata. DNA-polimeraze ne mogu samostalno inicirati replikaciju, pa je potrebna početnica (engl. *primer*) odnosno segment sa slobodnom 3'-hidroksilnom skupinom komplementaran kalupu kojeg stvara RNA-polimeraza (primaza).^{1,2}



Slika 5. Mehanizam djelovanja DNA-polimeraze – preuzeto iz²

Tijekom replikacije DNA oba se lanca umnažaju istodobno u smjeru od 5'- prema 3'- kraju pri čemu se stvaraju replikacijske rašlje (prikazane na slici 6.). Pri tome se vodeći lanac sintetizira kontinuirano, a spori ili tromi lanac se replicira diskontinuirano u blokovima koji se nazivaju Okazakijevi fragmenti. Pojedini Okazakijevi fragmenti se kasnije povezuju DNA-ligazom.^{1,2}



Slika 6. Replikacijske rašlje – preuzeto iz²

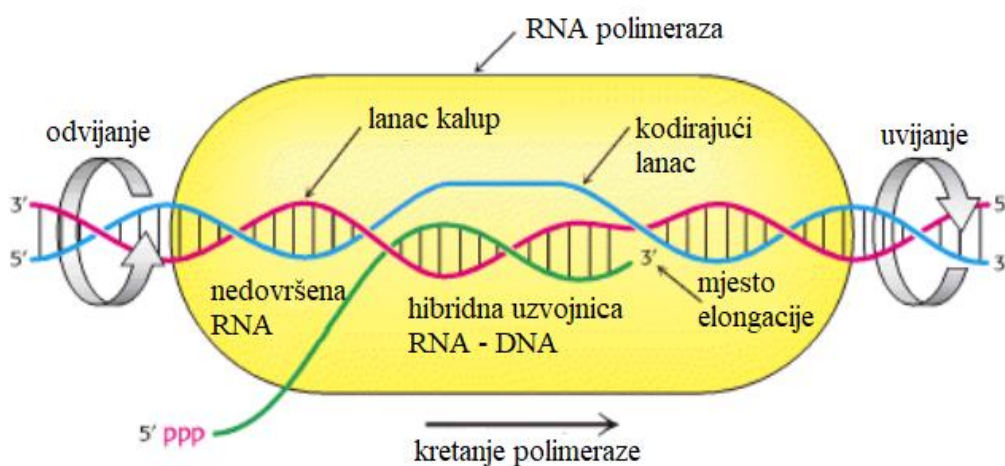
Pogreške koje nastaju tijekom replikacije DNA prenose na potomstvo pa DNA-polimeraza treba biti izrazito točna. Većina DNA-polimeraza može ispraviti vlastite greške svojom 3' → 5' egzonukleaznom aktivnošću (tkz. *proofreading*). Osim toga stanice sadrže dodatne proteine koji ispravljaju greške i oštećenja u DNA, te vjernost replikacije dostiže vrijednost od čak 10^{10} . DNA-polimeraza je procesivan enzim što znači da katalizira nekoliko koraka elongacije bez da disocira s kalupa.^{1,2}

Replikacija DNA kod eukariota je slična, ali puno kompliciranija. Kao i kod bakterije *Escherichia coli* postoji nekoliko vrsta DNA-polimeraza s različitim ulogama od kojih su glavne DNA-polimeraza δ i ϵ .¹

1.1.3. Transkripcija

Nastajanje proteina obuhvaća dva procesa – transkripciju (prepisivanje nasljednih informacija DNA u RNA) te translaciju (prevođenje „jezika“ nukleotida u aminokiselinski slijed). Osim prepisivanja nasljednih informacija DNA u RNA, proces transkripcije obuhvaća sintezu RNA i njezinu doradu. Postoje tri glavna tipa RNA – mRNA (glasnička RNA), tRNA (transfer RNA) i rRNA (ribosomska RNA). Za razliku od procesa replikacije DNA, gdje DNA-polimeraza katalizira replikaciju cijelog genoma, prilikom procesa transkripcije RNA-polimeraza katalizira prepisivanje dijela gena ili grupe gena. Transkripcija započinje na promotoru, odnosno mjestu vezanja RNA-polimeraze. Mjesto inicijacije transkripcije se kod prokariota naziva Pribnowljeva kutija (s konsenzusnim slijedom TATAAT). Mehanizam djelovanja RNA-polimeraze analogan je mehanizmu djelovanja DNA-polimeraze prikazanom na slici 5. RNA-

polimeraza uzrokuje privremeno razdvajanje 17 parova baza (stvaranjem tkz. „transkripcijskog mjehura“ prikazanog na slici 7.). RNA-polimeraza katalizira nukleofilni napad 3'-hidroksilne skupine na kraju polinukleotidnog lanca na α -fosforilnu skupinu nadolazećeg nukleozid-trifosfata pri čemu nastaje hibrid RNA:DNA-kalup duljine 8 parova baza. Za razliku od DNA-polimeraze, RNA-polimeraza ne treba početnicu ni helikazu i u potpunosti je procesivna. Iako vjernost transkripcije ima vrijednost od samo 10^5 , nedavna istraživanja pokazuju da RNA-polimeraza posjeduje mehanizam popravka pogreške koji se naziva *backtracking* (vraćenje unatrag). U slučaju ugradnje krivog nukleotida na 3'-kraj RNA, zaustavi se proces transkripcije, RNA-polimeraza se vrati jedan nukleotid unatrag, te hidrolizira dinukleotid koji sadrži pogrešno ugrađeni nukleotid i nukleotid koji se ugradio prije njega.^{1,2}



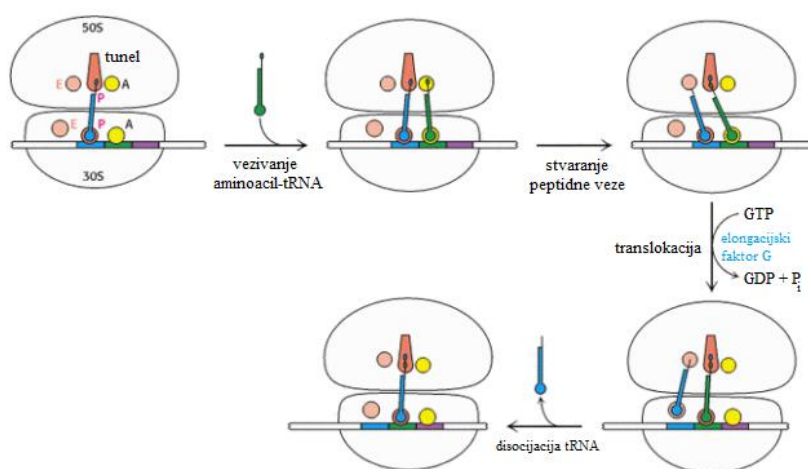
Slika 7. „Transkripcijski mjehur“ – preuzeto iz¹

RNA-polimeraza na opisani način napreduje dok ne prepíše terminatorsku (završnu) sekvencu koja signalizira prestanak transkripcije. Prema mehanizmu završetka transkripcije razlikuje se ρ -neovisna (pri čemu nastaje ukosnica sa G – C parovima baza s peteljkom i omčom) i ρ -ovisna (u kojoj sudjeluje ρ -protein s helikaznom aktivnošću). Kod eukariota su stvari složenije jer se transkripcija i translacija odvijaju u različitim staničnim odjeljcima. Transkripcija se odvija u jezgri, a translacija u citoplazmi, dok se kod prokariota oba procesa događaju u citoplazmi. Osim toga, transkripciju vrše tri tipa RNA-polimeraze i složeniji je način inicijacije transkripcije. RNA-polimeraza I prepisuje gene za 18S, 5,8S i 28S rRNA, RNA-polimeraza II proteinske gene i RNA-polimeraza III gene za tRNA i 5S rRNA. Pri transkripciji proteinskih gena nastaje preteča mRNA (primarni transkript) koja se kod eukariota intenzivno doraduje.

Dorada uključuje dodatak m^7G kape na 5'-kraju i poliadenilatni rep na 3'-kraju. Osim toga, dolazi do izrezivanja dijelova primarnog transkripta koji ne kodiraju proteine – introna (što je opisano u poglavlju 2.3.4.).^{1,2}

1.1.4. Translacija

Proces biosinteze proteina (translacija) je složeniji jer je potrebno prevesti „jezik“ 4 nukleotida na „jezik“ 20 aminokiselina. Pri tome se uspostavlja okvir čitanja, odnosno neprekidajuća sekvenca mRNA koja je podijeljena u skupine od tri nukleotida (kodon) koje kodiraju pojedine aminokiseline. Aminokiseline ne mogu prepoznati triplet nukleotida pa postoji „adapter“, odnosno molekula tRNA koja sadrži mjesto na koje se veže aminokiselina i mjesto za prepoznavanje kodona na mRNA (komplementarnu sekvencu – antikodon). Enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze kovalentno povezuju odgovarajuću aminokiselinu s pripadajućom tRNA. Biosinteza proteina odvija se od N- prema C- kraju polipeptida postepenim dodavanjem aminokiselina. Translacija mRNA se odvija u istom smjeru ($5' \rightarrow 3'$) kao i transkripcija, pa je kod prokariota primijećeno da translacija započne i prije nego završi transkripcija. Translacija se odvija na ribosomu. Ribosom je ribonukleoproteinski kompleks (70S) koji se kod prokariota sastoji od velike (50S) i male podjedinice (30S). Prvi korak u translaciji je stvaranje 70S ribosoma u čemu sudjeluju inicijacijski faktori. Kao što je prikazano na slici 8., na ribosomu se nalaze tri vezna mjesta za tRNA, koja se nazivaju A mjesto (aminoacilno mjesto), P mjesto (peptidilno mjesto) i E mjesto (izlazno mjesto, engl. *exit site*). Signal za inicijaciju translacije je AUG kodon u mRNA, kojeg prepoznaje inicijacijska tRNA s vezanom aminokiselinom formilmetioninom (fMet), pri čemu se inicijacijska tRNA smješta u P mjesto ribosoma.^{1,2}



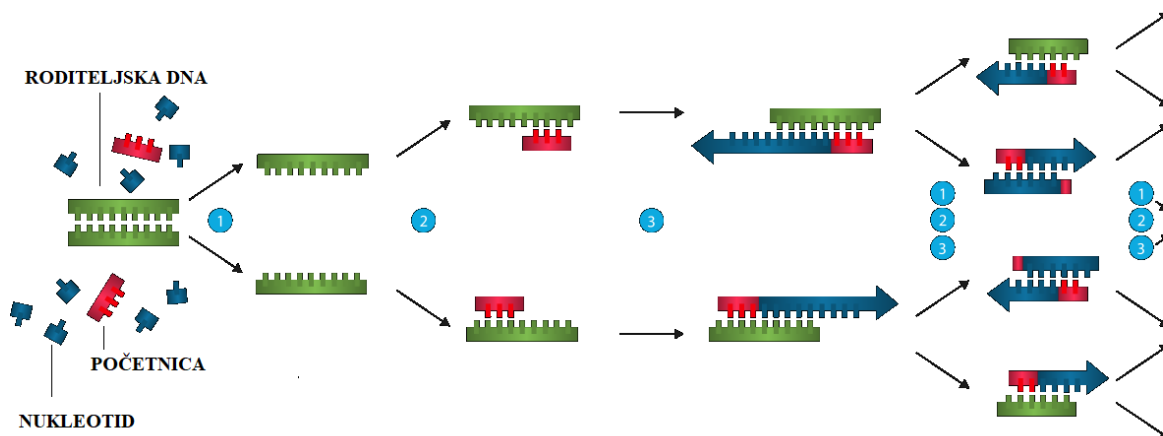
Slika 8. Shematski prikaz pojedinih faza biosinteze proteina – preuzeto iz¹

Nakon toga dolazi do vezanja aminoacil-tRNA u kompleksu s elongacijskim faktorom ET-Tu u A mjesto. Sljedeći korak je stvaranje peptidne veze koje se odvija u peptidil-transferaznom središtu ribosoma velike podjedinice. Amino skupina aminoacil-tRNA vrši nukleofilni napad na karbonilnu skupinu iz esterske veze između formilmetionina i inicijacijske tRNA što dovodi do nastanka peptidne veze. Zatim, dolazi do premještanja (translokacije) za jedan kodon kako bi se sljedeća aminoacilirana tRNA mogla vezati u A mjesto. Taj korak osigurava elongacijski faktor G uz hidrolizu GTP-a. Nakon toga, dolazi do disocijacije tRNA (koja je pomaknuta iz P u E mjesto) i vezanja nove aminoacil-tRNA u A mjesto. Signal za završetak translacije je STOP kodon (UAA, UAG ili UGA) kojeg prepoznaju faktori otpuštanja (engl. *release factors*). Faktori otpuštanja imaju ulogu razdvajanja 30S i 50S podjedinice 70S ribosoma, te otpuštanja mRNA i polipeptidnog lanca. Eukariotski ribosomi (80S) su veći u odnosu na prokariotske (70S), ali se analogno sastoje od velike podjedinice (60S) i male podjedinice (40S). AUG kodon koji je najbliži 5'-kraju predstavlja početak otvorenog okvira čitanja, a proces inicijacije uključuje više inicijacijskih faktora. No, elongacija i terminacija su kod eukariota analogne.^{1,2}

1.2. Osnovna tehnika u istraživanju nukleinskih kiselina

1.2.1. Lančana reakcija polimeraze

Metodu lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction - PCR*) razvio je 1983. godine Kary Mullis s ciljem umnažanja sljedova DNA. Za izvođenje metode potrebno je u otopinu dodati ciljni slijed, početnice, deoksiribonukleozid-trifosfate i termostabilnu *Taq*-DNA-polimerazu (iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*).² Jedan ciklus PCR-metode shematski prikazan na slici 9. sastoji se od tri koraka. U prvom koraku zagrijavanjem otopine na 95 °C tijekom 15 s dolazi do razdvajanja lanaca. U drugom koraku se otopina hladi na 54 °C pri čemu dolazi do sljepljivanja početnica na razdvojene lance ciljnog slijeda. Dodatkom velikog suviška početnica u reakcijskoj smjesi izbjegnuto je sljepljivanje roditeljskih lanaca. U trećem koraku se otopina zagrijava na 72 °C (optimalnu temperaturu za *Taq*-DNA-polimerazu), pri čemu dolazi do replikacije DNA, odnosno produžavanja obje početnice u 5'- prema 3'-smjeru.¹ Ponavljanjem 25 do 30 ciklusa (za manje od sat vremena) ciljni slijed DNA je umnožen čak 30 milijardi puta (u idealnom slučaju 2^{30} puta).²



Slika 9. Faze PCR metode – prema²¹

Brojevima su označeni pojedini koraci u PCR metodi. Broj 1 označava zagrijavanje na 95 °C, što uzrokuje razdvajanje lanaca. Broj 2 označava hlađenje na 54 °C, što omogućuje sljepljivanje početnica. Broj 3 označava zagrijavanje na 72 °C, što omogućuje replikaciju DNA.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

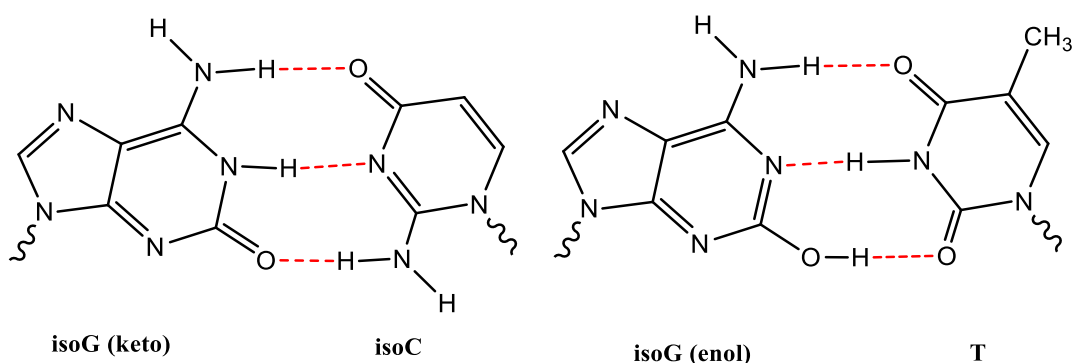
2.1. Podjela i struktura ksenonukleinskih kiselina

2.1.1. Ksenonukleinske kiseline s modificiranim dušičnim bazama

Ksenonukleinske kiseline (XNA) su skupina sintetskih genetičkih polimera odnosno kemijski modificiranih analoga nukleinskih kiselina, pri čemu su moguće kemijske modifikacije dušičnih baza, šećernog dijela, fosfodieterskog mosta ili kombinacije tih elemenata prirodnih nukleinskih kiselina.

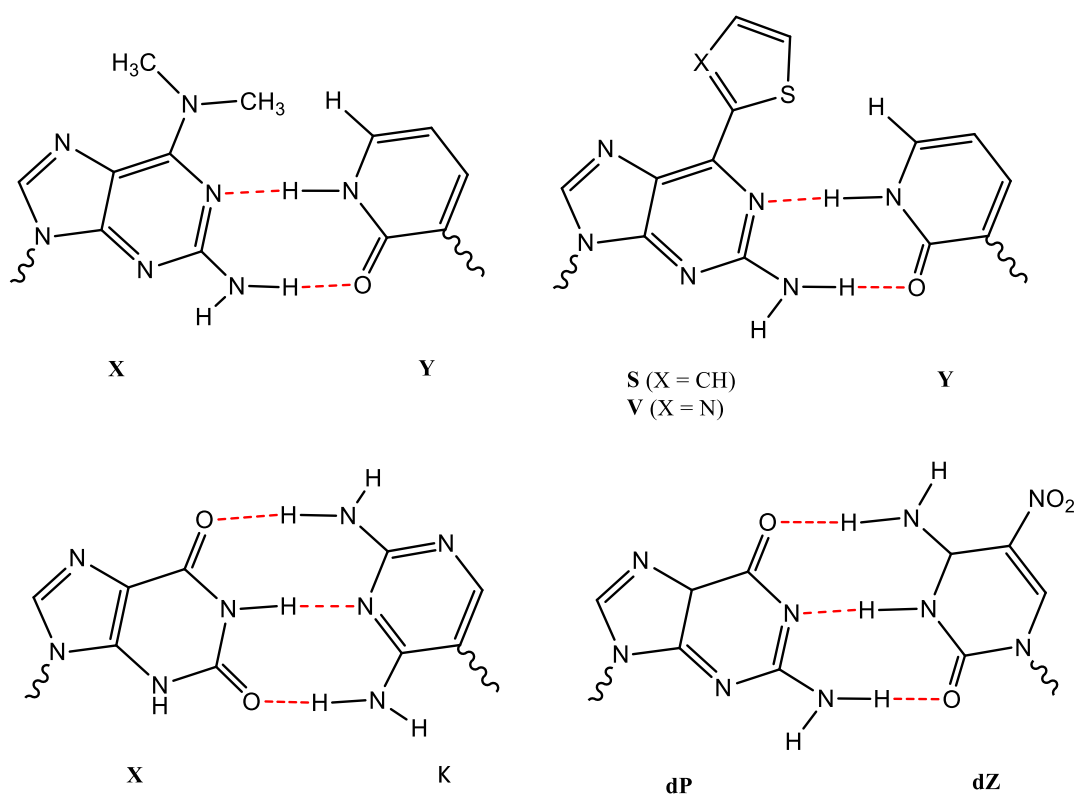
Prijenos nasljedne informacije nukleinskih kiselina ovisi o specifičnom povezivanju komplementarnih, Watson-Crickovih parova dušičnih baza prikazanih na slici 3. Znanstvenici su pokušali osmisliti nove parove dušičnih baza koji u prirodi ne postoje. Krajnji cilj je proširenje genetičkog koda čime bi se u biosintezi proteina uvele nestandardne aminokiseline koje mogu obogatiti funkcionalnost proteina. Istraživanja su tekla u više pravaca, prema dušičnim bazama s vodikovim vezama koje sličje Watson-Crickovim parovima ili prema hidrofobnim baznim parovima koji se temelje na komplementarnosti oblika.^{4,6}

Godine 1989. Benner je razvio treći bazni par izogvanin (**isoG**, 6-amino-2-ketopurin) i izocitozin (**isoC**, 2.amino-4-ketopirimidin) prikazan na slici 10. Nažalost, ovaj bazni par nije stabilan jer **isoG** podliježe tautomerizaciji u vodenom mediju pri fiziološkim uvjetima, pri čemu se u enolnoj formi sparuje s timinom, umjesto s **isoC**. No, ipak je 1992. dokazano da se translacijom *in vitro* pomoću **isoG-isoC** para može uvesti neproteinska aminokiselina 3-jodotirozin, koristeći se **isoCAG** kodonom.^{4,7}



Slika 10. Sparivanje dušičnih baza **isoG** – **isoC**, te sparivanje **isoG (enol)** s timinom – crvenim crticama označene su vodikove veze – preuzeto iz⁷

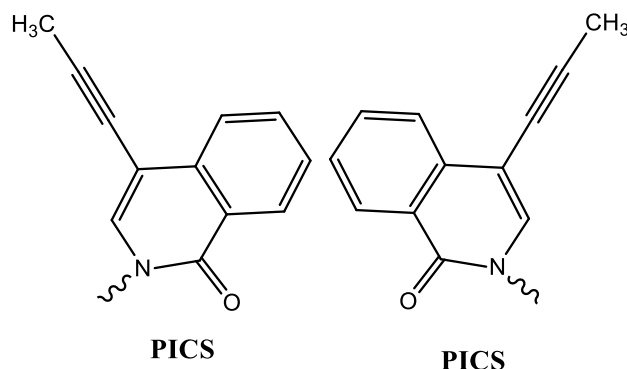
U daljnjim istraživanjama, Bennerova je grupa razvila četvrti bazni par **X** (ksantin) i **κ** (2,6-diaminopirimidin) prikazan na slici 11. U narednim godinama razvijena je dušična baza **y** (piridin-2-on) koja se povezuje sa **x** (2-amino-6-(N,N-dimetilamino)purin), te **s** (2-amino-6-(2-tienil)purin) i **v** (2-amino-6-(2-tiazol)purin). Dokazano je da T7-RNA-polimeraza ugrađuje deoksiy-trifosfate u RNA nasuprot **x**, **s** ili **v** u DNA lancu. Nedavno je razvijen bazni par triaza-isoG (**dP**) i nitropiridon (**dZ**) koji postiže čak 99,8% točnosti tijekom replikacije PCR metodom.^{4,7}



Slika 11. Sparivanje dušičnih baza **X** i **κ**, **x**, **s** ili **v** sa **y**, te **dP** i **dZ** – crvenim crticama označene su vodikove veze – preuzeto iz⁷

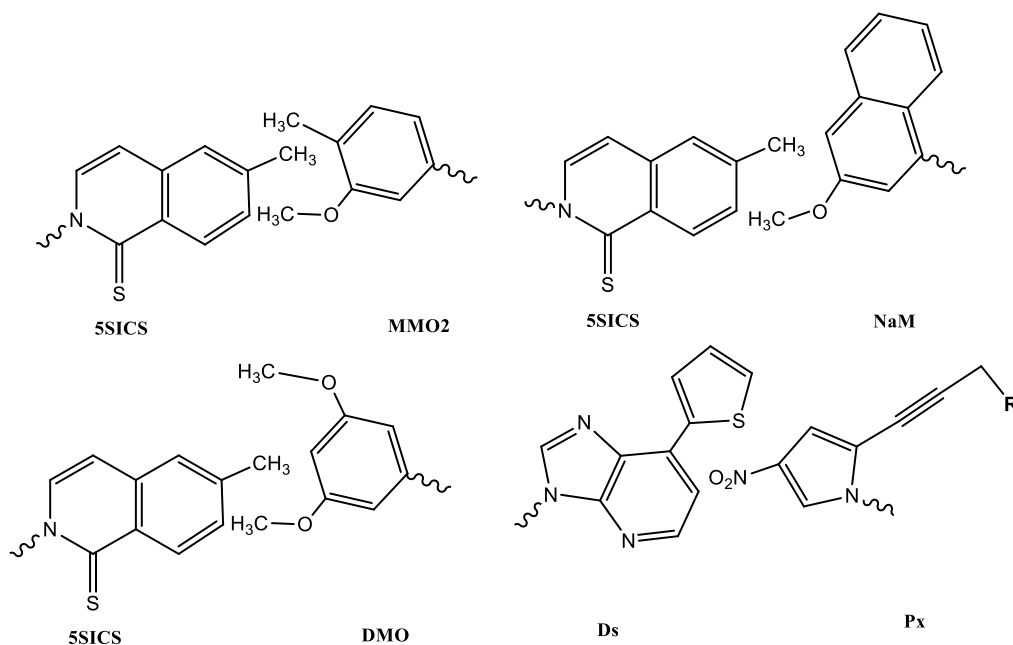
Drugi način razvoja novih baznih parova nije se temeljio na vezivanju vodikovim vezama, već na komplementarnosti oblika, te hidrofobnim interakcijama između parova baza. Godine 1999. Romesbergova grupa postigla je samosparivanje između 7-propinilizokarbostirila (**PICS**), prikazano na slici 12. Iako je **PICS** – **PICS** par preveliki u odnosu na veličinu Watson-Crickovih parova baza veličine 10,7 – 11,0 Å postignuto je ugrađivanje **PICS** nukleotida nasuprot **PICS** u DNA lancu. Nadalje, sintetiziran je par baza **Z** (4-metilbenzimidazol) i **F** (2,4-difluorotoluen) koji je prema veličini i obliku sličan A – T, no atomi vodika u središtu stvaraju steričke smetnje. Kako bi se to uklonilo, u narednim godinama razvijen je **Pa** (pirol-2-

karbaldehyd) i **Q** koji je prema geometriji najbliži prirodnim parovima baza. **Q** je izostrukturna sa **A**, pa se može spariti sa **T**.^{4,7}



Slika 12. Samosparivanje između **PICS** – **PICS** parova baza – preuzeto iz⁷

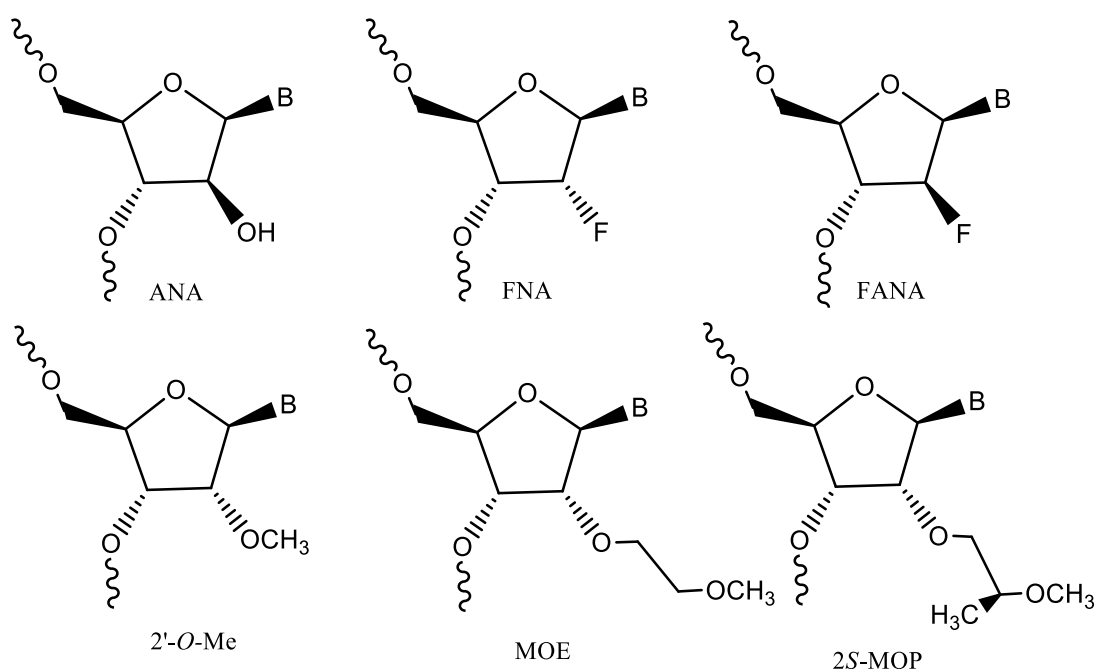
Primijećeno je da **dQTP**, poput **PICS** ima svojstvo samosparivanja. Zbog toga razvijen je **Ds** (7-(2-tienil)-imidazol[4,5-b]-piridin) koji se sparuje s **Pa**, pri čemu nastaje par koji je vrlo specifičan tijekom replikacije PCR metodom. U daljnjim istraživanjima razvijeni su hidrofobni parovi baza **5SICS** – **MMO2**, **5SICS** – **DMO**, **5SICS** – **NaM** i **Ds** – **Px**, prikazani na slici 13. Među navedenim parovima najviše se koristi **Ds** – modificirani-**Px** par zbog toga jer ima visoku točnost pri PCR replikaciji (99,8 – 99,9%) i pokazuje svojstvo fluorescencije.^{4,7}



Slika 13. Strukturne formule hidrofobnih parova baza **5SICS** – **MMO2**, **5SICS** – **DMO**, **5SICS** – **NaM** i **Ds** – **Px** – preuzeto iz⁴

2.1.2. Ksenonukleinske kiseline s modificiranim šećernim dijelom

Zamjenom šećera riboze ili deoksiriboze prisutnih u prirodnim nukleinskim kiselinama s drugim ugljikohidratima nastaju ksenonukleinske kiseline s modificiranim šećernim dijelom. Istraživanja u ovom smjeru započinju promjenom hidroksilne skupine na 2'-ugljikovom atomu RNA s alkosidnom skupinom čime je dobivena serija 2'-*O*-supstituiranih RNA prikazanih na slici 14. U ovoj se skupini ističe 2'-*O*-metoksietil RNA (MOE RNA) čiji se derivati zbog otpornosti na nukleaze, te afinitetu vezanja na komplementarnu mRNA koriste u kliničke svrhe. Nedavno je razvijen 2'-*O*-(2*S*-metoksipropil)-RNA (2*S*-MOP)⁵ čime je pokazano da povećanje hidrofobnosti ne utječe na afinitet vezanja na komplementarnu mRNA i na stabilnost oligonukleotida. Osim toga, zamjenom hidroksilne skupine na 2'-ugljikovom atomu s fluorovim atomom dobivena je 2'*F*-RNA (FNA). Fluor zbog svoje elektronegativnosti pospešuje interakcije dušičnih baza te utječe na vezanje proteina na nukleinske kiseline što se može koristiti u kliničke svrhe.⁸

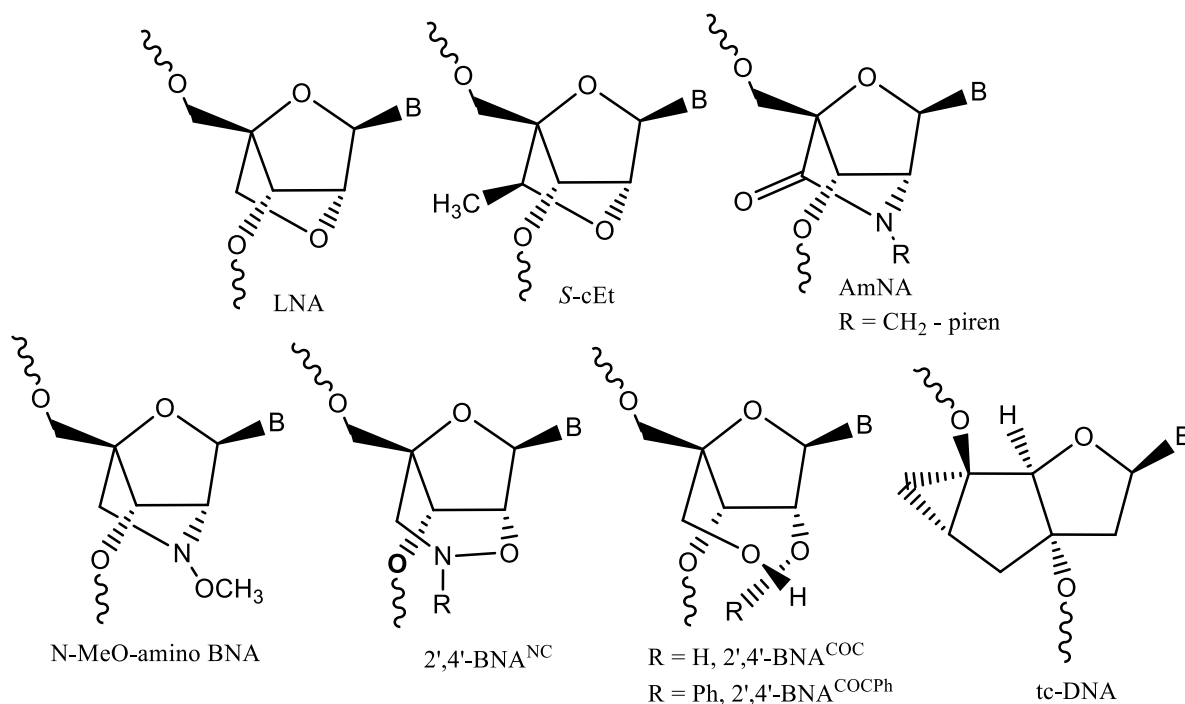


Slika 14. Strukturne formule 2'-modificiranih analoga XNA s modificiranim šećernim dijelom (oznaka B označava jednu od Watson-Crickovih dušičnih baza) – preuzeto iz⁵

Arabinonukleinska kiselina (ANA) razlikuje se od RNA prema tome što sadržava arabinozu koja ima promijenjenu konfiguraciju hidroksilne skupine na 2'-ugljikovom atomu. To znači da hidroksilna skupina riboze koja je u aksijalnom položaju prelazi u ekvatorijalni položaj. Zbog steričkog položaja hidroksilne skupine položaj na 2'-ugljikovom atomu moguće je supstituirati

malim supstituentima, poput fluora pri čemu nastaje 2'-deoksi-2'-fluoroarabinonukleinska kiselina (FANA).⁸

„Rigidna“ nukleinska kiselina (LNA) sadrži biciklički ribonukleozid s metilnom skupinom koja povezuje kisik na 2'-ugljikovom atomu i 4'-ugljikov atom. Upravo zbog bicikličkog mosta dolazi do smanjenja rotacija torzijskih kuteva, odnosno konformacijske fleksibilnosti, što omogućuje veliki afinitet povezivanja LNA na komplementarnu DNA ili RNA. Glavni problem u korištenju LNA u kliničke svrhe su loša farmakokinetička svojstva, te velika toksičnost. Zbog toga je pripremljen niz analoga od kojih se ističe skupina „rigidnih“ etila (cEt nukleotida), koji imaju dodatnu metilnu skupinu na mostu u *S* konfiguraciji, pri čemu je primijećeno poboljšanje svojstva, uz smanjenje toksičnosti. U sljedećoj generaciji se u bicikličkom mostu uvodi dušikov atom, pa nastaje amidna skupina, tj. nukleinska kiselina s premoštenom amidnom skupinom (AmNA).^{5,8,10}



Slika 15. Strukturne formule rigidnih XNA s modificiranim šećernim dijelom (oznaka B označava jednu od Watson-Crickovih dušičnih baza) – preuzeto iz⁵

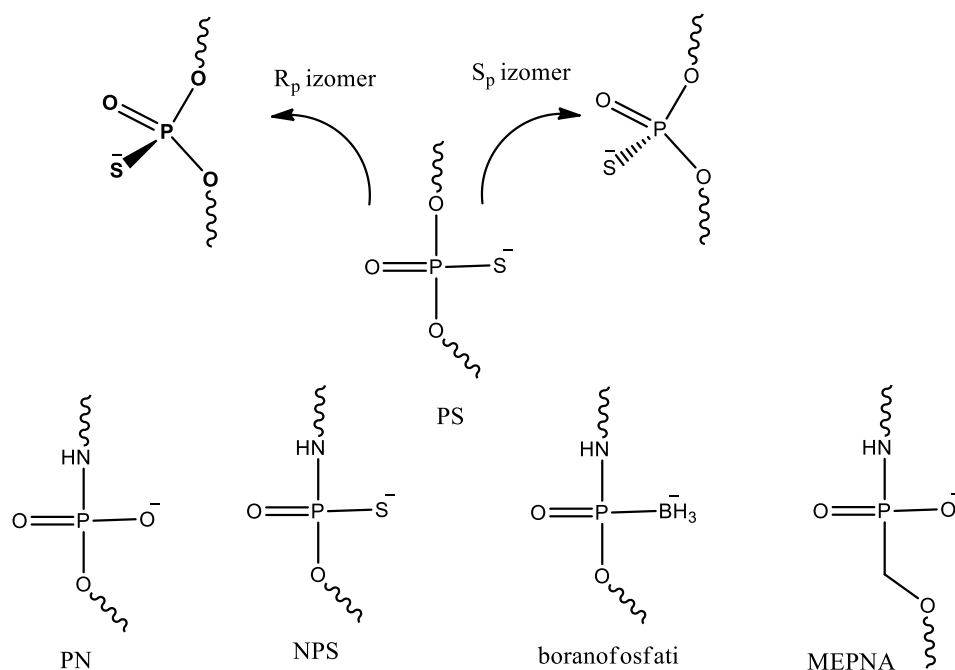
Osim toga, pripremljen je čitav niz analoga nukleinskih kiselina koje sadrže metilni ili etilni most između 2'- i 4'-ugljikovog atoma riboze, a u kojima su pojedini atomi u mostu zamijenjeni s dušikom ili kisikom (strukturne formule N-MeO-amino BNA, 2',4'-BNA^{NC}, 2',4'-BNA^{COC} i

(CeNA) te 2'-endopiranozna nukleinska kiselina koja nastaje uvođenjem dvostruke veze u piranozni prsten.^{8,9}

Povećanjem broja ugljikovih atoma u prstenu nastaje nukleinska kiselina koja sadrži sedmeročlani prsten oksepna (engl. *oxepane nucleic acid*). Primijećeno je da je u odnosu na prirodne nukleinske kiseline otpornija na djelovanje nukleaza, no zbog toga što ima slabije djelovanje na aktivaciju RNaze H ne koristi se u kliničke svrhe.⁸

2.1.3. Ksenonukleinske kiseline s modificiranom fosfodieterskom vezom

Modifikacije u fosfodieterskom mostu prikazane na slici 17. prisutne su u velikom dijelu *antisense* oligonukleotida koji su komplementarni nekoj mRNA.⁸



Slika 17. Strukturne formule ksenonukleinskih kiselina s modificiranom fosfodieterskom vezom – preuzeto iz⁸

Fosforotiolatni nukleotidi (PS) imaju kisikov atom u fosfodieterskoj vezi zamijenjen sa sumporovim atomom, čime su poboljšana fizikalno-kemijska svojstva. Osim toga primijećeno je da uvođenjem sumporova atoma nastaje kiralni centar čime se tijekom sinteze stvara smjesa dijastereoizomera. Tipovi stereoizomera prikazani na slici 17. su R_p i S_p , razlikuju se prema otpornosti na djelovanje nukleaza, topljivosti u vodi, te afinitetu vezanja na nukleinske kiseline. Usporedbom oligonukleotida koji nastaje povezivanjem nukleotida R_p konfiguracije s oligonukleotidima koji nastaje povezivanjem S_p nukleotida primijećeno je da R_p oligonukleotidi

imaju veći afinitet vezanja na komplementarnu RNA, dok je S_p otpornija na djelovanja nukleaza što je objašnjeno steričkim razlozima tijekom stvaranja dvostruke zavojnice. Fosforamidati (PN) imaju kisikov atom u fosfodieterskoj vezi na 3'-položaju zamijenjen sa NH grupom, čime je povećana otpornost na nukleaze i uklonjena kiralnost.⁸

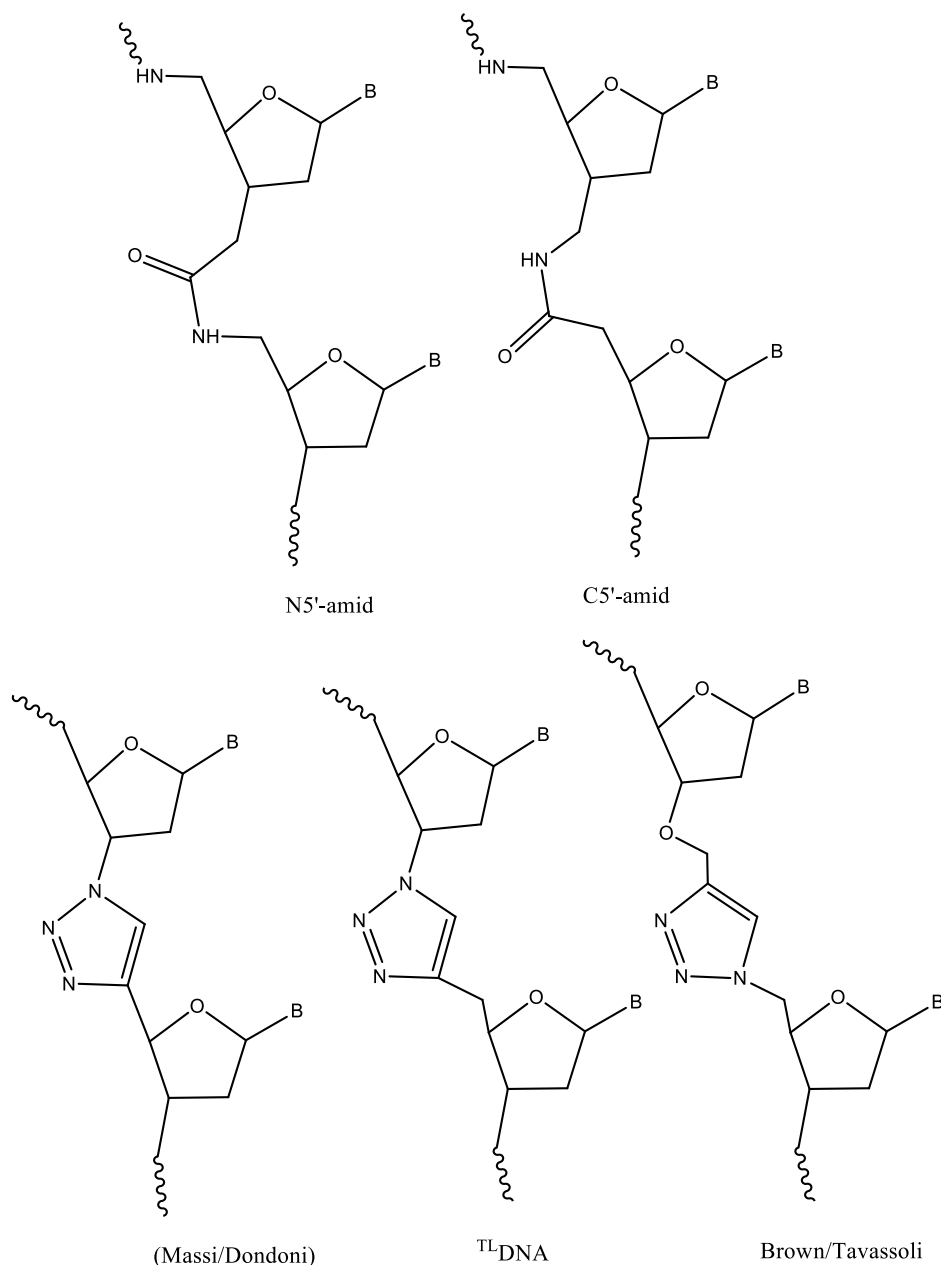
Boranofosfati imaju kisikov atom u fosfodieterskoj vezi zamijenjen s boranom (BH_3^- skupinom). Kao i fosfortiolati mogu se replicirati PCR metodom pomoću modificirane *Taq*-DNA-polimeraze,⁴ no imaju smanjen afinitet vezanja na komplementarnu RNA, pa im je upotreba u kliničke svrhe ograničena.⁸

Među posljednje sintetiziranim oligonukleotidima su 5'-*O*-metilenfosfati (MEPNA) koje imaju jednu više metilensku skupinu između kisikova atoma na položaju 5' i atoma fosfora.⁸

2.1.4. Ksenonukleinske kiseline s neutralnim mostom

Drugi pristup u modifikaciji fosfodieterskog mosta je uklanjanje negativnog naboja fosfatne skupine čime se smanjuje nepovoljno odbijanje između dva lanca, što povećava afinitet vezanja na komplementarne nukleinske kiseline. Pri tome se koristi amidna skupina ili heterociklički spoj triazol koji se sastoji od peteročlanog prstena sa dva ugljikova, te tri dušikova atoma.²³

Primijećeno je da se korištenjem različitih karbamata i uree koji povezuju okosnicu nukleinskih kiselina destabiliziraju nukleinske kiseline, dok se korištenjem amidne skupine stabiliziraju nukleinske kiseline. Kao što je prikazano na slici 18. amidna skupina može biti povezana preko N5'- ili C5'-atoma, pri čemu N5'-amid pokazuje bolja svojstva. S druge strane, modifikacije triazolnih prstena pokazuju visoku otpornost na razgradnju nukleaza te visoki afinitet vezanja na komplementarnu DNA. Zbog povoljnih svojstava načinjen je čitav niz analoga, od kojih se najviše ističe *Brown/Tavassoli* koji sadrži LNA međusobno povezan triazolima.⁸



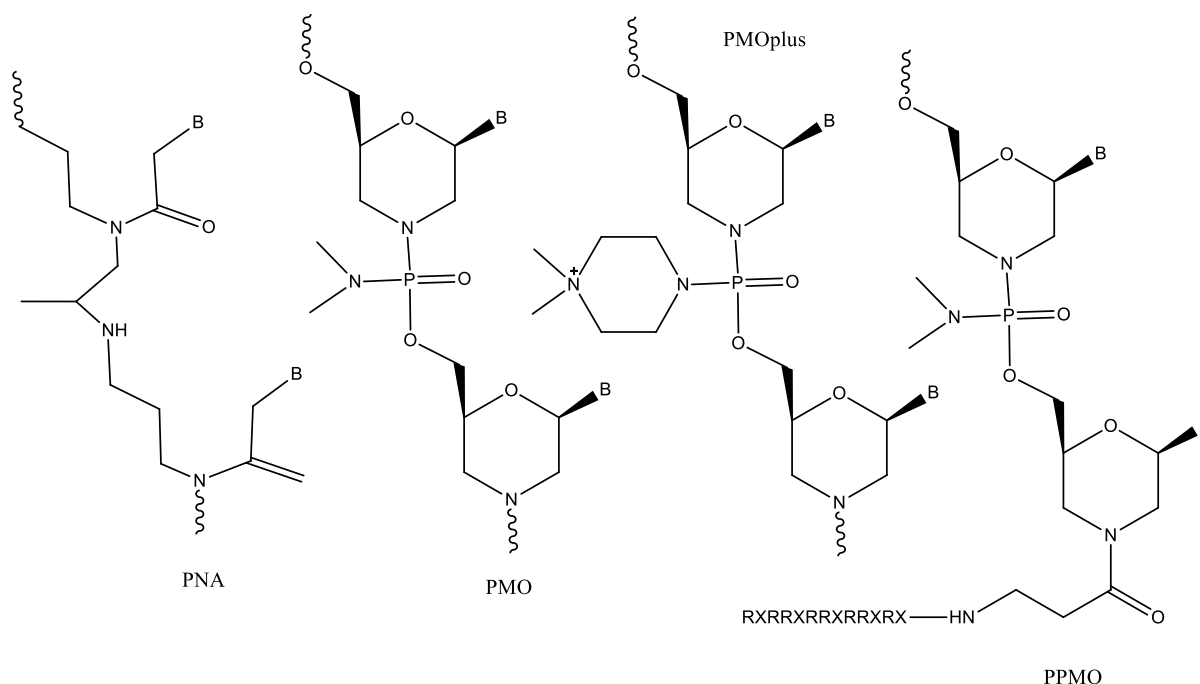
Slika 18. Strukturne formule ksenonukleinskih kiselina s neutralnim mostom (oznaka B označava jednu od Watson-Crickovih dušičnih baza) – preuzeto iz⁸

2.1.5. Ksenonukleinske kiseline s modificiranom okosnicom

Skupina ksenonukleinskih kiselina koje imaju u potpunosti zamijenjeni fosfodiesterski i šećerni dio, poput peptidne nukleinske kiseline (PNA) i fosforodiamidatnih morfolino oligonukleotida (PMO), imaju zbog svoje elektroneutralnosti drastično različita svojstva u odnosu na prirodne nukleinske kiseline. PNA umjesto šećerne okosnice povezane fosfodiesterskim vezama sadrži N-2-amino-etilglicinske jedinice povezane peptidnim vezama, pri čemu se dušične baze

kovalentno spajaju na okosnicu karboksimetilnom vezom. Redosljed dušičnih baza dogovorno se navodi od N-kraju prema C-kraju (analogija s aminokiselinama u proteinu). Zbog njezine strukture, PNA je prilično inertna na djelovanje enzima – proteaza ili nukleaza. Godine 2012. pronađen je nasljedni materijal u cijanobakterijama koji nalikuje na PNA, pa se PNA smatra prethodnikom nukleinskih kiselina. Osim toga, dva lanca PNA mogu činiti dvostruku zavojnicu ili lanac PNA može raditi dvostruku zavojnicu s lancem DNA ili RNA (osobitosti trodimenzijske strukture PNA opisane u sljedećem poglavlju). Zbog navedenog, PNA ima široke primjene u molekularnoj dijagnostici i u kliničke svrhe. Kako bi se spriječila slaba topljivost u vodi glicinske jedinice mogu se zamijeniti s drugim aminokiselinama poput lizina ili arginina pri čemu se uvodi pozitivni naboj. Osim toga, uvođenjem cikličkih skupina u okosnicu poput cikloheksila ili ciklopentila doprinosi povećanju rigidnosti, te afiniteta vezanja na komplementarni lanac. Uvođenjem različitih neprirodnih dušičnih baza stvaraju se PNA različitih upotreba, od kojih se posebno ističe fluorescentni 2-aminopurin koji se vodikovom vezom sparuje s timinom ili uracilom, pa se može koristiti u kinetičkim ispitivanjima.^{4,8,10,11}

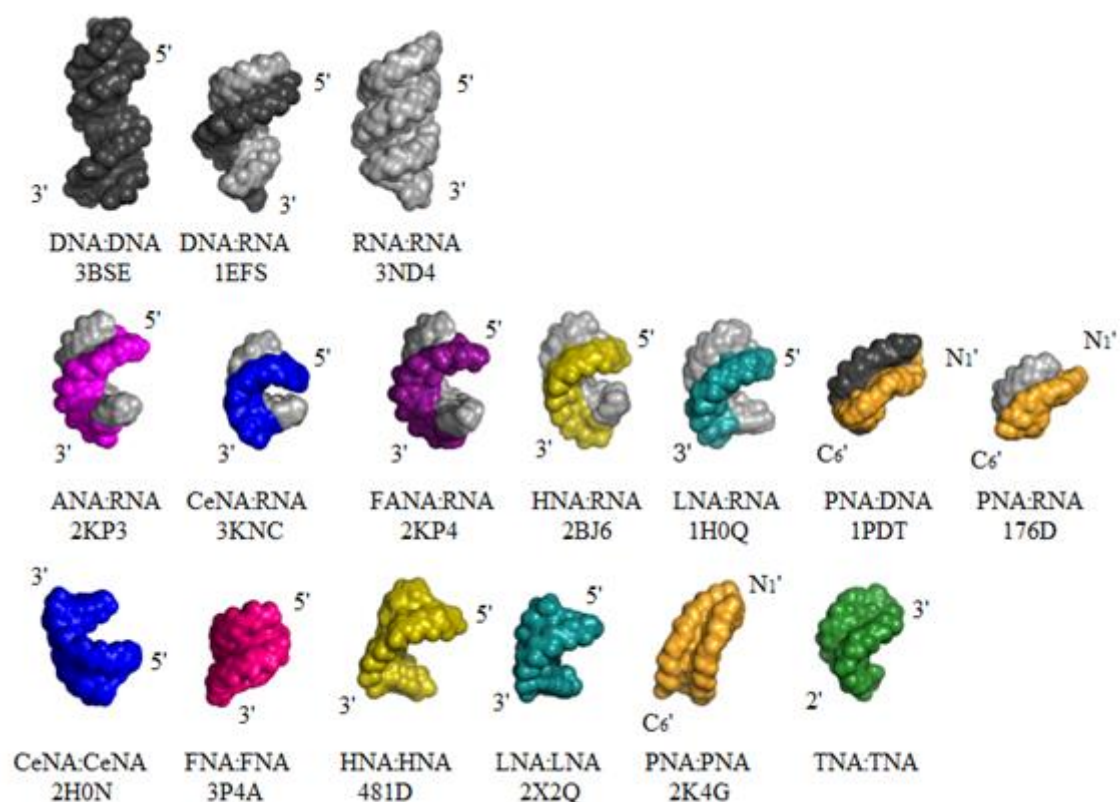
Drugi tip ksenonukleinskih kiselina ove skupine su morfolino ili fosforodiamidatni morfolino oligomeri (PMO). U strukturi PMO nalaze se jedinice heterocikličkog spoja morfolina (sustavnim imenom 1-oksa-4-azacikloheksan) međusobno povezane s fosforodiamidatnom vezom. Zbog toga je PMO električni neutralan, dobro topljiv u vodi i otporan na djelovanje nukleaza. Razvijene su modifikacije PMO od kojih se ističu PMO plus i PPMO, čije su strukturne formule prikazane na slici 19. PMO plus nastaje uvođenjem piperazina u fosforodiamidatnu vezu što doprinosi boljoj topljivosti zbog stvaranja pozitivnog naboja. S druge strane, bolja topljivost pozitivno nabijenog derivata PMO u peptidno-konjugiranoj PMO (PPMO) postiže se time što posljednji nukleotid sadrži niz arginina povezanih peptidnom vezom.^{4,8,10,}



Slika 19. Strukturne formule ksenonukleinskih kiselina s modificiranom okosnicom (oznaka B označava jednu od Watson-Crickovih dušičnih baza) – preuzeto iz^{4,15}

2.1.6. Osobitosti trodimenzijske strukture ksenonukleinskih kiselina

Osnovne tehnike kojima se određuje trodimenzijska struktura nukleinskih (i ksenonukleinskih) kiselina su tehnike rendgenske kristalografije (difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalnom uzorku) i nuklearne magnetske rezonancije. Istraživanja započinju u drugoj polovici 20. stoljeća kada je određena kristalna struktura oligonukleotida DNA. Primijećeno je da se trodimenzijske strukture ksenonukleinskih kiselina značajno razlikuju od trodimenzijske strukture prirodnih nukleinskih kiselina, pri čemu se događaju preorganizacije u strukturi kako bi se očuvala stabilnost, odnosno postoje brojne konformacije između A i B forme dvostruke zavojnice. Osim toga, primijećeno je da različite XNA mogu stvarati XNA – XNA zavojnice koje su prikazane na slici 20., pri čemu se njihove strukture prilično razlikuju ovisno o kojoj se XNA radi. Strukture TNA – TNA ili HNA – HNA su prilično slične A-formi RNA zavojnice, za razliku od CeNA koja tvori lijevu antiparalelnu, zrcalnu A-formu zavojnice.¹³



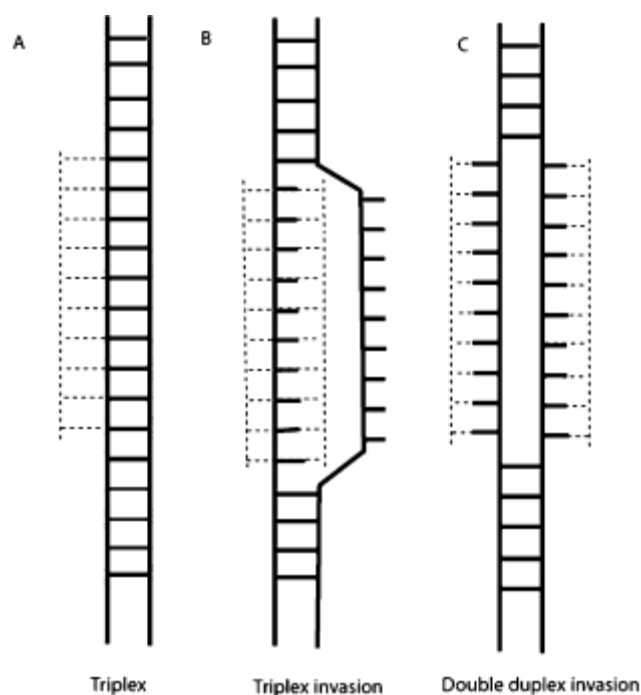
Slika 20. Prikaz trodimenzijske strukture nukleinskih i ksenonukleinskih kiselina – preuzeto iz¹³

U prvom redu prikazane su trodimenzijske strukture prirodnih nukleinskih kiselina. U drugom redu prikazano je sparivanje između XNA (lanac XNA ima označenu orijentaciju) i RNA (ili DNA). U trećem redu prikazane su XNA-XNA zavojnice (lanac XNA ima označenu orijentaciju). Pojedine strukture nukleinskih i ksenonukleinskih kiselina poredane su abecednim redom, označene različitim bojama i troslovnim kraticama. Ispod strukture (osim za TNA:TNA zavojnicu) dan je PDB ID kod koji označava detaljnije strukture dostupne u

Protein Data Bank

Također XNA mogu (ili ne moraju) se sparivati sa DNA i / ili RNA. Zanimljivo je da PNA može stvarati PNA – RNA, PNA – DNA zavojnicu te čak PNA – PNA – DNA triplet. Razlog zbog čega se stvaraju takvi kompleksi je neutralnost PNA zbog čega ne dolazi do odbijanja između komplementarnih lanca kao što dolazi između lanaca DNA – DNA, te RNA – RNA. Zbog toga su PNA – PNA zavojnice stabilnije nego PNA – DNA ili PNA – RNA zavojnice. PNA – DNA zavojnice mogu biti antiparalelne (niz konformacija između A i B-forme), te

paralelne (koja su pretežito u B-konformaciji). Stabilnost PNA – DNA zavojnice ovisi o omjeru purinskih i pirimidinskih baza, te o ionskoj jakosti otopine. Primijećeno je da povećanjem ionske jakosti dolazi do destabilizacije PNA – DNA i PNA – RNA zavojnica, za razliku od DNA – DNA zavojnice kod koje dolazi do stabilizacije. PNA – PNA – DNA triplet prikazan na slici 21. nastaje tako da se na PNA – DNA zavojnicu (koja je povezana Watson-Crickovim vodikovim vezama) veže homopirimidinski lanac PNA vodikovim vezama. Osim toga, moguće je da triplet nastaje tako da se dva lanca homopirimidinskih PNA vežu na homopurinsku DNA (pojava koja se naziva *triplet invasion*). Ako PNA sadrži nestandardne baze moguće je stvaranje *double duplex invasion* odnosno da dvije molekule PNA razaraju DNA – DNA zavojnicu (pri čemu nastaju dvije PNA – DNA zavojnice). Primijećeno je da i HNA, TNA, LNA, ANA, FANA i CeNA grade stabilne komplekse XNA – DNA, te XNA – RNA.^{10,15}



Slika 21. Shematski prikaz nastajanja tripleta PNA – PNA – DNA – preuzeto iz¹⁰

Različiti kompleksi XNA – DNA i XNA – RNA mogu se koristiti za detekciju nukleinskih kiselina primjerice pomoću tzv. molekularnih sonda (engl. *molecular beacons* - MB). Najjednostavnija vrsta može se opisati kao oligonukleotid koji sadrži fluorescentne boje (derivate *thiazole orange*). U otopini se primjećuje niska fluorescencija, no vezivanjem XNA

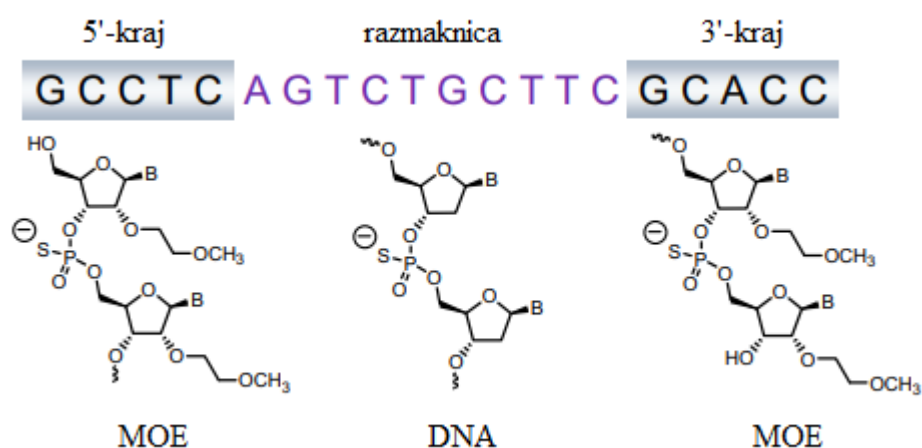
na nukleinsku kiselinu, dolazi do interkalacije fluorescentne boje među dušične baze što uzrokuje povećanje fluorescencije.¹⁴

2.2. Upotreba ksenonukleinskih kiselina

2.2.1. Upotreba XNA kao antisense oligonukleotida

Antisense oligonukleotidi (ASO) su vrsta jednolančanih sintetskih oligonukleotida duljine 16 – 20 nukleotida koji vezanjem vodikovim vezama za komplementarnu mRNA aktiviraju ribonukleazu H (RNazu H). Ribonukleaza H katalizira hidrolizu mRNA u dvostrukoj zavojnici ASO – mRNA, što uzrokuje razgradnju odabrane mRNA. Zameckin i Stephenson¹⁵ su 1978. godine dokazali da sintetski ASO koji je komplementaran terminalnoj sekvenci Rous sarcoma virusa može inhibirati njegovu replikaciju i translaciju proteina, čime je spriječena pojava bolesti. Time je pokazano da ASO mogu biti sigurni i efikasni reagensi za liječenje bolesti. No, postavlja se pitanje zašto je bilo potrebno tako dugo vremensko razdoblje od otkrića sintetskih ASO do kliničke primjene? Odgovor na to pitanje leži u činjenici da odabrana sekvenca koja sadrži ASO mora inhibirati samo jednu komplementarnu sekvencu mRNA, bez da se veže na druge stanične mRNA čime se spriječava translacija samo jednog određenog proteina. Osim toga, postoji problem s apsorpcijom ksenonukleinskih kiselina u stanicu koje se razgrađuju pod djelovanjem nukleaza izvan stanice i strane nukleinske kiseline prepoznaje imunostanični sustav koji ih uništava. Tek 1998. godine odobren je prvi lijek fomivirsen (Vitravene[®]) koji se koristi za liječenje citomegalovirusne infekcije u pacijentima pozitivnim na HIV. Pripada skupini fosfotiolata (prikazanih na slici 17.).^{5,12, 15-18}

U narednim godinama razvijena je sljedeća generacija ASO kojoj pripada mipomersen (Kynamro[®]). Mipomersen je odobren 2013. godine i koristi se za liječenje homozigotne porodične hiperkolesterolemije. Njegova struktura, prikazana na slici 22. sastoji se od 20 nukleotida povezanih fosforotiolatnom vezom. Osim toga, kod prvih 5 nukleotida i posljednjih 5 nukleotida je na 2'-ugljikovom atomu riboze hidroksilna skupina supstituirana s metoksietilom (MOE RNA čija je struktura dana na slici 14.), te dušične baze citozin i uracil su metilirane na petom ugljikovom atomu, kako bi struktura bila otpornija na djelovanje nukleaza. Središnji dio (od 6. do 15. nukleotida) naziva se razmaknica (engl. *gap*) koja ima svojstvo da je ne prepoznaje RNaza H, zbog čega je lijek stabilniji i veže se na mRNA s većim afinitetom.^{16, 18}



Slika 22. Shematski prikaz strukture mipomersen (Kynamro[®]) – preuzeto iz¹⁸

Daljnja istraživanja provedena su sa 2'-deoksi-2'-fluoroarabino nukleotidima (FANA) povezanih fosfotiolatnom vezom. Upotrebom FANA povećana je otpornost na nukleaze, te je stabilnija dvostruka zavojnica FANA–RNA koju prepoznaje RNaza H.⁵

„Rigidna“ nukleinska kiselina (LNA) povezana fosfotiolatnom vezom potencijalni je ASO reagens zbog svojeg visokog afiniteta za vezanje na komplementarni RNA lanac. No, nažalost istraživanja su pokazala da imaju slabe farmakokinetičke parametre i uzrokuju oštećenje jetre. Zbog toga je pripravljen čitav niz analoga BNA (prikazanih na slici 15.) koji nisu toksični i budući su kandidati za istraživanja.⁵

2.2.2. Upotreba XNA kao oligonukleotida koji sterički blokiraju translaciju

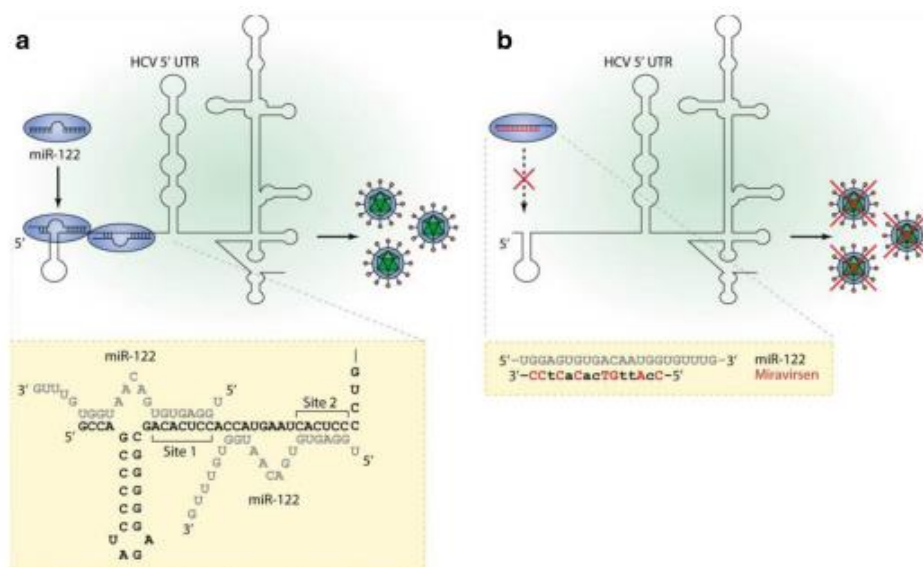
Oligonukleotidi koji sterički blokiraju translaciju su najčešće oligonukleotidi PNA koji se vežu na komplementarnu mRNA sekvencu u blizini START kodona (AUG kodon) stvarajući stabilnu PNA – mRNA dvostruku zavojnicu čime se blokira vezanje ribosoma na mRNA što onemogućuje inicijaciju translacije. Za razliku od ASO, XNA oligonukleotidi koji sterički blokiraju translaciju ne dovode do degradacije mRNA.^{10,15}

2.2.3. Upotreba XNA kao oligonukleotida uključenih u regulaciju ekspresije gena RNA interferencijom

Mehanizam RNA interferencije (engl. *RNA interference* – *RNAi*) prvi je put opisan 1993. godine u obliku (*Caenorhabditis elegans*) u kojem je primijećeno da kratke dvolančane molekule RNA aktiviraju određene nukleaze i na taj način reguliraju ekspresiju gena. Prilikom

transkripcije RNA-polimeraza II sintetizira prekursore kratkih dvolančanih nekodirajućih molekula RNA koje se nazivaju mikro RNA (engl. *micro RNA – miRNA*). Prekursure miRNA molekula modificiraju endonukleaze Drosha i Dicer, pri čemu se stvaraju zrele miRNA molekule. Tada se miRNA molekula povezuje s utišavajućim kompleksom induciranim s RNA (engl. *RNA-induced silencing complex – RISC*) pri čemu nastaje miRISC kompleks. Stvaranjem tog kompleksa miRNA se veže na ciljnu mRNA, pri čemu o razini komplementarnosti ovisi hoće li se mRNA u potpunosti razgraditi (u slučaju da je miRNA u potpunosti komplementarna mRNA) ili samo blokirati translaciju (ako je miRNA djelomično komplementarna).^{2,16,24}

Procjenjuje se da je ekspresija čak 60% ljudskih gena regulirana putem miRNA. Zbog pojave različitih bolesti miRNA može izgubiti svoju funkciju, pa su razvijeni miRNA inhibitori, koji se nazivaju antimir ili antagomir, koji sterički blokiraju miRNA. Jedan od takvih primjera je Miravirsen[®] koji se koristi za liječenje infekcije hepatitisom C. U strukturi se nalaze ribonukleotidi i LNA nukleotidi povezani fosfotiolatnom vezom koji su komplementarni 5'-regiji miR-122. U stanicama jetre pacijenata koji su zaraženi hepatitisom C miRNA-122 se veže u kompleksu s AGO2 endonukleazom na 5'-UTR regiju mRNA, što štiti virusnu RNA od hidrolize nukleazama. Kao što je prikazano na slici 23., Miravirsen[®] onemogućuje vezanje miRNA-122 na tu regiju, pri čemu se sprječava replikacija hepatitis C virusa. Osim toga, u daljnjim istraživanjima korištene su slične modifikacije za suzbijanje rasta tumora.^{5,16,19,24}



Slika 23. Shematski prikaz strukture i djelovanja Miravirsena[®] – preuzeto iz¹⁸

Pod oznakom a) je prikazano stanje razvitka bolesti (miRNA-122 nalazi se na 5'-UTR regiji).

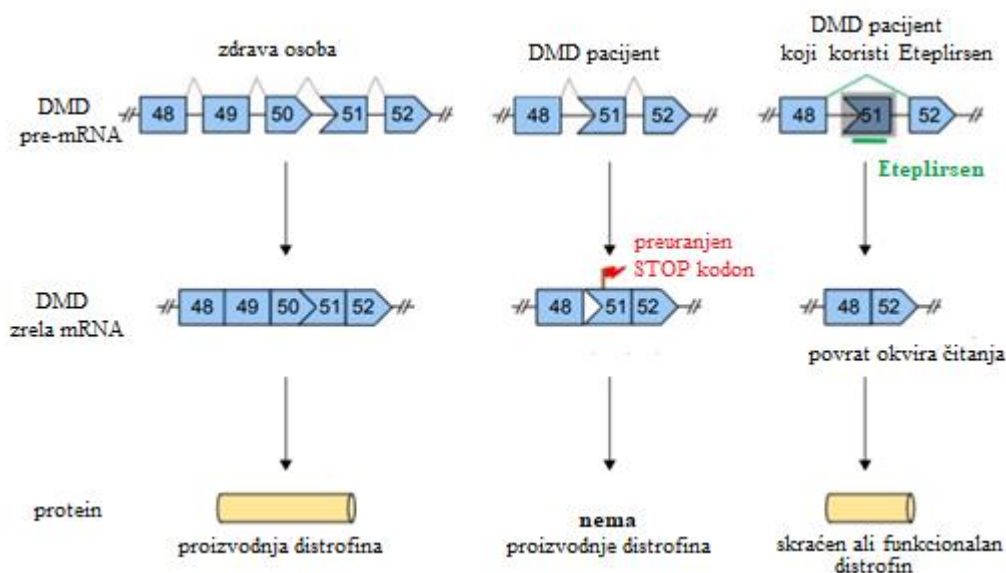
Pod oznakom b) je prikazano djelovanje Miravirsena[®], koji blokira vezanje miRNA-122 na 5'-UTR regiju)

Male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNAs – siRNAs*) su dvolančane molekule RNA duljine 21 – 22 nukleotida. Vezanjem siRNAs za endonukleazu Dicer nastaje oblik siRNAs koji aktivira RISC kompleks. Endonukleaza Argonaut 2 (AGO2) je jedna od komponenti RISC kompleksa koja hidrolizira jedan od lanca siRNA. Drugi lanac siRNA veže se za komplementarni lanac mRNA, pri čemu nastaje dvostruka zavojnica siRNA – mRNA, koja aktivira endonukleazu AGO2 što uzrokuje razgradnju ciljane mRNA. Problemi siRNA kao što su njihova podložnost djelovanju nukleaza ili loša farmakokinetička svojstva uklonjeni su modifikacijama. Kao i u prethodnim primjerima, upotreba fosforotilatnih povezanih nukleotida uzrokuje veću otpornost na djelovanje nukleaza. Osim toga, uočeno je da kemijske modifikacije na 2'-položaju riboze uzrokuju povećanje stabilnosti i bolje vezanje za ciljnu mRNA, primjerice 2'-flouro ili 2'-O-alkil siRNA (korišteni su 2'-O-metoksi siRNA za terapiju senilne makularne degeneracije). Uvođenjem nekoliko nukleotida „nerigidne“ nukleinske kiseline (UNA) može se utvrditi koji su položaji u siRNA molekuli presudni za njezinu ulogu. Osim toga, upotrebom siRNA koja sadrži LNA nukleotide u tim položajima primijećen je veći afinitet vezanja za komplementarni lanac mRNA, te veća otpornost na djelovanje nukleaza, pa su takve siRNA budući kandidati za istraživanja.^{2,15,19,24}

2.2.4. Upotreba XNA kao oligonukleotida uključenih u proces prekrajanja

Kao što je prije naglašeno, proces nastanka zrele mRNA u eukariotskim stanicama vrlo je kompleksan. Unutar primarnog transkripta razlikuju se dva dijela – eksoni (dijelovi koji kodiraju proteine, odnosno eksprimirani sljedovi) i introni (dijelovi koji ne kodiraju proteine, odnosno intervencijski sljedovi). Proces u kojem se introni izrezuju, a eksoni povezuju naziva se prekrajanje (engl. *splicing*). Taj proces može se događati uz djelovanje velikog ribonukleoproteinskog kompleksa za prekrajanje (engl. *spliceosome*) koji sadrži katalitičke male jezgrine ribonukleoproteinske čestice (engl. *small nuclear ribonucleoproteins – snRNPs*) ili RNA prekraja samu sebe procesom samoprekrajanja (engl. *self-splicing*) bez djelovanja dodatnih proteina ili enzima. Alternativno prekrajanje (engl. *alternative splicing*) je proces u kojem se iz istog primarnog transkripta dobivaju različite zrele mRNA uključivanjem ili isključivanjem različitih introna i / ili eksona ovisno o tkivu u kojem se događa. Procjenjuje se da mutacije koje nastaju tijekom procesa prekrajanja i alternativnog prekrajanja uzrokuju 50% ljudskih genetskih bolesti.^{1,2,5,16}

Duchenne mišićna distrofija (DMD) je genetska bolest do koje dolazi zbog mutacije gena odgovornog za kodiranje proteina distrofina što uzrokuje gubitak pokretljivosti te smrt zbog gubitka respiratornih i kardiovaskularnih funkcija u ranoj životnoj dobi. Gen za distrofin je najduži gen u ljudskom genomu koji sadrži 2,4 milijuna parova baza sa 79 eksona, koji čine zrelu mRNA duljine 14 tisuća parova baza. Kod pacijenata s Beckerovom mišićnom distrofiom događa se delecija koja ne uzrokuje pomak okvira čitanja, pa pacijenti imaju blaži oblik bolesti jer se uspijeva proizvoditi oblik distrofina koji je funkcionalan. Nažalost, kod DMD dolazi do delecije koja uzrokuje pomak okvira čitanja i preuranjeni STOP kodon zbog čega se distrofin ne može proizvoditi. Procjenjuje se da 20% pacijenata imaju deleciju na kraju eksona broj 50 ili na početku eksona broj 52. Preskakanjem eksona broj 51 vraća se okvir čitanja, čime se dobiva skraćeni funkcionalni oblik distrofina, pa se ublažavaju simptomi te bolesti.^{15,20}



Slika 24. Prikaz djelovanja Eteplirsena[®] – preuzeto iz²⁰

U prvom redu je prikazan dio primarnog transkripta za gen distrofin (lijevo je prikazano kod zdrave osobe, u sredini kod DMD pacijenta i desno kod DMD pacijenta koji koristi Eteplirsena[®]). Kod DMD pacijenta se zbog delecije događa preuranjen STOP kodon (crvena zastavica na 51. eksonu), pa nema proizvodnje distrofina. Kod DMD pacijenta koji koristi Eteplirsena[®] (označen zelenom linijom) se hibridizira 51. ekson, što uzrokuje njegovo preskakanje i proizvodnju skraćenog, ali funkcionalnog distrofina.

Početna istraživanja vršila su s ribonukleotidima povezanim fosfotiolatnim mostom kod kojih je na 2. ugljikovom atomu riboze hidroksilna skupina supstituirana s metoksimetilom

(2'-*O*-MePS), pri čemu je razvijen drisapersen (Kyndrisa[®]). Osim toga, vršena su ispitivanja sa PMO (čija je struktura prikaza na slici 19.), pri čemu je razvijen Eteplirsen[®] (2016. godine FDA je odobrila njegovo korištenje). Klinički testovi na životinjama pokazuju da su pojedine skupine životinja imale više razine distrofina korištenjem PMO nego u usporedbi kad su dobivale 2'-*O*-MePS, pa se fokus istraživanja usmjerio na PMO. Kao što je naglašeno na slici 24. Eteplirsen[®] (označen zelenom oznakom) hibridizira sa 51. eksonom, što uzrokuje preskakanje tog eksona, čime se vraća okvir čitanja. No, tijekom kliničkih testova na životinjama primijećene su niske razine distrofina u srčanom tkivu. Zbog toga razvijene su sljedeće generacije XNA – poput peptidno-konjugirane PMO (PPMO – struktura prikazana na slici 19.). Iako su studije još u tijeku primijećeno je da PPMO pokazuje bolja svojstva.^{15,20}

2.3. Zaključak i buduća istraživanja

U ovom radu prikazan je pregled spoznaja o ksenonukleinskim kiselinama i o njihovom korištenju u kliničke svrhe. Ksenonukleinske kiseline (XNA) su skupina sintetskih genetičkih polimera⁴ odnosno kemijski modificiranih analoga nukleinskih kiselina. Pojedine skupine XNA su XNA s kemijskim modifikacijama dušičnih baza, šećernog dijela, XNA s modifikacijama fosfodieterskog mosta (koji može biti nabijen ili može postojati neutralan) i modifikacije u kojima je u potpunosti zamijenjen fosfodieterski most i šećerni dio. Najvažnije XNA koje imaju praktičnu primjenu su PNA, PMO i LNA. U drugom dijelu rada opisani su pojedini pristupi korištenja XNA u kliničke svrhe. *Antisense* oligonukleotidi vežu se na mRNA, čime aktiviraju ribonukleazu H (RNazu H), što uzrokuje razgradnju komplementarnih mRNA. S druge strane vezanjem XNA u blizini mjesta inicijacije translacije sterički se blokira translacija. Osim toga, XNA se mogu uključiti u regulaciju genske ekspresije putem RNA interferencije ili u proces prekrajanja (engl. *splicing*). U radu je dan pregled odobrenih lijekova čija se strukture temelje na XNA (Vitravene[®], Kynamro[®], Miravirsen[®] i Eteplirsen[®]). Osim toga, XNA se mogu koristiti kao antibakterijski ili antivirusni reagensi.

Iako u ovom radu nije obuhvaćena ksenobiologija i XNAzimi jedan od ciljeva kojem teže sintetski biolozi je stvoriti XNA koja bi poput prirodnih nukleinskih kiselina bila sposobna prenositi nasljedne informacije. Odnosno, želja je stvoriti XNA i modificiranu polimerazu koja bi vršila transkripciju i reverznu transkripciju genetičke (nasljedne) informacije, čime bi se stvorila ortogonalna stanica s nukleinskim kiselinama koje bi bile neovisne od prirodnih nukleinskih kiselina.¹³ Do sada je korištenjem modificirane polimeraze i reverzne transkriptaze

uspješno prenesena informacija između pojedinih vrsta XNA i DNA (u smjeru DNA → HNA → DNA ili DNA → TNA → DNA).⁹

Područje istraživanja ksenonukleinskih kiselina u posljednjih nekoliko godina doživljava procvat. Zbog intenzivnih istraživanja koja se provode, nemoguće je procijeniti što će sve u budućnosti otkriti. Ipak, prema Peteru Druckeru to nije važno jer „najbolji način za predvidjeti budućnost je stvoriti ju!“²²

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 107–130.; 783–916.
2. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger – Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2013, str. 281–305.; 1009–1195.
3. G. L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 2013, str. 71–84.
4. Q. Ma, D. Lee, Y.Q. Tan, G. Wong, Z. Gao, *Synthetic genetic polymers : advances and applications*, *Polym. Chem.* **7** (2016) 5199–5216.
5. K. Morihira, Y. Kasahara, S. Obika, *Biological applications of xeno nucleic acids*, *Mol. BioSyst.* **13** (2017) 235–245.
6. V. B. Pinheiro, P. Holliger, *The XNA world: progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16** (2012) 245–252.
7. I. Hirao, M. Kimoto, *Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma*, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **88(7)** (2012) 345–367.
8. J. K. Watts *The Medicinal Chemistry of Antisense Oligonucleotides*, u N. Ferrari, R. Seguin (ur.), *Oligonucleotide-Based Drugs and Therapeutic*, Vol. 2, John Wiley & Sons, New York, 2018, str. 39.–68.
9. V. B. Pinheiro, D. Loakes, P. Holliger, *Synthetic polymers and their potential as genetic materials*, *BioEssays* **35** (2012) 113–122.
10. S. Karkare, D. Bhatnagar, *Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71** (2006) 575–586.
11. A. Gupta, A. Mishra, N. Puri, *Peptide nucleic acids: Advanced tools for biomedical applications*, *J. Biotechnol.* **259** (2017) 148–159.
12. J. Summerton, D. Weller, *Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7** (1997) 187–195.
13. I. Anosova, E. A. Kowal, M. R. Dunn, J. C. Chaput, W. D. Van Horn, M. Egli, *Survey and summary – The structural diversity of artificial genetic polymers*, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) 1007–1021.

14. Q. Wang, L. Chen, Y. Long, H. Tian, J. Wu, *Molecular Beacons of Xeno-Nucleic Acid for Detecting Nucleic Acid, Theranostics* **3** (2013) 395–408.
15. R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, *RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides, Nat. Rev. Drug Discovery*. **11** (2012) 125–140.
16. A. Aartsma-Rus, A. L. Jackson, A. A. Levin, *Mechanisms of Oligonucleotide Actions*, u N. Ferrari, R. Seguin (ur.), *Oligonucleotide-Based Drugs and Therapeutic*, Vol. 1, John Wiley & Sons, New York, 2018, str. 1. –22.
17. <https://www.rxlist.com/vitravene-drug.htm> (pristupljeno 25. kolovoza 2020. godine)
18. R. S. Geary, B. F. Baker, S. T. Crooke, *Clinical and Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mipomersen (Kynamro)[®]: A Second-Generation Antisense Oligonucleotide Inhibitor of Apolipoprotein B, Clin. Pharmacokinet.* **54** (2015) 133–146.
19. R. Tinze de Almeida, C. David, S. S. Tinze de Almeida, *The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market, Pharm. Res.* **34** (2017) 1339–1363.
20. K. R. Lim, R. Maruyama, T. Yokota, *Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy, Drug Des., Dev. Ther.* **11** (2017) 533–545.
21. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction (pristupljeno 27. kolovoza 2020. godine)
22. M. Schmidt, *Xenobiology : A new form of life as the ultimate biosafety tool, in the treatment of Duchenne muscular dystrophy, BioEssays* **32(4)** (2010) 322–331.
23. <https://en.wikipedia.org/wiki/Triazole> (pristupljeno 28. kolovoza 2020. godine)
24. M. Mustač, *RNA interferencija u genskoj terapiji*, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, 2001, str. 1–18.