

PETRA MÉNOVÁ, JITKA DAĐOVÁ, MICHAL HOCEK

Jak syntetizovat umělé DNA, navíc s modifikovanými bázemi

Uměle připravená a upravená DNA nalézá stále větší uplatnění v diagnostice, lékařské chemii, chemické biologii i v materiálových aplikacích. Kromě klasických chemických syntéz se nám otevřely velké možnosti s využitím syntézy enzymatické. Na tomto poli lze v blízké budoucnosti očekávat řadu nových objevů i praktických aplikací.

1. Struktura DNA dvoušroubovice a párování bází. Obě vlákna drží pospolu díky nevazebným interakcím, vodíkovým můstkům mezi protilehlými bázemi a π - π -patrovým (stacking) interakcím s předchozím a následujícím párem bází. Báze se spolu párují podle jednoduchého pravidla – proti adeninu je vždy thymin a proti guaninu cytosin. DNA dvoušroubovice je vytvořena z PDB (1BNA).

Deoxyribonukleová kyselina (DNA – z anglického deoxyribonucleic acid) je nositelkou genetické informace všech buněčných organismů. V buňkách se DNA vyskytuje v podobě dvoušroubovice, jejíž strukturu objasnili v roce 1953 vědci J. Watson a F. Crick (Nobelova cena v roce 1962). DNA v sobě kóduje informace o struktuře, vlastnostech a vývoji celého organismu. V bakteriích (prokaryotických buňkách) se DNA nachází volně v cytoplazmě, zatímco v buňkách rostlin a živočichů (eukaryotických buňkách) je DNA uložena zejména uvnitř buněčného jádra ve formě chromatinu. Strukturou je DNA biologická makromolekula – polymer složený z řetězce nukleotidů. Každý nukleotid obsahuje sacharid deoxyribózu, fosfátovou skupinu a jednu ze čtyř nukleobází – adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a thymin (T). Právě pořadí těchto bází kóduje genetickou informaci uloženou v DNA. Dvoušroubovici DNA tvoří dvě navzájem spletená vlákna mířící opačných směrem (obr. 1).

V posledních desetiletích je DNA předmětem intenzivního bádání vědců po celém světě. Byly vyvinuty techniky její izolace z pří-

rodních zdrojů i umělé syntézy. Určování sekvence neznámého vzorku DNA (sekvenování) se stalo rutinní záležitostí. Všechny tyto postupy jsou v dnešní době hojně využívány v mnoha oblastech, například v medicíně pro diagnostiku nemocí či testy otcovství, v kriminalistice k identifikaci pachatele a v evoluční biologii při hledání příbuzenských vztahů mezi organismy.

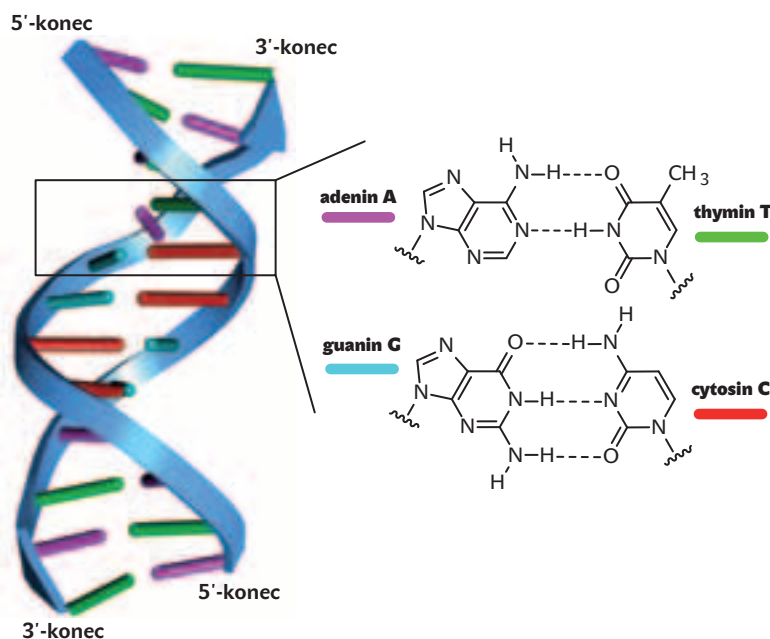
Kromě přirozené DNA je dnes často syntetizována a využívána DNA modifikovaná, přičemž k modifikaci (tj. změně chemické struktury) může být využita libovolná komponenta nukleové kyseliny – cukerná část, fosfátová skupina i nukleobáze. Takto upravená DNA nalézá uplatnění v diagnostice, medicíně, chemii, chemické biologii i v materiálových aplikacích (kde DNA slouží jako strukturně definované „lešení“, na které lze připojit různé funkční molekuly). Klasickou a velmi efektivní metodou přípravy DNA je dnes již plně automatizovaná chemická syntéza na pevné fázi, která je velmi robustní a již poměrně levná. I tato velmi rozšířená metoda má ovšem řadu problémů a nevýhod, zejména při syntéze velmi dlouhých oligonukleotidů nebo když je potřeba zavést některé reaktivní modifikace (např. pro biokonjugace, připojování molekul k DNA, viz dále).

Alternativou k chemické syntéze je syntéza enzymatická, při níž enzym DNA polymeráza staví vlákno DNA inkorporací nukleotidů s použitím deoxynukleosid-trifosfátů (dNTP) jako základních stavebních bloků. Pomocí této metody lze velmi snadno a efektivně připravit modifikovanou DNA nesoucí různé funkční skupiny připojené k nukleobázím a vývojem této metodiky i jejím dalším aplikacím se intenzivně zabýváme v naší laboratoři.

Prof. Ing. Michal Hocek, CSc., DSc., (*1969) je vedoucím vědecké skupiny na ÚOCHB AV ČR a profesorem organické chemie na PřF UK. Zabývá se bioorganickou a medicínou chemií nukleosidů, nukleotidů a nukleových kyselin.

Ing. Petra Měnová, Ph.D., (*1985) je čerstvou absolventkou doktorského studia na VŠCHT. Ve skupině prof. Hocka na ÚOCHB vyvíjela nové enzymatické metodiky konstrukce modifikovaných oligonukleotidů.

Ing. Jitka Dađová, (*1986) je absolventkou magisterského studia organické chemie na VŠCHT a nyní v rámci doktorského studia ve skupině prof. Hocka na ÚOCHB vyvíjí nové biokonjugační reakce DNA s proteiny.

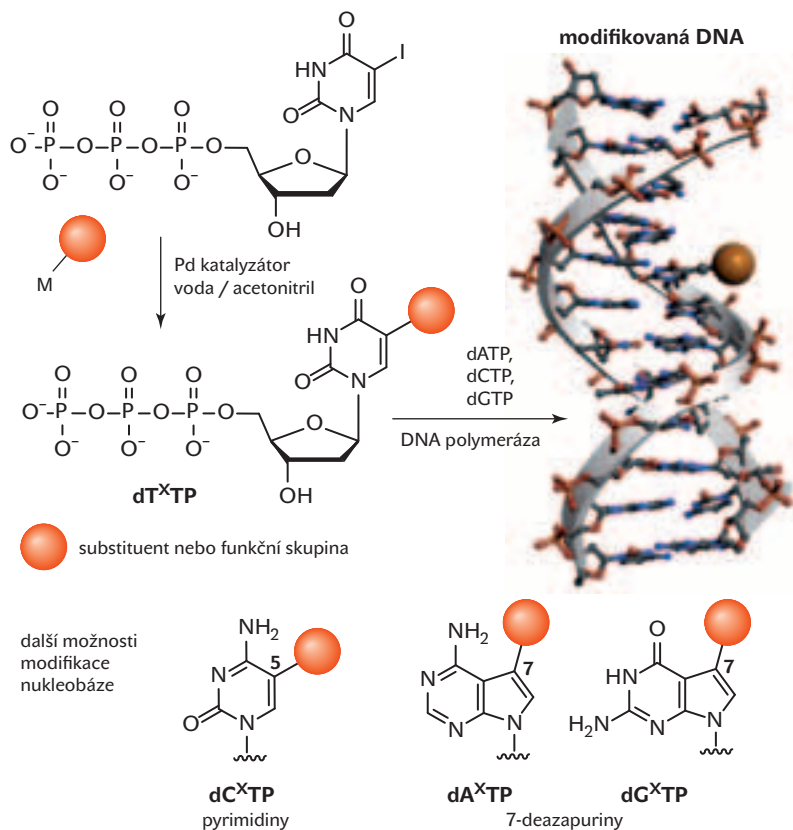


Základní stavební kámen

V prvním kroku je vždy nutné připravit příslušný modifikovaný nukleosid-trifosfát jako základní stavební kámen. K jeho syntéze jsou využívány moderní metody organické chemie, palladiem katalyzované C-C-spojovací (cross-coupling) reakce, za které byla v roce 2010 udělena Nobelova cena za chemii (R. F. Heck, E. Negishi, A. Suzuki). Tyto reakce byly původně vyvinuty pro práci v organických rozpouštědlech, ale systematickým studiem se podařilo je optimalizovat i pro práci ve vodných roztocích, nezbytných pro práci s nukleotidy a DNA. Pro enzymové syntézy DNA jsou obvykle dostatečná miligramová množství dNTP, která jsou touto metodikou snadno dostupná.

Předchozí vědecké studie ukázaly, že DNA polymerázy tolerují modifikace v poloze 5 u thyminu a cytosinu. U adeninu a guaninu je ovšem třeba nahradit dusíkový atom v poloze 7 za atom uhlíku a zavést zvolenou modifikaci na tento atom uhlíku (obr. 2). Takto modifikované dNTP jsou tolerovány celou škálou DNA polymeráz, z nichž nejúspěšnější a nejobecnější je využití tzv. termostabilních polymeráz. Ty pocházejí z bakterií žijících v extrémních podmínkách, např. v termálních pramenech. Syntéza DNA s využitím těchto polymeráz probíhá při 55–75 °C.

Nejjednodušší metodou enzymové syntézy DNA je tzv. extenze primeru (PEX, obr. 3), což je prodlužování části řetězce primeru přidáváním dalších nukleotidů. DNA polymeráza neumí jednotlivé stavební bloky (dNTP) řadit za sebe bez vzoru a pevného počátku



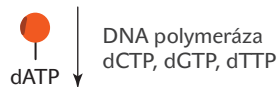
(*de novo*). Jako vzor slouží polymeráze jedno vlákno DNA (templát) a jako počátek krátký úsek komplementární k templátu (primer, očko). Polymeráza přidává k primeru jednotlivé nukleotidy tak, aby každý nově inkorporovaný nukleotid byl komplementární ke svému protějšku v templátovém vlákně. Pokud

2. Struktura a syntéza 2'-deoxyribonukleosid-trifosfátů s modifikací na bázi a jejich použití v polymerázové syntéze DNA. Modifikace je připojena na bázi tak, aby v DNA směřovala do velkého žlábků.

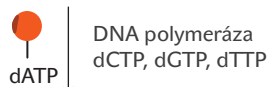
1 PEX

3' -ATCCGAGTCACGTTACGAACGTATCG-5'
5' -TAGGCTCAGTGCA-3'

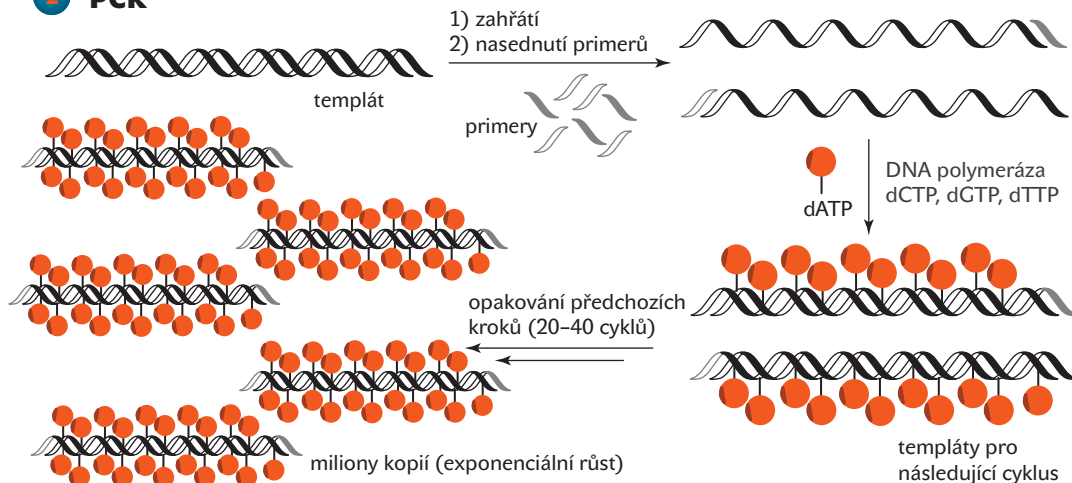
templát
primer



3' -ATCCGAGTCACGTTACGAACGTATCG-5'
5' -TAGGCTCAGTGCAATGCTTGCATAGC-3'



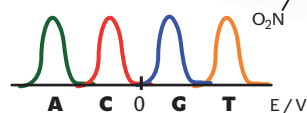
2 PCR



3. Metodiky enzymových syntéz DNA. Extenze primeru (PEX) je vhodná pro syntézu kratších DNA s modifikacemi v jednom vlákně, zatímco PCR pro konstrukci dlouhých sekvencí s modifikacemi v obou vlákněch.

redoxní značky

elektrochemická detekce a redoxní kódování



biokonjugace

vychytání DNA vazebných proteinů

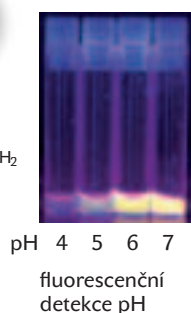


regulace vazby proteinů

regulace štěpení DNA restrikčními endonukleázami



fluorescenční značky



4. Schéma využití DNA modifikací. Redoxní a fluorescenční značky se používají v bioanalýze (elektrochemická nebo spektroskopická detekce), zatímco reaktivní značky a chránící skupiny jsou užitečné v chemické biologii pro studium a regulaci rozpoznání DNA sekvencí proteiny. Zdroj obrázků: <http://freeimages.com>.

je jeden (nebo i více) ze čtyř přirozených dNTP (dATP, dGTP, dCTP a dTTP) nahrazen příslušným dNTP s modifikovanou bází, v nově syntetizované části řetězce bude každá tato nukleobáze nést danou modifikaci.

PEX reakci poté analyzujeme pomocí gelové elektroforézy, která prokáže, zda polymeráza správně rozpoznala a inkorporovala modifikovaný nukleotid. Při použití výše uvedených typů dNTP modifikovaných v poloze 5 či 7 se ve velké většině případů podařilo nalézt alespoň jednu polymerázu, která je efektivně inkorporuje.

V loňském roce naše studie prokázala, že některé modifikované adenosin-trifosfáty jsou překvapivě dokonce lepšími substráty pro některé DNA polymerázy než přirozený nemodifikovaný dATP, protože se přednostně váží do aktivního místa komplexu polymerázy s templátem a primerem. To v budoucnu může umožnit i *in vivo* enzymovou syntézu modifikované DNA v živých organismech, např. při metabolickém značení, pokud se podaří vyřešit transport modifikovaných dNTP přes buněčné membrány.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je běžná metoda pro amplifikaci DNA. Spočívá v cyklickém ohřívání a ochlazování směsi templátu, přebytku primerů, polymerázy a dNTP, při tom je sekvence templátu exponenciálně zmnožena, a získáme tak miliony kopií. Při použití jednoho či více modifiko-

vaných dNTP ji lze využít k přípravě DNA s velkým množstvím modifikací v obou vlákních (obr. 3). Při použití jednoho modifikovaného dNTP (a tří přirozených) nese přibližně 1/4 bází nově nasynthetizované DNA modifikaci.

PCR je tedy metoda vhodná na přípravu delších dvouvláknových DNA s vysokou hustotou modifikací. Ve srovnání s extenzí primeru je PCR náročnější na substrát (modifikovaný dNTP), neboť nejenže musí být polymeráza schopná inkorporovat modifikovaný nukleotid do jakékoli sekvence (včetně několika modifikací za sebou) a pokračovat v syntéze (nesmí se „zadrhnout“), ale musí být schopna i čist modifikovaný templát.

Kromě těchto hlavních metodik se nám podařilo vyvinout další varianty pro sekvencně-specifické zavedení jedné modifikace (značky) doprostřed řetězce a pro syntézu kratších jednovláknových oligonukleotidů pomocí spřažení extenze primeru se štěpením nicking endonukleázou (což je enzym, který štěpí pouze jedno vlákno dvoušroubovice).

K čemu směřujeme

Modifikované DNA nacházejí uplatnění v mnoha oblastech, zejména v diagnostice a chemické biologii (obr. 4). Z bioanalytických aplikací je nutno zmínit zejména fluorescenční a elektrochemické značení. DNA nesoucí redoxní značku lze identifikovat na základě charakteristického redoxního potenciálu při elektrochemické analýze (oxidace nebo redukce na elektrodě). Použití čtyř vzájemně se doplňujících značek, kdy každý druh nukleobáze nese jinou modifikaci, lze v principu využít pro redoxní kódování DNA bází, a tím i pro vývoj alternativních minisekvenačních metodik.

Fluorescenční značení nukleobází je již dlouhou dobu hojně využíváno, např. při sekvencování DNA. Cílem našeho současného výzkumu je vyvinout značky, které budou měnit intenzitu nebo i barvu emise při změnách okolí DNA (např. při vazbě proteinu na danou sekvenci). Dosud se podařilo zavést fluorescenční substituenty reagující na změny pH a substituenty, které výrazně zvyšují fluorescenci po vazbě proteinu v důsledku změny polaroty prostředí či v důsledku omezené pohyblivosti substituentu interagujícího s proteinem. Tyto fluorescenční značky mohou být využity pro senzory DNA-vazebných proteinů (např. transkripčních faktorů).

Jednou z nejvýznamnějších aplikací modifikace DNA je zavedení chemicky reaktivních funkčních skupin a jejich použití pro spojování (tzv. biokonjugace) s dalšími biomolekulami. Zavedení reaktivní aldehydové skupiny do DNA umožňuje např. barevně detekovat DNA díky typické reakci s arylhydraziny či kovalentně připojit peptid reduktivní aminací. V nedávné době však byly vyvinuty modifikace, které specificky reagují s aminokyselinou cysteinem i za podmínek odpovídajících podmínkám v buňce. Tato metodika byla aplikována pro přípravu stabilních ko-

K DALŠÍMU ČTENÍ

Hocek M.: Synthesis of base-modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates and their use in enzymatic synthesis of modified DNA for applications in bioanalysis and chemical biology. *J. Org. Chem.* 79, 9914–9921, 2014.

Kielkowskí P., Fanfrlík J., Hocek M.: 7-Aryl-7-deazaadenine 2'-Deoxyribonucleoside Triphosphates (dNTPs): Better Substrates for DNA polymerases than dATP in Competitive Incorporations. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 7552–7555, 2014.

valentních konjugátů s peptidy a také ke specifickému vychytávání („cross-link“) DNA-vazebných proteinů obsahujících cystein v rozpoznávacím místě. Tento přístup nyní aplikujeme na vývoj reaktivních DNA sond (molekulových „pastichek“) pro specifické vychytávání různých proteinů a pro identifikaci neznámých DNA-vazebných proteinů.

Přítomnost modifikace ve velkém žlábků DNA má zásadní vliv na možnosti rozpoznání sekvence DNA příslušnými DNA-vazebnými proteiny. Studie štěpení modifikované DNA restrikčními endonukleázami (enzymy, které rozpoznávají a štěpí specifické sekvence bází) ukázala, že zavedením objemné modifikace lze zamezit rozpoznání DNA sekvence proteinem. Avšak některé restrikční endonukleázy tolerují přítomnost menších substituentů na derivátech adeninu a na ura-

cilu a danou sekvenci bází navzdory přítomné modifikaci rozpoznají a rozštěpí.

Této skutečnosti se využívá při konstrukci chemického přepínače rozpoznání dvouvláknové DNA, kdy se objemná modifikace chemickou reakcí převedla na malý substituent, který již rozpoznání a štěpení nebránil. Další studie směřují k využití tohoto principu pro přepínání exprese genů.

Tento krátký článek ukazuje, že kromě klasických chemických syntéz oligonukleotidů a DNA lze s výhodou využívat i metodik bioorganické chemie a enzymových syntéz založených na inkorporaci modifikovaných nukleotidů polymerázami. Otvírá to zcela nové možnosti v oblastech diagnostiky a chemické biologie, kde lze v blízké budoucnosti očekávat řadu nových objevů i praktických aplikací.

Polyfosfáty

regulují srážlivost krve

VÁCLAV HOŘEJŠÍ

Není příliš známé, že ve všech buňkách všech organismů, od bakterií až po savce, se nachází trochu neobvyklá anorganická sloučenina zvaná polyfosfát. Polyfosfáty jsou lineární polymery desítek, stovek, ba až tisíců zbytků kyseliny fosforečné spojených stejnou „vysokoenergetickou“ vazbou jako např. fosfáty v notoricky známé molekule adenosinotriposfátu (ATP). Jsou enzymaticky syntetizovány z ATP a slouží, alespoň u bakterií, pravděpodobně jako energetické zásobárny. Spekuluje se, že polyfosfáty jsou jakousi pradávou molekulární fosilii z probiotických časů, kdy mohly sloužit jako jakási polyanionická lešení napomáhající tvorbě biopolymérů. Polyfosfáty se nacházejí hlavně v malých cytoplazmatických organelách zvaných acidokalcizomy, ve kterých jsou koncentrovány také vápenaté ionty (mimořadně acidokalcizomy jsou asi jediné organely v pravém slova smyslu – tj. opatřené membránou –, které se nacházejí jak v prokaryotech, tak v eukaryotech).

Polyfosfáty se v hojné míře nacházejí v krevních destičkách (trombocytech), tedy jakýchsi bezjaderných „polobuňkách“ hrajících zásadní roli v systému krevní srážlivosti. V těchto buňkách, resp. „částicích“, jsou jejich molekuly typicky dlouhé jen asi 60 až 100 fosfátových monomerů a uvolňují se ze zmíněných acidokalcizomů (u trombocytů zvaných denzní granule, resp. delta-granule) po aktivaci trombocytů, která nastává poraněním cévy. Uvolněné polyfosfáty se účastní regulace řady důležitých

fyziologických dějů. V první řadě urychlují několika mechanismy kaskádu krevní srážlivosti – dlouhé polyanionty se totiž vážají na řadu proteinů této složité soustavy, a tím pozměňují jejich funkční vlastnosti. Kromě toho inhibují následné postupné odstraňování krevní sraženiny. Polyfosfáty uvolněné z trombocytů a jiných buněk (hlavně z mastocytů) také potlačují aktivaci komplementové kaskády a výrazně podporují vznik závažné reakce.

Patologická aktivace krevní srážlivosti vede k trombóze, tedy nebezpečnému ucpávání cév. Je proto nasnadě domněnka, že vhodné polykationické látky by se mohly elektrostaticky vázat na polyfosfáty, a tím rušit jejich nežádoucí aktivity v případě některých chronických závažných onemocnění a trombóz. V recentní studii¹ bylo skutečně popsáno několik takových nadějných polykationických látek, které blokovaly polyfosfáty, v myších modelech nebyly toxické a na rozdíl od běžně používaného heparinu měly menší nežádoucí účinky (krvácivost). Je tedy velká naděje, že se dočkáme nové generace bezpečnějších antitrombotických léků.



Prof. RNDr. Václav Hořejší, CSc., (*1949) vystudoval Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. V Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., který od roku 2005 řídí a kde je vedoucím oddělení molekulární imunologie, se zabývá povrchovými a signálními molekulami buněk imunitního systému. Přednáší imunologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

1) Travers et al., Blood 124, 3183-3190, 2014/22.

Polyfosfátový řetězec

