Ugradnja neprirodnih parova baza u DNA

Valičević, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:664116

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Josipa Valičević

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

UGRADNJA NEPRIRODNIH PAROVA BAZA U DNA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju

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

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 25. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 21. rujna 2018.

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

Sadržaj

§ SAŽETAK VI
§ 1. UVOD 1
1.1. Deoksiribonukleinska kiselina 1
1.2. Replikacija DNA 3
1.3. Od DNA do proteina 6
1.4. Česte metode korištene u istraživanju neprirodnih parova baza 9
1.4.1. PCR *9*
1.4.2. Dvodimenzijska tankoslojna kromatografija *10*
1.4.3. SAR tehnika *10*
1.4.4. Pojmovi vezani uz enzimsku kinetiku *10*
§ 2. UGRADNJA NEPRIRODNIH PAROVA BAZA U DNA 12
2.1. Začeci ideje o istraživanju neprirodnih parova baza 12
2.2. Početci razvijanja temeljnih značajki za sintezu neprirodnih nukleotida 15
2.3. Ugradnja neprirodnih nukleotida povezanih vodikovim vezama 17
2.3.1. Rane faze istraživanja neprirodnih parova baza *18*
*2.3.2. Istraživanje procesa transkripcije pomoću para baza **S-Y*** *19*
*2.3.3. Mogućnosti za daljnja poboljšanja karakteristika para **S-Y*** *21*
2.4. Ugradnja hidrofobnih neprirodnih parova baza 23
2.4.1. Napori pri ugradnji hidrofobnih neprirodnih parova baza *23*
2.4.2. PCR-analize uspješnosti sparivanja hidrofobnih neprirodnih parova baza *26*
*2.4.3. Uspjeh sparivanja neprirodnog para baza **Ds-Px*** *29*
2.5. Istraživanje razreda baza d5SICS-dMMO2 30
*2.5.1. Par d**5SICS**-d**MMO2** i uspješnost analoga baze d**MMO2*** *30*
2.5.2. PCR umnožavanja i analiza *34*
2.5.3. Budućnost *36*
2.6. Zaključak i budućnost istraživanja neprirodnih parova baza 36
§ 3. LITERATURNI IZVORI 39

§ SAŽETAK

Struktura dvolančane uzvojnice deoksiribonukleoinske kiseline ili molekule DNA sastoji se od dvaju isprepletenih lanaca kojima je šećerno-fosfatna okosnica s vanjske strane, a baze s unutarnje strane uzvojnice te tako čine ovu molekulu vrlo učinkovitim i otpornim sredstvom za spremanje informacija. Raznolikost i kompleksnost staničnih organizama posljedica je jedinstvenih sljedova nukleotida u molekuli DNA koji kodiraju raznolike proteine. Tijekom procesa transkripcije i translacije u stanicama se eksprimiraju proteini specifičnih funkcija ovisno o stadiju razvoja, vrsti stanica te okolišnim uvjetima. Purinske i pirimidinske baze tvore dva specifična para povezanih vodikovim vezama, vezama koje su relativno slabe što omogućuje reverzibilno kidanje u biokemijskim procesima, a isto tako jake da pomažu u stabilizaciji specifičnih struktura kao što je to dvostruka uzvojnica. Specifične parove stvaraju četiri dušikove baze pri čemu se adenin sparuje s timinom, a gvanin citozinom.

U nekim slučajevima, osim sparivanja navedenih parova, otkriveno je da se u DNA sljedove mogu i selektivno ugraditi neprirodni nukleotidi koji se povezuju vodikovim ili hidrofobnim interakcijama. Istraživanjima upravo u tom području dizajniranja novih neprirodnih nukleotida došlo je do iznenađujućih otkrića u laboratorijima kemije i sintetske biologije.

U ovom radu bavit ću se opisivanjem rezultata niza istraživanja u kojima su otkriveni novi razredi neprirodnih parova baza koji su potencijalni kandidati za razvoj nekoliko različitih modela koji bi objasnili način sinteze molekule DNA u odsutnosti vodikovih interakcija.

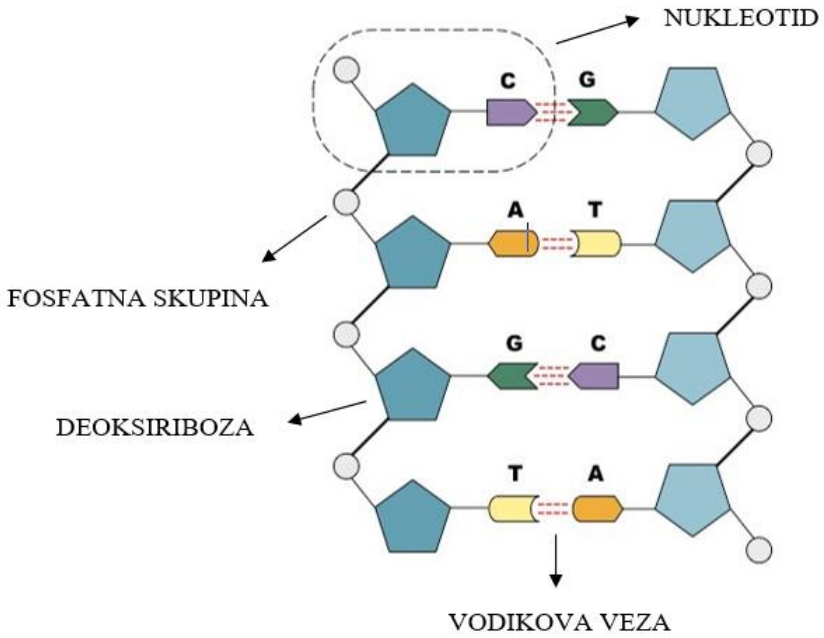
Ugradnja petog i šestog nukleotida u DNA, odnosno stvaranje trećeg (neprirodnog) para baze, omogućila bi pohranu veće količine informacija koje DNA može nositi. U početnim stadijima istraživanja, ideja je bila usmjeriti razvoj neprirodnih nukleotida prema stvaranju hidrofobnih interakcija kako bi se na taj način povećala selektivnost sparivanja samo neprirodnih baza te izbjegle interakcije s prirodnim. Napredak u istraživanju pridonio je povezivanju odnosa komplementarnosti struktura i aktivnosti baza. Koristeći se brojnim tehnikama među kojima su i ispitivanja na osnovi enzimske kinetike i PCR-a te u konačnici i pokusi *in vivo*, otkriveni su bitni čimbenici za nastajanje hidrofobne, ali isto tako i vodikove veze.

Istraživanja koja se temelje na važnosti vodikovih interakcija razvile su parove **S-Y** i **S-Z** čije je umnožavanje u PCR-u bilo s relativno dobrom vjernosti. Međutim, tijekom istraživanja takvih neprirodnih nukleotida naišlo se na mnoge probleme koji se tiču komplementarnosti oblika i potrebnih atoma za vodikove veze, kao i prevelike sposobnosti sparivanja s prirodnim nukleotidima. Zato su sva buduća istraživanja prakticirana na stvaranju baza s hidrofobnim pakiranjem. Na tom polju, razvijeno je mnogo više kandidata (~ 6000 nukleotida) koji su imali dobru ili vrlo dobru selektivnost sparivanja i umnožavanja u PCR reakcijama. Ovdje valja istaknuti najuspješnije parove nukleotida d**MMO2**-d**5SICS**, d**NaM**-d**5SICS** i d**TPT3**-d**NaM**, čije učinkovitosti ugradnje u DNA tijekom PCR-a dosežu i do 99,7%, a selektivno se ugrađuju tijekom replikacije i transkripcije *in vivo* u stanicama.

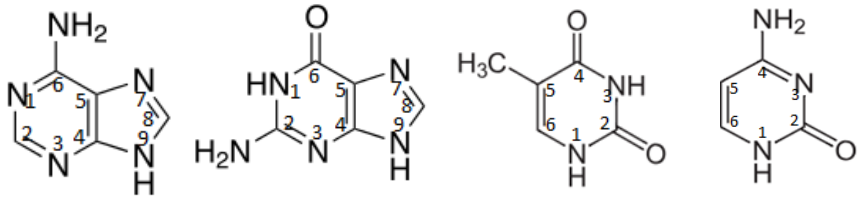
§ 1. UVOD

1.1. Deoksiribonukleinska kiselina

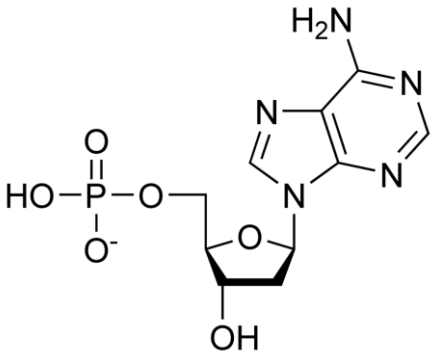
Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) linearni je polimer koji sadrži genetičku informaciju pohranjenu u obliku točno određenog slijeda baza, odnosno nukleotida. Struktura dvolančane uzvojnice sastoji se od dvaju polinukleotidnih lanaca koji se protežu u suprotnim smjerovima pri čemu se omotavaju oko iste osi tvoreći tako desnu dvostruku uzvojnicu. Model Watsona i Cricka, odnosno B-DNA-uzvojnica, građena je od šećerno-fosfatne okosnice koja se nalazi s vanjske strane, dok su baze s unutarnje strane uzvojnice (slika 1).[1] Okosnica je građena od molekula šećera deoksiriboze, koja na 2'-ugljikovom atomu nema kisikova atoma, povezanih s dvjema fosfatnim skupinama pri čemu je svaki šećer orijentiran na isti način. Svaki fosfodiesterski most nosi negativan naboj te time sprečava moguće reakcije sa većinom nukleofilnih reagensa i čini veze manje osjetljivijim na hidrolizu što je bitan faktor za otpornost i održavanje cjelovitosti informacije pohranjene u nukleinskim kiselinama.[1] Na svaku molekulu šećera vezana je jedna od četiri baze: adenin (A), citozin (C), gvanin (G) ili timin (T) (slika 2). Tako povezana deoksiriboza s jednom fosfatnom skupinom i bazom čini osnovnu građevnu jedinicu DNA, odnosno monomer DNA ili nukleotid (slika 3).



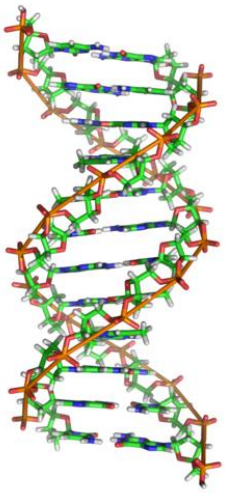
Slika 1. Dvodimenzijski prikaz povezivanja dvaju komplementarnih lanca DNA[17]



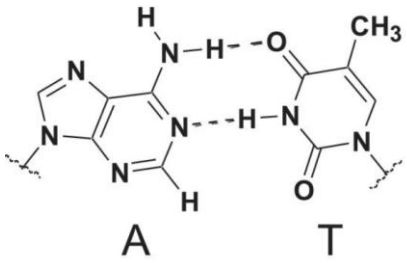
Slika 2. Prikaz purinskih (adenin i gvanin) i pirimidinskih baza (timin i citozin)[11,12]



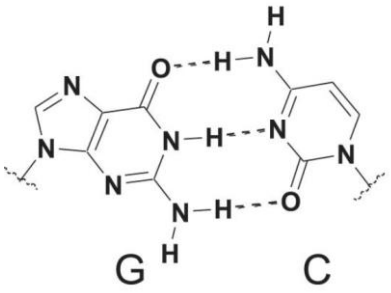
Slika 3. Primjer nukleotida u DNA (deoksiadenozin-5'-fosfat)[16]



Slika 4. Prikaz strukture B-DNA-uzvojnice[13]



Slika 5. Prikaz Watson-Crickovog sparivanja adenina i timina[5]



Slika 6. Prikaz Watson-Crickovog sparivanja gvanina i citozina[5]

Prema dogovoru, redoslijed baza piše se u smjeru od 5'- prema 3'-kraju, pri čemu se 5'-OH skupina prve deoksiriboze (slobodna ili vezana na fosfatnu skupinu) nalazi na početku, tj. na 5'-kraju lanca dok se slobodna 3'-OH skupina zadnje deoksiriboze nalazi na 3'-kraju lanca. Baze na dvama polinukleotidnim lancima tvore specifične parove baza, pri čemu nastaje spiralna struktura (slika 4). Sparivanje specifičnih Watson-Crickovih baza spontan je proces kojeg pokreće DNA-polimeraza umetanjem komplementarnog nukleotida postojećem nukleotidu u lancu kalupa. Postojanje specifičnih parova baza, to jest nukleotida koji imaju gotovo isti oblik temelj su pravilne strukture molekule DNA. Sparivanjem adenina s timinom (slika 5), odnosno gvanina s citozinom (slika 6) nastaju vodikove veze koje drže spomenute parove na okupu. Unutar uzvojnice baze su praktički naslagane jedna na drugu.[1] Takav način slaganja pridonosi stabilnosti molekule DNA iz razloga što se složeni hidrofobni parovi baza privlače slabim van der Waalsovim silama, koje zbrojene na ukupan broj atoma imaju vrlo značajan učinak. Uz spomenute interakcije, dodatnu stabilnost strukturi pridonose i konformacije prilično krutih peteročlanih prstenova deoksiriboze u okosnici.[1]

Zbog opisane strukture, deoksiribonukleinska kiselina sadržava dva utora koje nazivamo malim i velikim utorom. Mali utor karakteriziraju akceptori vodikovih veza, atomi O-2 pirimidina i N-3 purina, dok je veliki utor na suprotnoj strani. Upravo takva građa te sadržaj primatelja vodika (akceptora) i davatelja vodika (donora) u utorima veoma je važna za interakciju molekule DNA s proteinima.

1.2. Replikacija DNA

Replikacija molekule DNA je vrlo složen proces u kojem sudjeluje dvadesetak enzima čija zadaća je stvaranje slijeda nukleotida novosintetizirane DNA koji mora točno odgovarati slijedu nukleotida roditeljske DNA. Tijekom replikacije, svaki od lanaca roditeljske DNA

djeluje kao kalup za sintezu novog lanca s komplementarnim slijedom.[1] Specifična svojstva dvostruke uzvojnice bitna su za složenost replikacije. Kao što je već spomenuto, dva lanca DNA molekule protežu se u suprotnim smjerovima. S obzirom da sinteza lanaca DNA ide u smjeru 5' → 3', proces replikacije DNA mora imati poseban mehanizam koji će mu omogućiti sintezu lanaca suprotnog usmjerenja.

Kako bi započela replikacija molekule DNA, potrebno je imati početnicu, kratku nukleinsku kiselinu koja ima slobodan 3'-kraj i stvara dvostruku uzvojnicu s kalupom.[1] Za stvaranje početnice potrebna je RNA-polimeraza, primaza, koja sintetizira kratak komad RNA (oko desetak nukleotida) čiji je slijed baza komplementaran DNA-lancu kalupa. Dakle, sinteza RNA nužna je za početak sinteze DNA. Kada su ostvareni spomenuti preduvjeti, DNA-polimeraza može započeti sintezu komplementarnog lanca prema postojećem kalupu. Općenito, DNA-polimeraze kataliziraju dodatak deoksiribonukleotidnih jedinica, jednu po jednu, lancu DNA te jedino kada je baza u dolazećem nukleozid-trifosfatu komplementarna bazi u lancu kalupa stvara se fosfodiesterska veza. Prema tome, DNA-polimeraza je enzim upravljan kalupom, koji sintetizira produkt čiji je slijed baza komplementaran slijedu kalupa.[1] Tijekom reakcije produžetaka lanca, 3'-OH kraj rastućeg lanca nukleofilno napada na α-fosforilnu skupinu pridošlog nukleozid-trifosfata pri čemu nastaje fosfodiesterski most, a oslobađa se pirofosfat. Pirofosfat se daljnjom hidrolizom prevodi u dva iona ortofosfata pomoću enzima pirofosfataze koja pomaže kretanju ove reakcije u smjeru sinteze lanca.

Struktura DNA-polimeraze bitna je za objašnjenje replikacije molekule DNA. Polimerizacijska regija enzima ima oblik šake, a važnu ulogu u enzimskoj aktivnosti imaju dva iona metala u samom aktivnom mjestu koji stabiliziraju međuprodukte i kataliziraju reakciju. Kako bi se replikacija odvijala što točnije, aminokiselinski ostatci, koji se nalaze u aktivnom mjestu DNA-polimeraze, tvore vodikove veze s dolaznim dNTP te su ključni za ugradnju ispravno sparenog nukleotida. Većina DNA-polimeraza ima regiju s 3' → 5' egzonukleaznom aktivnosti koja sudjeluje u provjeri i popravku polinukleotidnog produkta.

Kao što je na početku opisano, svaki lanac roditeljske DNA služi kao kalup za sintezu novosintetizirane DNA. Mjesto sinteze DNA naziva se replikacijskim rašljama.[1] Kako DNA sadrži dva antiparalelna polinukleotidna lanca, sinteza se vrši na dva načina sintezom vodećeg i sporijeg, odnosno tromijeg lanca. Vodeći lanac sintetizira se bez prekida u smjeru 5' → 3', a sporiji, odnosno tromiji lanac sintetizira se u malim fragmentima u smjeru 5' → 3' zvanim Okazakijevim fragmentima. Kako replikacija napreduje, dani fragmenti se povezuju

kovalentnim vezama djelovanjem enzima DNA-ligaze te na taj način nastaje kontinuirani lanac kćer. Tijekom replikacije, potrebno je odstraniti RNA-početnice i zamijeniti ih s DNA.

Važnost enzima DNA-ligaze je u tome što katalizira stvaranje fosfodiesterske veze između 3'-hidroksilne skupine na jednom kraju DNA i 5'-fosfatne skupine na drugom kraju DNA.[1] Takva reakcija nije termodinamički povoljna te je za nju potreban izvor energije, za što se koristi stanična energetska valuta ATP. Ključno je spomenuti da DNA-ligaza ne može povezati dvije jednolančane molekule DNA ili samo cirkularizirati DNA, već povezuje samo lomove na dvolančanim molekulama DNA.

Kada govorimo o složenosti procesa replikacije molekule DNA mislimo na to da ljudska diploidna stanica mora replicirati više od 6 milijardi parova nukleotida sadržanih u 46 linearnih kromosoma. Uzevši to u obzir, za razliku od replikacije DNA u prokariotima, u eukariotskim stanicama replikacija započinje na oko 30 000 replikacijskih ishodišta, što znači da ih svaki kromosom sadržava nekoliko stotina. Svako ishodište replikacije mjesto je početka replikacije jedne replikacijske jedinice ili replikona.[1] Ishodište replikacije mora biti jedinstveno mjesto. Kod čovjeka su to mjesta bogata AT-sljedovima u širem smislu, na kojima se slažu kompleksi koji prepoznaju ishodišta replikacije (ORC, engl. *origin of replication complex*). Cijeli proces započinje slaganjem ORC, skupine enzima koji se povezuju pomoću ATP-aznih domena u cikličke heksamere kojima molekulu DNA omotavaju s vanjske strane. Potom licencijski faktor, naziv za skup proteina koji dopuštaju stvaranje inicijacijskog kompleksa, veže helikazu, heksamerni enzim zaslužen za odmotavanje dvostruke uzvojnice te time nastaju jednolančani lanci roditeljske DNA koji se zatim stabiliziraju replikacijskim proteinima A, vrstama SSB-proteina. Za kopiranje replikona potrebne su dvije različite polimeraze. Inicijacijska polimeraza ili polimeraza α sadrži primaznu podjedinicu, koja sintetizira RNA-početnicu, te i aktivnu polimeraznu podjedinicu kojom dodaje niz od 20 deoksiribonukleotida na početnicu. Nakon dodatka nukleotida dolazi do vezanja replikacijskog faktora C (RFC) koji odstranjuje polimerazu α. Vezanjem podjedinice RFC-a na DNA-polimerazu δ nastavlja se replikacija u oba smjera od ishodišta replikacije sve dok se susjedni replikoni ne susretnu i spoje.[1] RNA-početnica se zatim hidrolizira i dobiveni fragmenti DNA se spoje s DNA-ligazom.

Upravo postojanje više ishodišta replikacije osigurava da će se svaki slijed replicirati jednom i samo jednom pri čemu važnu ulogu imaju mali ciklički proteini, ciklini, koji reguliraju stanični ciklus, pa tako i replikaciju DNA. Krajevi kromosona, odnosno telomere,

sintetiziraju se pomoću posebnih enzima nazvanih telomeraze. Telomeraze su enzimi koji sadrže molekulu RNA koja služi kao kalup za produljivanje lanca DNA bogatog G-nukleotidima. Kod čovjeka je to ponavljajući slijed AGGGTT na 3'-kraju jednog lanca koji je malo duži od drugog. Važnost telomerne DNA je u tome što kod replikacije tromog lanca imamo nezavršeni 5'-kraj koji bi se nakon uklanjanja RNA-početnice svakom replikacijom sve više smanjivao. Do sada istražena struktura telomera upućuje na formiranje dvolančanih omči na koje se vežu posebni enzimi kako bi zaštitili krajeve kromosoma.

Iako je mehanizam replikacije molekule DNA okarakteriziran velikom vjernošću i procesivnošću, moguće su anomalije tijekom nastanka novosintetizirane DNA. Kako bi se smanjila ili otklonila moguća greška u sparivanju parova baza koji nisu Watson-Crickovi parovi, te kako bi se smanjio broj lomova u jednom ili oba lanca te neispravni završetak repliciranog slijeda molekule DNA, tijekom evolucije razvili su se mnogi mehanizmi. Postojanje posebnih DNA-polimeraza koje mogu replicirati DNA usprkos mnogim lezijama te rekombinacija DNA bitni su mehanizmi koji omogućuju popravak i očuvanje genetičke informacije pohranjene u dvolančanoj DNA.

1.3. Od DNA do proteina

Kako bi se informacija iz molekule DNA prenijela u RNA te konačno u protein potrebna su dva bitna procesa: transkripcija i translacija. Kod eukariota, ta dva procesa su razdvojena mjestom, staničnim odjeljcima, u kojem se odvijaju. Sinteza RNA ili transkripcija je proces kojim se prepisuje ili transkribira informacija u obliku nukleotidnog slijeda DNA u informaciju prikazanu slijedom nukleotida u RNA te se ona zbiva u jezgri. Translacija je proces biosinteze proteina koji se odvija izvan jezgre, u citoplazmi, a označava prevođenje iz jezika nukleotida u jezik aminokiselina. Slijed od triju nukleotida čini kodon, koji određuje aminokiselinu koja gradi proteine.

Poput DNA, i ribonukleinska kiselina ili RNA linearan je polimer sastavljen od točno određenog niza nukleotida. Za razliku od DNA, RNA je građena od molekule šećera riboze, koja na 2'-ugljikovom atomu ima hidroksilnu skupinu te umjesto pirimidinske baze timina (T) sadrži uracil (U). Kod eukariotskih stanica postoje tri glavna tipa RNA: glasnička RNA (mRNA), transfer-RNA (tRNA), ribosomska (rRNA) te ostale dodatne male molekule RNA. Za početak sinteze molekule RNA nije potrebna početnica, već RNA-polimeraza sama započinje transkripciju. U eukariotima razlikujemo tri tipa RNA-polimeraza: RNA-

polimerazu I koja se nalazi u jezgrici, RNA-polimerazu II i RNA-polimerazu III koje su smještene u nukleoplazmi. Tijekom ili nakon transkripcije dolazi do modifikacije primarnog transkripta RNA u obliku dorade i prekrajanja. S obzirom da su geni građeni od mozaika sljedova nukleinskih kiselina zvanih introni (intervencijski sljedovi) i eksoni (eksprimirani sljedovi), potrebno je introne izrezati iz primarnog transkripta, a povezati eksone čime nastaje zrela mRNA.[1]

Transkripcija molekule RNA zbiva se u tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija. Početak sinteze kreće pretraživanjem molekule DNA pri čemu se traže inicijacijska, to jest promotorska mjesta ili promotori. Takva se mjesta, kod eukariotskih stanica, mogu nalaziti između 30 do 100 nukleotida uzvodno od mjesta početka transkripcije te često sadrže TATA-slijed na koje se veže protein sedlastog oblika, TATA-vezujući protein (engl. *TATA-box binding protein*, TBP). Protein oštro savija DNA stvarajući tako središnju točku za slaganje aktivnog transkripcijskog inicijacijskog kompleksa koji sadrži mnogobrojne transkripcijske proteine. Aktivnost mnogih promotora znatno se povećava pod utjecajem pojačivačkih sljedova koji sami po sebi nemaju promotorsku aktivnost, a mogu biti udaljeni do nekoliko kilobaza uzvodno ili nizvodno od gena.[1] Sintezu molekula RNA provodi RNA-polimeraza. Nakon što se aktivira transkripcijski inicijacijski kompleks smješten na DNA, započinje transkripcija. Stvaranjem prve fosfodiesterske veze započinje elongacijska faza. Nukleofilnim napadom 3'-OH skupine zadnjeg nukleotida u lancu na α-fosforilnu skupinu dolazećeg nukleozid-trifosfata komplementarnog postojećoj bazi u kalupu DNA, otpuštanjem pirofosfata, te njegovom hidrolizom u ortofosfat, što je termodinamički povoljna reakcija, osigurava se tok reakcije u smjeru nastanka RNA.[1]

Kod bakterija, opisani proces zbiva se u transkripcijskom mjehuru u kojem se tijekom elongacije odvija 17 pb DNA i gdje se nalaze RNA-polimeraza, DNA i nedovršena RNA. Terminacijska faza transkripcije također je precizno regulirana, kao i inicijacija. Regije u DNA koje se transkribiraju sadržavaju stop-signale. Najjednostavniji signal jesu palindromske GC-regije iza kojih slijedi AT-bogata regija. Transkript RNA tog DNA-palindroma jest samokomplementaran što znači da se baze mogu sparivati i tvoriti strukturu ukosnice (omču i peteljku) koju stabilizira visoki udio GC parova baza.

Kod eukariota, pred-mRNA se odmah modificira na 5'- i 3'-krajevima tako da difosfat na 5'-kraju napada α-fosforov atom molekule GTP i nastaje veoma neobična 5'-5' trifosfatna veza nazvana „kapom“. Zatim se izrezuju introni i povezuju eksoni, a na kraju se na 3'-kraj dodaje

poliA rep. Tako dobivena zrela mRNA spremna je za odlazak u citoplazmu gdje će poslužiti kao kalup za proces translacije.

Translacija je proces prevođenja po tri nukleotida ili kodona u mRNA, u određenu aminokiselinu. Kako bi proces biosinteze proteina tekao što točnije potrebna je koordinacija više od stotinu makromolekula uključujući mRNA, više različitih rRNA, tRNA i aminoacil-tRNA-sintetaza te proteinskih faktora. Kodon u mRNA komplementaran je antikodonu na molekuli tRNA na koju je vezana aminokiselina koja će se ugraditi u polipeptidni lanac. Reakciju aktiviranja aminokiseline i povezivanja s pripadnom tRNA katalizira enzim aminoacil-tRNA-sintetaza. Vjernost spomenutog enzima temelji se na prepoznavanju funkcionalnih skupina i oblika aminokiseline i tRNA. Sama reakcija sinteze polipeptida događa se na ribosomu, organelu koji se sastoji od dvije trećine RNA i trećine proteina, a provodi se u tri faze: inicijacija, elongacija i terminacija. Smjer biosinteze proteina je od amino-kraja proteina prema karboksilnom kraju, a mRNA se prevodi u smjeru 5' → 3'.[1] Kod eukariotskih stanica ribosomi su veći i sastoje se od velike podjedinice 60S i male podjedinice 40S, koje vezanjem jedna na drugu čine česticu 80S.[1] Početna ili inicijacijska tRNA je metionin-tRNA^{Met}, a inicijacijski kodon je uvijek AUG te se takav slijed najbliži 5'-kraju mRNA odabire kao početni signal. Ribosom 40S s vezanom Met-tRNA^{Met} prislanja se na „kapu“ i kreće se duž mRNA do slijeda AUG. Elongacijski faktori kod eukariota su EF1α i EF1βγ. Vezanjem GTP, EF1α dostavlja aminoacil-tRNA na odgovarajuće mjesto u ribosomu, a EF1βγ katalizira izmjenu GTP i GDP. Proces terminacije zbiva se pomoću jednog faktora, eR1, a protein eIF-3 sprečava prerano združivanje ribosomskih podjedinica.

Procesi replikacije, transkripcije i translacije događaju se vrlo brzo. Replikacija se odvija brzinom od 800 nukleotida u sekundi, transkripcija oko 50 nukleotida u sekundi, a translacija brzinom oko dvadeset aminokiselina u sekundi. Uz sve to, cijeli proces od DNA do proteina zbiva se uz impresivnu koordinaciju mnoštva komponenata, točnost i preciznost.

Na temelju dosadašnjih istraživanja, regije koje kodiraju proteine čine samo 3% ljudskog genoma. Dio DNA sadržava informaciju koja regulira ekspresiju određenih gena u određenim tipovima stanica ili pri određenim fiziološkim uvjetima. Zapravo, svaka stanica sadržava isti DNA-genom, iako se različiti tipovi stanica znatno razlikuju u proteinima koje proizvode. Kontrolne regije koje upravljaju takvim razlikama u ekspresiji zauzimaju mali dio našeg kodirajućeg genoma. Veliki dio DNA ne kodira za proteine niti sadrži regulacijske sljedove. Dio te DNA čini se kao „smeće“, jer sadržava sljedove koji su umetnuti davno tijekom

evolucije i tu su ostali. No, ponekad i ti sljedovi imaju važnu ulogu. U drugim slučajevima, ta DNA ne obavlja nikakvu funkciju, ali njezin zaostatak u genomu nije štetan.

1.4. Česte metode korištene u istraživanju neprirodnih parova baza

1.4.1. PCR

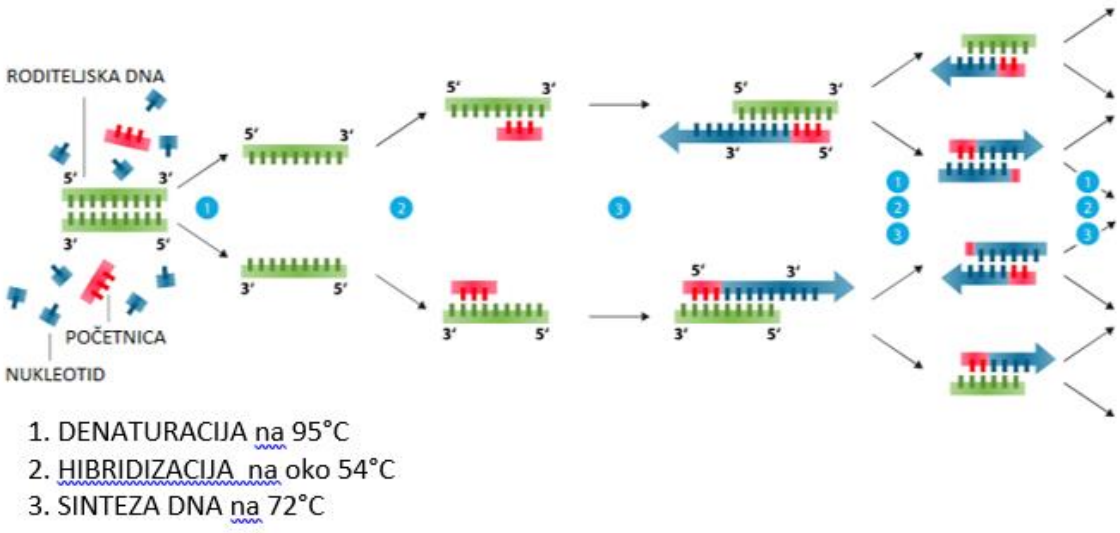
Lančana reakcija polimeraze ili PCR (engl. *polymerase chain reaction*) je iznimno korisna i bitna metoda kojom se umnožavaju odsječci DNA. Specifičnost ove metode je u tome što se njome mogu dobiti milijuni kopija ciljanog slijeda, čiji slijed nukleotida ne mora biti poznat, ako su okružujući sljedovi poznati. Drugo, ciljni slijed može biti znatno dulji od početnice i treće, početnice se ne moraju savršeno sljepljivati s bočnim okružujućim sljedovima da bi se umnožili ciljni sljedovi. PCR metoda se izvodi tako da se u otopinu koja sadrži ciljani slijed dodaje par početnica koje hibridiziraju s okružujućim sljedovima ciljnog slijeda, sva četiri deoksiribonukleozid-trifosfata i termostabilna DNA-polimeraza. Cijeli proces sastoji se od nekoliko ciklusa sastavljenih od ponavljajuća tri koraka (slika 7):

1. Razdvajanje lanaca. Dva lanca roditeljske molekule DNA razdvoje se zagrijavanjem otopine na 95 °C u trajanju od 15 s-30 s.

2. Hibridizacija ili sljepljivanje početnica. Otopina se naglo ohladi na nižu temperaturu (često oko 54 °C) kako bi se omogućila hibridizacija svake početnice s lancem roditeljske DNA. Jedna početnica hibridizira s jednim lancem, a druga s komplementarnim lancem. Roditeljski se lanci ne sljepljuju u dvolančanu DNA jer su početnice prisutne u suvišku. Početnice se najčešće sastoje do 20 do 30 nukleotida.

3. Sinteza DNA. Otopina se potom zagrijava na 72 °C, što je optimalna temperatura za *Taq*-DNA-polimerazu. Ova temperaturno otporna polimeraza potječe iz *Thermus aquaticus*, termofilne bakterije koja živi u vrelim izvorima. Polimeraza produžuje obje početnice u smjeru nastanka ciljnog slijeda.

Tako opisana tri koraka čine jedan ciklus umnožavanja DNA PCR-om. Prije početka drugog ciklusa, dvolančane DNA se ponovno zagriju pri čemu nastaju četiri dvolančane DNA, a nakon trećeg ciklusa nastaju dva kratka lanca koji sadržavaju samo ciljni slijed okružen mjestima vezanja početnica. Svaki tako opisani daljnji ciklus PCR-a samo će eksponencijalno umnožavati ciljni slijed. U teoriji, nakon 20 ciklusa slijed je umnožen milijun puta, a nakon 30 ciklusa čak milijardu puta, a sve to u vremenu kraćem od jednog sata.[1]



Slika 7. Prikaz PCR metode[18]

1.4.2. Dvodimenzijska tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija (engl. *thin layer chromatography*, TLC) je plošna ili planarna kromatografijska tehnika koja se primjenjuje za razdvajanje kemijskih komponenti u smjesi. Sastoji se od stacionarne i pokretne faze. Stacionarna faza sastoji se od tankog sloja materijala potrebnog za adsorpciju, a najčešće se koristi silikagel, aluminijev oksid ili celuloza, koji je pričvršćen na ravnu, inertnu ploču. Pokretna faza se sastoji od ispitivanog uzorka otopljenog u odgovarajućem otapalu. Kromatografija se provodi kretanjem pokretne faze po stacionarnoj ploči zbog potiskivanja kapilarnih sila te se tako ispitivani uzorak razdvaja u pojedine komponentne.[15]

1.4.3. SAR tehnika

SAR (engl. *structure-activity relationship*) je jedna od metoda analize odnosa 2D ili 3D strukture molekule i njezine biološke aktivnosti. Metoda se temelji na određivanju funkcionalnih skupina odgovornih za aktivnost molekule u ciljanim biološkim reakcijama u pojedinim ciklusima, stanicama ili sustavima. Primjenom takve analize omogućava se uspješnija modifikacija, a time i optimizacija sintetiziranog analoga bioloških molekula za ciljanu biološku aktivnost ili potrebni mehanizam.

1.4.4. Pojmovi vezani uz enzimsku kinetiku

Michaelisova konstanta ili $\boldsymbol{K_M}$ [μmol dm^{-3}] predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj se ostvaruje polovina maksimalne brzine.

Obrtni broj enzima ili $\boldsymbol{k_{cat}}$ [s^{-1}] je broj molekula supstrata koji molekula enzima pretvori u produkt u jedinici vremena, kada je enzim u potpunosti zasićen supstratom.

Maksimalna brzina ili $\boldsymbol{v_{max}}$ [μmol dm^{-3} s^{-1}] je iznos maksimalne brzine neke enzimske regulirane reakcije.

§ 2. UGRADNJA NEPRIRODNIH PAROVA BAZA U DNA

2.1. Začeci ideje o istraživanju neprirodnih parova baza

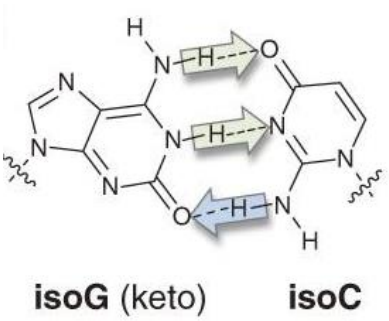
Molekulu DNA prvi je izolirao liječnik i biolog Friedrich Miescher 1869. godine. Strukturu dvostruke uzvojnice DNA u potpunosti su razjasnili 1953. godine biolog James Watson i fizikalni kemičar Francis Crick na temelju podataka dobivenih rentgenskom difrakcijom vlakana DNA. Ubrzo nakon razjašnjenja trodimenzionalne strukture slijedilo je i otkriće genetskog koda šezdesetih godina 20. stoljeća.

DNA je građena od četiri nukleotida, za koji možemo reći da predstavljaju genetsku abecedu. Ova četiri nukleotida grade dva bazna para, adenin i timin te gvanin i citozin. Upravo značaj i raspored tih dviju kombinacija baza potaknut će mnoge buduće generacije znanstvenika u laboratorijima sintetske biologije i biokemije na proučavanje i razvitak neprirodnih nukleotida koji bi imali sposobnost ugradnje unutar molekule DNA te time omogućili pohranu nove informacije, a samim time i ekspresiju gena s novim funkcijama. Također, proširili bi poglede na funkcioniranje bioloških mehanizama vezanih uz prijenos genetske informacije i razjašnjenje podrijetla prirodnih parova baza u ranom razdoblju života na Zemlji.[2]

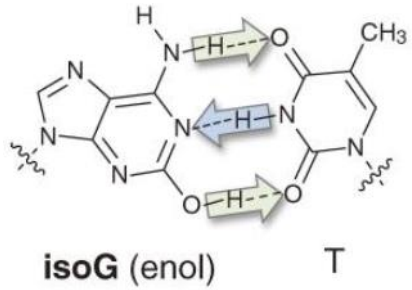
Alexander Rich među prvima je predložio mogućnost postojanja trećeg, neprirodnog baznog para između izo-gvanina (**izoG**, 6-amino-2-ketopurin) i izo-citozina (**izoC**, 2-amino-4-ketopirimidin) kojeg je opisao u svom članku 1962. godine (slika 8). Umjetno sintetiziran par **izoG-izoC** pripravljen je prema dobro poznatim karakteristikama prirodnih baznih parova te sadrži tri vodikove veze i specifičnu geometriju donorsko-akceptorskih atoma u vodikovim interakcijama.

Potaknuti spomenutom idejom grupa znanstvenika pod vodstvom profesora Stevea Bennera kreće u rekonstrukciju i eksperimentira s postojećim neprirodnim parom. Njihova ideja je bila vrlo izravna: konstruiranje baznih parova koji su geometrijski identični postojećim prirodnim Watson-Crickovim parovima na način da im se manipulira prostorno strukturnim akceptorsko-donorskim atomima za vezanje vodika.[3] 1989. godine objavljuju

kemijsku sintezu navedenih nukleotidnih derivata i rezultate istraživanja *in vitro* u replikaciji i transkripciji. Godine 1992. demonstrirali su sustav translacije *in vitro* pri čemu je ugrađena nestandardna aminokiselina 3-jodotirozin na specifičnom mjesto unutar peptida korištenjem novog kodona **izoC**AG u mRNA.[2] Ujedino su istražili može li se neprirodni bazni par ugraditi enzimski tijekom replikacije, koristeći Klenowljev fragment DNA-polimeraze I iz bakterije *Escherichia coli*. Premda su istraživanja pokazala da se u DNA može ugraditi par **izoG**-**izoC**, sveukupna uspješnost i vjerodostojnost sparivanja para **izoG**-**izoC** pokazala su se niskima, jer se izo-gvanin lako može ugraditi nasuprot predloženom timinu i obrnuto. Mogućnost sparivanja izo-gvanina s timinom pripisuje se sposobnosti neprirodnog nukleotida da tautomerijom prelazi iz željenog keto-oblika u termodinamički povoljniji oblik enola (slika 9).



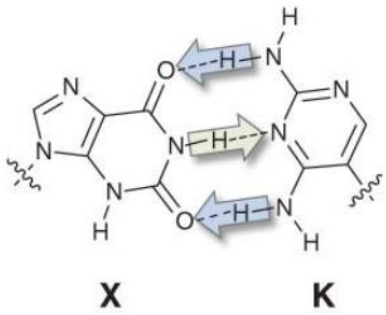
Slika 8. Prikaz strukture neprirodnog para baze **izoG**-**izoC**[2]



Slika 9. Prikaz sparivanja neprirodnog nukleotida **izoG** s prirodnom piridinskom bazom[2]

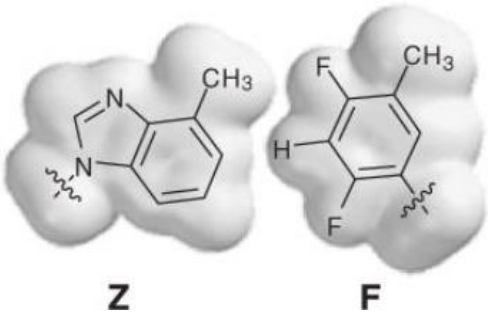
Daljnjim istraživanjima dizajnirali su i neprirodan par između ksantina (**X**) i 5-(2,4-diamino)piridina (**κ**) (slika 10). Nova kombinacija para **X**-**κ** slična je paru gvanin-citozin s razlikama u atomima koji čine vodikove veze u malom utoru. Eksperimentiranje s Klenowljevim fragmentom DNA-polimeraze I iz *E. coli* pokazalo je da se deoksiksantin-monofosfat ugrađuje nasuprot baze **κ** s relativno visokom učinkovitosti te dani bazni par ima veliku vjerodostojnost budući da se deoksiksantin-monofosfat slabo sparuje s bilo kojom od prirodnih pirimidinskih baza, timina i citozina. Međutim, ugradnja nukleotida koji sadrži 5-

(2,4-diamino)pirimidin nasuprot ksantinu nije bila toliko uspješna. To dokazuje da ovi osnovni parovi predstavljaju jedan od primjera asimetrične DNA polimerizacije u kojoj DNA-polimeraze pokazuju veliku sposobnost ugradnje jednog baznog para (ksantin nasuprot 5-(2,4-diamino)pirimidina) u usporedbi s njegovim komplementarnim baznim parom (5-(2,4-diamino)pirimidin nasuprot ksantina).[3]



Slika 10. Prikaz strukturne formule neprirodnog baznog para **X-κ**[2]

Sredinom 1990-ih, Koolova skupina znanstvenika sintetizirala je neprirodni bazni par analogan paru adenin-timin, ali s hidrofobnim interakcijama između 4-metilbenzimidazola (**Z**) i 2,4-difluorotoulena (**F**) te sa sličnim položajima funkcionalnih skupina kako bi istražili doprinos vodikovih veza na selektivnost parova u replikaciji (slika 11).[2] Atomi zaduženi za vodikove veze kod adenina i timina zamijenjeni su drugim atomima u paru **Z-F**. Kod timina je 3-imino skupina zamjenjena s C-H skupinom, a 2-keto i 4-keto skupine zamijenjena su atomima fluora u bazi **F**. Kod adenina je amino skupina zamijenjena s metilnom skupinom, dok su 1-imino i 3-imino skupine zamjenjene su s C-H skupinom u bazi **Z**. Tijekom procesa sparivanja, akceptorska svojstva atoma fluora pokazala su se oko deset puta manja od onih u keto skupini. Studije novosintetiziranog neprirodnog para pokazale su jednaku sposobnost ugradnje kao i prirodnog para A-T. Provedena istraživanja utvrdila su veću važnost komplementarnosti oblika baznih parova nego samih vodikovih interakcija između njih. Iako je takav zaključak pokrenuo mnoge kontroverze, Koolova istraživanja rezultirala su novim saznanjima o samom mehanizmu sparivanja, a samim time proširila vidike na području odabira potencijalnih kandidata za moguće neprirodne nukleotide, odnosno neprirodne parove baza.



Slika 11. Prikaz strukturne formule hidrofobnog neprirodnog para **Z-F**[2]

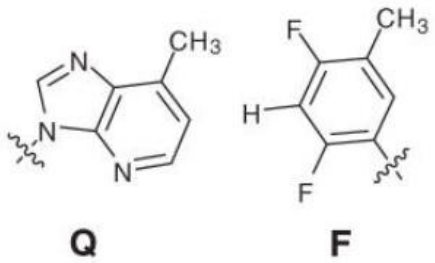
Sve do kraja 1990-ih, sinteze neprirodnih parova baza za nove biološke sustave su konkurentno i vrlo brzo napredovale. Opisana tri para baza razvijena od strane istraživačkih timova i njihovih mentora kao i DNA fragmenti koji sadrže te neprirodne nukleotide mogu se učinkovito i vjerno umnožavati pomoću PCR-a. Međutim, u ranim fazama, kada su otkrivene poteškoće s **izoG-izoC** parom, većina znanstvenika bila je skeptična zbog same ideje uvođenja neprirodnih baza u sadašnje sofisticirane biološke sustave koji su se razvijali tijekom više od milijarde godina.[2] U nastavku ću opisivati napredak razvitka novih neprirodnih parova baza kao i problem njihove sinteze, te čimbenika koji utječu na sparivanje baza.

2.2. Početci razvijanja temeljnih značajki za sintezu neprirodnih nukleotida

Kada govorimo o sintezama novih spojeva, početak samog projektiranja molekulskih struktura ili modificiranja postojećih stabilnih vrsta temeljeno je na određenoj ideji ili konceptu koji je zasnovan na dobro istraženim čimbenicima. Tako je i za stvaranje neprirodnih parova baza potrebno prvo vrlo detaljno proučiti reakcije sparivanja prirodnih parova, mehanizam i čimbenike koji tome doprinose ili pak uzrokuju inhibicije. Kao što je već u Uvodu spomenuto, postoje dva prirodna para, između purinskih i pirimidinskih baza, u kojima su duljine glikozidne veze baznih parova konstantne i iznose 10,7 Å – 11,0 Å.[2] Upravo ta konstantna udaljenost u dvolančanim molekulama DNA uvjetuje pristup DNA-polimerazama tijekom replikacije. Dolaskom komplementarnog deoksiribonukleozid-trifosfata nasuprot nukleotidu u lancu kalupa DNA spontano se stvaraju vodikove veze, a uzorci vezanja vodika kombinacija su akceptorsko-donorskih atoma koji su u položajima specifičnim za pojedine parove. Do Koolovih eksperimenata, mislilo se da su vodikove

interakcije temeljni način prepoznavanja, a samim time i sparivanja komplementarnih baza, no daljnjim istraživanjima na tom području znanosti utvrdilo se da je ključni faktor za selektivnost baznih parova strukturna komplementarnost oblika para baza tijekom procesa sparivanja.

Uz sve navedene čimbenike, u obzir treba uzeti i polarnost, električna odbijanja atoma kao i hidrofobnost baza te interakcije DNA-polimeraza s malim utorom pri ugradnji neprirodnih parova baza. Kristalografijom rentgenskog zračenja na uzorku kompleksa koji sadrži DNA fragmente, trifosfatne supstrate i DNA-polimeraze otkriveno je da su 3-dušikov atom adenina i gvanina te 2-keto skupina citozina i timina, koji se nalaze unutar malog utora, u izravnoj interakciji s bočnim ograncima aminokiselina u DNA-polimerazama ili posredno putem molekule vode. Pokusi replikacije pomoću analoga baza pokazali su važnost tih interakcija. Analozi nukleozid-trifosfata pirimidina, 2-aminopiridin-5-il i 3-metil-2-piridon-5-il, koji nemaju 2-keto skupinu u odnosu na citozin i timin, snažno inhibiraju PCR umnožavanje pomoću *Taq*-DNA-polimeraze ili Klenowljevog fragmenta DNA-polimeraze I iz bakterije *E. coli*.[2] Nadalje, Koolova grupa znanstvenika sintetizirala je modificiranu **Z** bazu, 9-metil-1-H-imidazo[(4,5)-b]piridin (**Q**), u kojoj je ugljik **Z** baze, koji odgovara položaju 3 u purinu, zamijenjen s atomom dušika. Spomenuta modifikacija rezultirala je povećanom učinkovitosti sparivanja **Q-F** baznog para (slika 12) tijekom replikacije Klenowljevim fragmentom u odnosu na par **Z-F**.



Slika 12. Prikaz strukturne formule hidrofobnog neprirodnog baznog para **Q-F**[2]

Iz danih eksperimenata može se zaključiti kako je promjena samo jednog atoma unutar cijele strukture molekule od bitnog značaja za prepoznavanje sa njegovim srodnim parom te također spomenuta zamjena može imati veliki utjecaj na brzinu sparivanja. Upravo takav princip rada, *„proof of concept“*, tijekom kojeg se uočeni propusti ili problemi bilježe te pravilno modificiraju s novim skupinama ili atomom, mogu uvelike pospješiti njihovu učinkovitost u replikaciji i transkripciji. Kako bi se ispitala učinkovitost enzimske ugradnje i selektivnost

novostvorenih parova baza, primjenjuju se polimerazne reakcije u sustavima *in vitro*. Iz proučavanja reakcija replikacije, kinetički parametari ustaljenog stanja (v_{max}/K_M ili k_{cat}/K_M) s obzirom na srodne i nesrodne bazne parove određeni su uobičajenim eksperimentom za procjenu učinkovitosti enzimske ugradnje analoga nasuprot baze u lancu kalupu. Eksperimenti umetanja/ugradnje pojedinačnog nukleotida izvedeni su kombinacijom svakog analoga sa svakom bazom u lancu kalupa i Klenowljevim fragmentom bez 3'-egzonukleazne aktivnosti. Obično se koristi analiza na gelu koja koristi radioaktivno obilježene početnice kako bi se utvrdili parametri svih mogućnih kombinacija srodnih i nesrodnih, prirodnih i neprirodnih parova baza. Međutim, analize na gelu su izrazito dugotrajne i zahtjevne, stoga se takva metoda poboljšala pomoću automatskog sekvenatora DNA s fluorescentno označenim nukleotidima.

Buduća istraživanja u laboratorijima za razvoj neprirodnih parova baza temelje se na metodama rada koja koriste specifična PCR umnožavanja kao temeljni korak kojim bi se omogućio veći prinos sintetiziranih fragmenata DNA koji sadrže željene neprirodne parove, a koji služe kao DNA predlošci za upotrebu u daljnjim biološkim procesima. S obzirom da se umnoženi fragmenti DNA ponovno koriste kao predlošci u sljedećoj etapi PCR umnožavanja, bitna je visoka selektivnost sparivanja srodnih baza.[5] Ako selektivnost sparivanja neprirodnih baza, koja je označena selektivnošću (%) inkorporiranja neprirodnih supstrata nasuprot paru u lancu kalupu, iznosi 99,9% po replikaciji, tada će umnoženi fragmenti DNA zadržati 96% neprirodnih parova nakon 40 ciklusa PCR ($0{,}999^{40} = 0{,}961$) u teorijskom eksponencijalnom umnožavanju. Međutim, 99,0% selektivnosti sparivanja neprirodnih parova baza smanjilo bi se na 67% u umnoženim produktima nakon 40 ciklusa PCR ($0{,}990^{40} = 0{,}669$).[5] Nadalje, za vjernost sparivanja neprirodnih baza također su potrebne iznimno niske koncentracije mnoštva neprirodnih supstrata nasuprot prirodnim bazama u predlošcima. Čak i ako stopa pogrešno sparenih parova iznosi 0,10% prirodnih pb po replikaciji, do 33% prirodnih parova baza u slijedu od deset baza baziranih na PCR početnicama mutirati će se u neprirodne parove nakon 40 ciklusa ($0{,}33 = 1 - [(1 - 0{,}10/100)^{10}]^{40}$) u teorijskom eksponencijalnom pojačavanju.[5] Kako bi se unaprijedile nove metode rada u laboratorijima, potrebno je pridodati veću važnost pravilnom sparivanju, a time i što više smanjiti pogrešno sparivanje neprirodnih sa prirodnim bazama na način da se provode studije potencijalnih kandidata na temelju poznatih čimbenika.

2.3. Ugradnja neprirodnih nukleotida povezanih vodikovim vezama

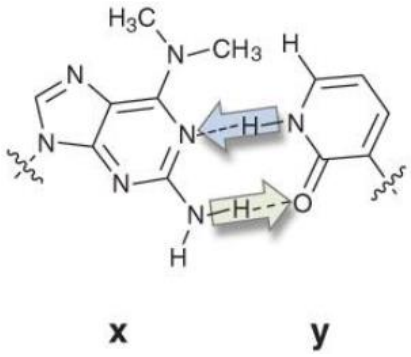
2.3.1. Rane faze istraživanja neprirodnih parova baza

Skupina znanstvenika pod vodstvom profesora Bennera među prvima je proučila svojstva neprirodnih parova baza povezanih vodikovim interakcijama, kao što su **izoG-izoC** i **X-κ**. Njihova istraživanja otkrila su mogućnost postojanja sustava genske ekspresije koji koriste neprirodne parove baza te su također uočili i nekoliko slabosti njihovih parova za praktičnu primjenu. Prvo, u odnosu na prirodne baze, baze **izoC**, **X** i **κ** imaju proton donor na 2-amino (u **izoC** i **κ**) ili 3-imino (u **X**) skupinama na manjoj strani utora, što je nepovoljno za prepoznavanje s DNA-polimerazom, čime se smanjuje njihova sposobnost ugradnje. Drugo, **izoC** nukleotid je kemijski nestabilan u lužnatim i kiselim uvjetima, što otežava pripravu **izoC**-oligonukleotida kemijskom sintezom. Treće, neprirodne baze povezane vodikovim vezama ponekad su nestabilne zbog same geometrije vezanja vodika uzrokovane tautomerijom.[2] Posebice, **izoG** se podvrgava keto-enolnoj tautomeriji ovisno o polarnosti otapala. Enolni oblik **izoG** se sparuje s timinom, što uvelike smanjuje selektivnost para **izoG-izoC**. Zbog navedenih nedostataka, istraživanja neprirodnih parova usporila su se tijekom sredine 1990-ih.

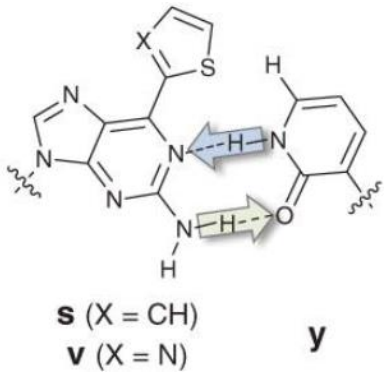
Japanska skupina znanstvenika predvođena sa doktorom I. Hirao pokrenula je 1997.godine studije neprirodnih parova rješavajući probleme baznog para koje je započela Bennerova grupa. Kombinirajući Bennerov koncept geometrije vezanja vodika s idejom steričke smetnje, dizajnirali su, a potom i sintetizirali niz neprirodnih parova baza između 2-amino-6-modificiranih purina i piridin-2-ona (**Y**), kao što je 2-amino-6-(N,N-dimetilamino)purin (**X**) i **Y** (slika 13), 2-amino-6-(2-tienil)purin (**S**) i **Y** te 2-amino-6-(2-tiazol)purin(**V**) i **Y** (slika 14).[2] U ovim neprirodnim parovima, ogromni supstituenti na položaju 6 u bazama **X**, **S** i **V** onemogućuju pogrešno sparivanje baza s prirodnim pirimidinima zbog steričkih interakcija s 4-keto skupinom timina ili uracila te 4-amino skupinom citozina. No, tijekom sparivanja s bazom **Y**, skupni 6-supstituenti mogu ugostiti 6-atom vodika baze **Y**, što odgovara položaju 4 u pirimidinima. Parovi **X-Y**, **S-Y** i **V-Y** vrlo dobro funkcioniraju u transkripciji, tako da T7-RNA-polimeraza ugrađuje supstrat deoksi**Y**-trifosfat u RNA nasuprot **X**, **S** ili **V** u kemijski sintetiziranim kalupima DNA.

Među spomenutima, najuspješniji par u učinkovitosti i selektivnosti sparivanja tijekom T7-transkripcije je **V-Y**, iza kojeg slijedi **S-Y** te **X-Y**.[2] U usporedbi sa slobodno rotiranom 6-dimetilamino skupinom baze **X**, planarni i elektronegativni atomi 6-heterocikla, tiazolil u **V** i tienil u **S**, učinkovito isključuju sparivanje s prirodnim bazama, posebice timinom ili

uracilom, radi elektronskog odbijanja s 4-keto skupinom i steričkih smetnji. Također, dvolančana DNA koja sadrži **S**-**Y** ili **V**-**Y** par je termodinamički povoljnija od one s parom **X**-**Y**. Razlog tome su 6-heterocikli koji su u interakciji s njihovim susjednim prirodnim bazama u dvolančanoj DNA. Međutim, nukleotidni derivati baze **V** su kemijski manje stabilni u bazičnim uvjetima, u odnosu na one baze **S**. Zaključno, **S**-**Y** par je najkorisniji neprirodni par transkripcijskog sustava.



Slika 13. Prikaz strukturne formule neprirodnog para **X**-**Y**[2]

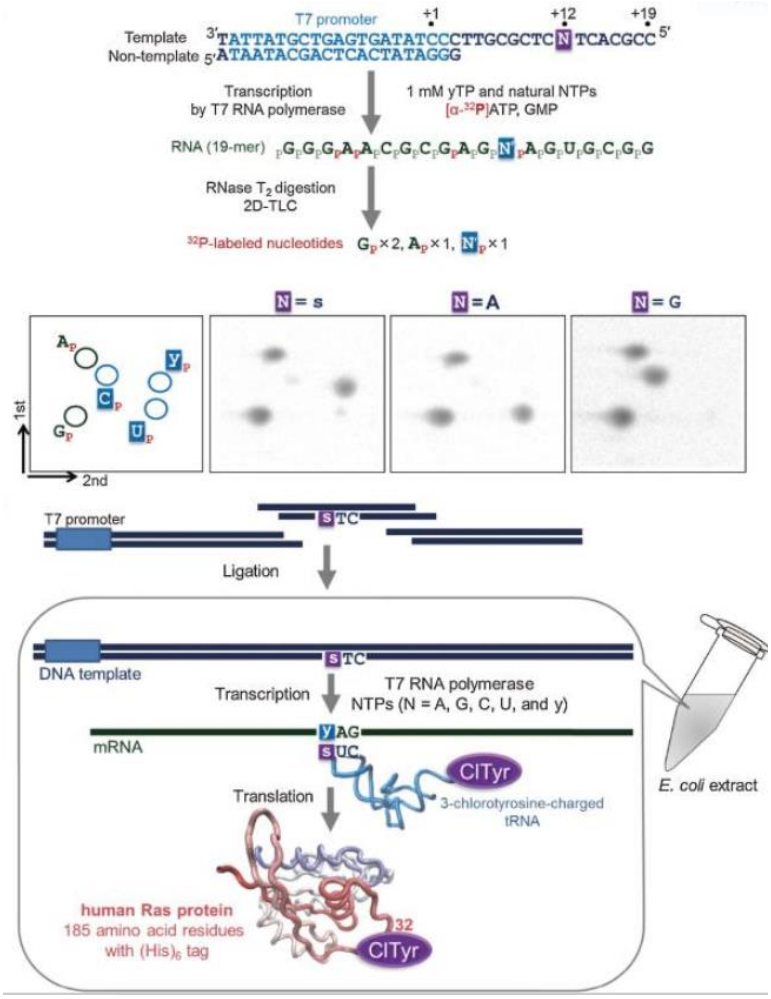


Slika 14. Prikaz strukturne formule neprirodnih parova baza[2]

*2.3.2. Istraživanje procesa transkripcije pomoću para baza **S**-**Y***

Ugrađivanje ribo**Y**-trifostata na određeno mjesto unutar molekule RNA potvrđeno je analizom nukleotidnog sastava transkripta pomoću dvodimenzijske tankoslojne kromatografije (engl. *2D-TLC*). Za analizu su korištene tri djelomično dvolančane DNA čijom transkripcijom nastaju odsječci RNA duljine 19 nukleotida. T7-transkripcija izvedena je u prisutnosti prirodnih i neprirodnih baza, te [α-^{32}P] ATP-a koji je sadržavao radioaktivno obilježen izotop fosfora (slika 15). Jedna djelomično dvolančana DNA sadržavala je nukleotid **S** u lancu kalupa koji je trebao dirigirati ugradnju nukleotida **Y** u transkript. Budući da je

sljedeći nukleotid nakon **S** u kalupu bio timin, u transkript je ugrađen ^{32}P-obilježeni adenilat nakon ugradnje **Y**.[2] Time je fosfat na 3'-kraju **Y** radioaktivno obilježen, a razgradnjom transkripta RNazom T_2 (ribonukleaza bez bazne specifičnosti koja razgrađuje fosfodiestersku vezu nakon 3'-fosfata) dobiveni su 3'-označeni nukleotidi koji su analizirani i kvantificirani pomoću 2D-TLC. Analiza T7-transkripcije u prisutnosti 1 mmol dm^{-3} ribo**Y**-trifosfata i prirodnih NTP-a pokazala je da je više od 90% **Y** nukleotida ugrađeno na određeno mjesto unutar RNA suprotno nukleotida **S** u kalupu. Osim toga, ugradnja **Y** nukleotida u transkript nasuprot prirodnih baza u kalupu nije značajno zapažena, što potvrđuje specifičnost para **S-Y**.

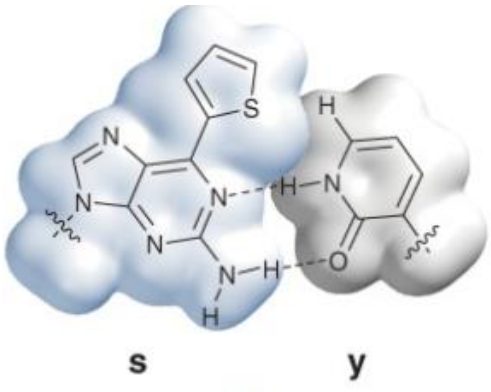


Slika 15. Slikoviti prikaz opisanog postupka transkripcije para **S-Y**[2]

Ovako opisana transkripcija para **S-Y** kombinirana je s translacijskim sustavom *in vitro* te je 2002. godine uspješno ugrađena nestandardna aminokiselina, 3-klortirozin, na određeno mjesto u humani Ras protein. Sustav transkripcije i translacije testiran je *in vitro*, korištenjem

3-kloritirozil-$tRNA_{CUS}$ koja sadrži antikodon 5’ CU**S** 3’ koji je komplementaran kodonu **Y**AG u mRNA, koji nastaje transkripcijom DNA kalupa koji sadrži slijed **S**TC.[2] Analiza masenom spektrometrijom dobivenog proteina potvrdila je ugradnju 3-klortirozina na specifični položaj 32 u Ras proteinu. Ovo je bio prvi postignuti uspjeh izravne sinteze proteina koji sadrži nestandardnu aminokiselinu na točno određenom mjestu pomoću transkripcije i translacije.

Osim toga, specifična transkripcija para **S**-**Y** također je primijenjena za generiranje molekula RNA s dodatnim funkcionalnim komponentama na željenim mjestima. Modificirana mjesta u molekuli RNA postižu se kemijskom sintezom RNA, posttranskripcijskom modifikacijom i enzimskom ugradnjom nukleotidnih analoga kao supstrata. Kemijska sinteza se primjenuje najčešće, no takvim je načinom jedino moguće pripraviti male molekule RNA. Upravo iz razloga što su posttranskripcijske modifikacije i enzimska ugradnja ograničene samo na 5'- ili 3'-kraj molekule RNA, ugradnja i selektivnost nisu dovoljno učinkovite. Nasuprot tome, transkripcija parova **S**-**Y** i **V**-**Y** omogućuje selektivno ugrađivanje mnoštva modificiranih analoga baze **Y**, koje sadrže određene funkcionalne skupine, u željene položaje transkripata RNA. Serija modificiranih ribo**Y**-trifosfata, kao što su jodo-, amino-, biotin- i fluoro-**Y** nukleotidi, sintetizirana je kemijski. Navedeni modificirani ribo**Y**-trifosfati mogu se specifično ugraditi u RNA, suprotno **S** ili **V** u kalupu pomoću T7-transkripcije.

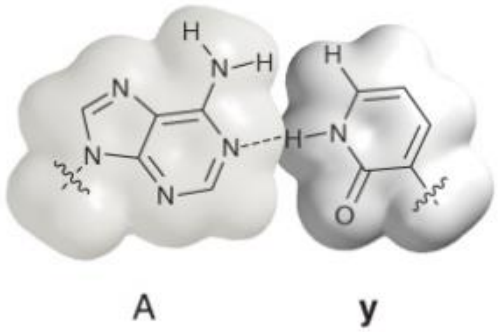


Slika 16. Prikaz strukturne formule para **S**-**Y**[2]

*2.3.3. Mogućnosti za daljnja poboljšanja karakteristika para **S**-**Y***

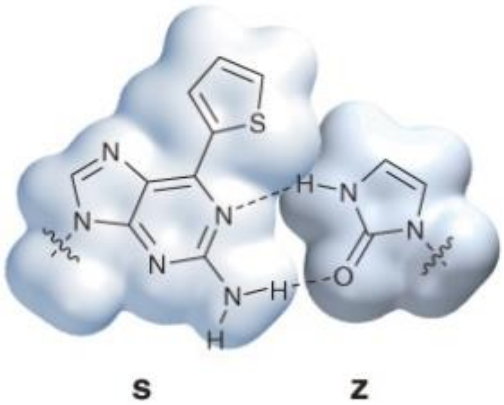
Kako bi ugradili **Y** u RNA nasuprot bazi **S** u kalupu DNA, potrebna je transkripcija pomoću **S**-**Y** para. Međutim, kao što je već prethodno spomenuto, ugradnja baze **S** u molekulu RNA nasuprot **Y** u kalupu manje je uspješnija. Iako 6-tienilna skupina baze **S** učinkovito sprečava sparivanje s prirodnim pirimidinskim bazama, baza **Y** ne sadrži takvu funkcionalnu skupinu

da bi se isključilo sparivanje s prirodnim purinskim bazama.[2] Baza **Y** je strukturno komplementarna s adeninom (slika 17), kao i bazom **S**. Dakle, pogrešna ugradnja ATP u RNA nasuprot bazi **Y** u kalupu DNA glavni je problem, a par **S-Y** koristi se samo kao jednosmjerni treći neprirodni par baza za transkripciju.



Slika 17. Prikaz strukturne komplementarnosti prirodne baze adenin sa neprirodnom bazom **Y**[2]

Kako bi se riješio spomenuti problem, potrebno je redizajnirati bazu komplementarnu bazi **S**, te se tako baza **Y** zamjenila sa novosintetiziranim imidazolin-2-on (**Z**) (slika 18). Peteročlani prsten baze **Z** smanjuje komplementarnost oblika s adeninom, u odnosu na bazu **Y**.



Slika 18. Prikaz strukturne formule neprirodnog para baza **S-Z**[2]

Općenito, hidrofilne baze se hidratiziraju s okolnim molekulama vode, a baza sparena s manje komplementarnom bazom ne može isključiti vodu i oblikovati ispravan par. Osim toga, mali prsten baze **Z** dobro se smješta u **S-Z** par. Kako bi se ispitala učinkovitost i selektivnost sparivanja para **S-Z**, sintetizirani su nukleotidni derivati baze **Z** te se potom ispitala

učinkovitost i selektivnost **S-Z** sparivanja u replikaciji i transkripciji, u usporedbi s prethodnim **S-Y** parom. Kao što je i očekivano, kinetika ustaljenog stanja pojedinačnih nukleotidnih eksperimenata korištenjem Klenowljevog fragmenta otkriva da je selektivnost nesrodnog para adenin-**Z** ($v_{max}/K_M = 1.6\times10^4$ za ugradnju dATP nasuprot **Z)** znatno smanjena u odnosu na nesrodni par adenin-**Y** ($v_{max}/K_M = 1{,}5\times10^5$ za ugradnju dATP nasuprot **Y**).[2] U T7-transkripciji, baza **Z** je oblikom veća od baze **Y** prilikom ugradnje na specifično mjesto u RNA. Međutim, ugradnja baze **Z** nasuprot bazi **S** u DNA i RNA bila je manje učinkovita, u odnosu na ugradnju baze **Y** nasuprot **S**. Razlog tome je manja hidrofobnost baze **Z** čime se smanjuje njezina mogućnost interakcije s DNA-polimerazama. Poput DNA-polimeraze, T7-RNA-polimeraza također preferira hidrofobne baze kao supstrate. Također, termodinamička stabilnost dvolančanih DNA fragmenata koji sadrže **S-Z** par je niža, u usporedbi s onima s **S-Y** parom. Dakle, za novi kodon i antikodon u translaciji, **S-Y** je bolji od **S-Z** para. Iz navedenih razloga, sustav dvostrukih neprirodnih parova baza **S-Y** i **S-Z** mogao bi se primijeniti kao zajednički transkripcijski i translacijski sustav za specifično mjesto ugradnje nestandardnih aminokiselina u proteine. **S-Y** može se upotrijebiti za pripremu mRNA koja sadrži **Y**, a **S-Z** par je koristan za pripravu tRNA koji sadrži **Z** uz T7-transkripciju.

Do sada, sve provedene studije neprirodnih parova baza povezanih vodikovim vezama vrlo dobro su funkcionirale kao treći par baza u transkripciji i translaciji. Međutim, tijekom replikacije, selektivnost proučenih neprirodnih parova još uvijek nije dovoljna. Neki od ostataka atoma potrebnih za vezanje vodika i ostali atomi baze **S**, **Y** i **Z** privlače prirodne hidrofilne baze u replikaciji.[2] Nadalje, male hidrofilne molekule, poput baze **Z**, nisu povoljne za interakcije s polimerazama. Stoga su sva buduća istraživanja usmjerena na stvaranje neprirodnih parova baza sa hidrofobnim interakcijama.

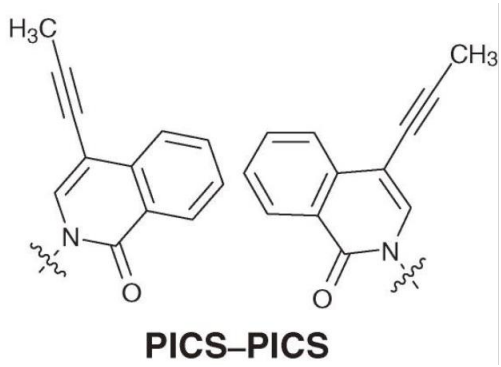
2.4. Ugradnja hidrofobnih neprirodnih parova baza

2.4.1. Napori pri ugradnji hidrofobnih neprirodnih parova baza

Prva istraživanja neprirodnih parova baza povezanih hidrofobnim interakcijama pokreće sredinom 1990-ih godina Koolova grupa znanstvenika. Zbog gore spomenutih čimbenika, nakon niza neuspjeha ugradnje neprirodnih baza povezanih vodikovim interakcijama, sve buduće studije temeljene su na istraživanju hidrofobnog pakiranja. Jedan od razloga takvog preokreta jest hidrofobnost polimeraza što ukazuje da bi se hidrofobne baze preko aromatskih aminokiselinskih ostataka u polimerazama mogle učinkovitije sklopiti sa dolaznom bazom

supstrata. Tijekom stvaranja koncepta za ugradnju hidrofobnih parova baza mnogo se raspravljalo o tome da li su bitnije same interakcije između atoma u molekuli ili komplementarnost oblika baza. Studije su pokazale da se baze koje nemaju međusobno podešene skupine za bilo koju vrstu interakcije, a komplementarne su oblikom, mnogo učinkovitije se sparuju nego baze sa podešenim atomima i različitim strukturama.

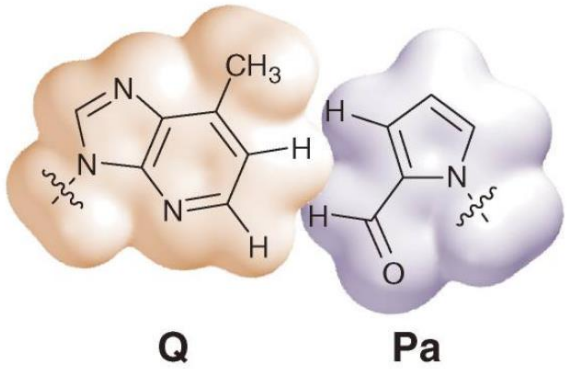
Romesbergova skupina je 1999. godine objavila svoja istraživanja o uspješnosti hidrofobnog sparivanja i to o sposobnosti samosparivanja između 7-propinilizokarbostirila (**PICS**) u pokusima ugradnje jednog nukleotida.[2] Pomoću Klenowljevog fragmenta navedeni **PICS** je bio vrlo učinkovito ugrađen u DNA suprotno **PICS** u kalupu DNA. Također, dvolančana molekula DNA koja sadrži par **PICS-PICS** (slika 19) pokazala je veliku termodinamičku stabilnost u odnosu na one koje sadrže sparene nesrodne parove **PICS** i svakog od četiri prirodna nukleotida. Iako je ugradnja jednog takvog para bila vrlo uspješna, umnožavanje daljnjeg niza bilo je spriječeno. Neomogućena daljnja reakcija umnožavanja posljedica je veličine strukture baze **PICS** koja se ne može smjestiti unutar dvolančane molekule DNA, pa tako hidrofobne **PICS** molekule postavljene jedna na drugu tijekom sparivanja slažu neobičnu strukturu koju DNA-polimeraza ne može prepoznati.



Slika 19. Prikaz strukturne formule para **PICS-PICS**[2]

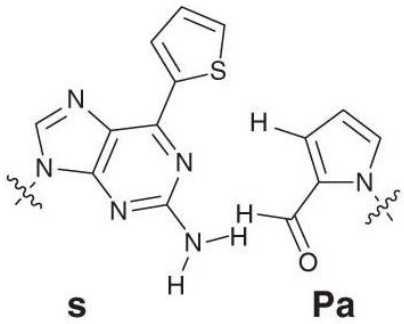
2003. godine proučavanjem Koolovih sintetiziranih parova **Z-F** i **Q-F**, koji su hidrofobni analozi prirodnog para adenin-timin, otkriveno je da njihova bazna komplementarnost još uvijek nije dovedena do savršenosti te da si atomi vodika u središtu sparivanja međusobno stvaraju steričke smetnje. Takva sterička smetnja je uklonjena uvođenjem peteročlanog prstena umjesto dosadašnjeg šesteročlanog baze **F**. Tako je dizajniran pirol-2-karbaldehid (**Pa**) kao komplementarniji par za sparivanje s Koolovom bazom **Q**.[2] Kako bi se isključilo sparivanje nesrodnog adenina s bazom **Pa**, dodatno je uvedena aldehidna skupina na bazu, a i

time se dodatno povećala interakcija utora s DNA-polimerazama. Sintetizirajući analoge baze **Pa** te ispitujući njihovu selektivnost sparivanja sa **Q** NMR analizom, uočeno je da je geometrija **Q-Pa** para (slika 20) u dvolančanoj molekuli DNA najsličnija do sada prirodnim parovima pri čemu se još jednom zaključila važnost podešavanja komplementarnosti oblika novosintetiziranih neprirodnih parova baza. Međutim, iako su dotadašnje studije pokazale samo uspješnost para, valja spomenuti da je baza **Q** analog adenina, a time je **Q** srodan s timinom. Tijekom umnožavanja je također uočeno se da deoksi**Q**-trifosfat samokomplementarno ugrađivao nasuprot **Q** u DNA kalupu, kao i par **PICS-PICS**, čime je daljnje umnožavanje onemogućeno.[2]



Slika 20. Prikaz strukturne formule para **Q-Pa**[2]

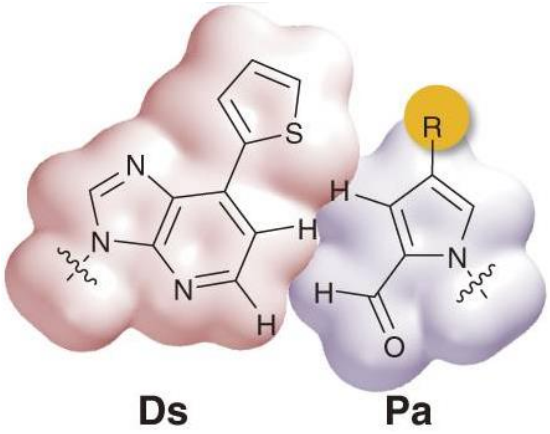
Uzevši sve provedene studije u obzir, utvrdilo se da par **S-Pa** (slika 21) vrlo dobro funkcionira ugradnjom ribo**S**-trifosfata na specifično mjesto u RNA suprotno **Pa** sa većom učinkovitosti od para **S-Z** tijekom T7-transkripcije. Usprkos nižoj kompatibilnosti **S-Pa**, u usporedbi sa **S-Z** parom, učinkovitost same ugradnje nasuprot bazi **Pa** bila je veća od one nasuprot **Z** u kalupu. Razlog takvom rezultatu je veća hidrofobnost baze **Pa** u odnosu na bazu **Z**. Iako se **S-Pa** par ne može upotrijebiti u replikaciji, takav koncept rada doveo je do nove ideje za stvaranje osnovnog neprirodnog para.



Slika 21. Prikaz strukturne formule para **S-Pa**[2]

2.4.2. PCR-analize uspješnosti sparivanja hidrofobnih neprirodnih parova baza

Ideja za stvaranje neprirodnog osnovnog para temeljena na proučavaju svojstava hidrofobnog para **S-Pa** rezultirala je dizajnom 7-(2-tienil)-imidazo[4,5-b]piridina (**Ds**) kao novom komplementarnom bazom za bazu **Pa** (slika 22).[2]

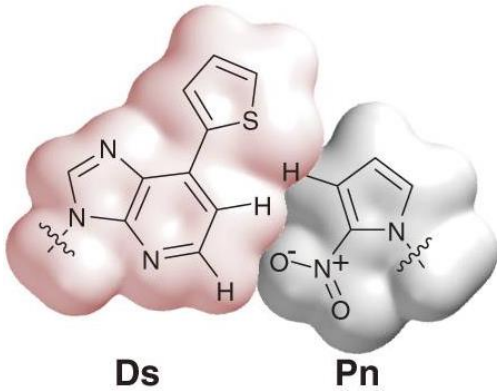


Slika 22. Prikaz strukturne formule para **Ds-Pa**[2]

Iako je učinkovitost ugradnje baze **Ds** nasuprot **Pa** bila vrlo dobra kao i ugradnja **Ds** nasuprot **Ds**, nakon ugradnje samokomplementarne baze **Ds**, PCR umnožavanje je ponovno zaustavljeno. Upravo ta samokomplementarnost baza postala je težak problem specifičan za hidrofobne neprirodne parove baza. Kako bi se taj problem riješio i sa parom **PICS-PICS**, Romesberg je modificirao DNA-polimeraze tehnikom usmjerene evolucije kako bi se razvile mutirane polimeraze sposobne za kontinuirano produljenje nakon ugradnje **PICS-PICS**. Međutim, japanski znanstvenici pod vodstvom doktora I. Hirao taj problem su riješili na drugačiji način radeći sa parom **Ds-Ds**. Slučajnom sintezom analoga γ-amidotrifosfata **Ds**

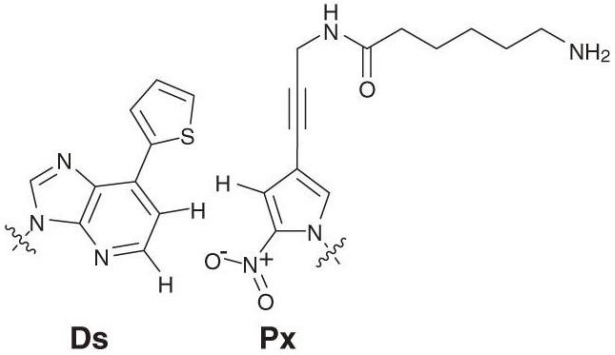
(d**Ds**TP_{NH2}) i adenina koji se često ugrađivao umjesto uobičajenog **Ds** para, uočilo se moguće sparivanje i sa **Pa** u većem udjelu nego s bazom **Ds**. Specifičnost tog analoga je u tome što on smanjuje pogrešku u sparivanju, ali njegovom upotrebom se smanjuje i učinkovitost PCR umnožavanja i ograničava *in vivo* aplikacija.[4] Dakle, daljnji razvoj neprirodnih sustava baza koji zaobilaze upotrebu tog analoga, ali koji zadržavaju veliku učinkovitost (>99,9%) u PCR-u, mogao bi otvoriti put u šire praktične primjene.

Iako je **Ds-Pa** bio prvi treći neprirodni bazni par koji selektivno djeluje u PCR sustavu zajedno sa prirodnim parovima baza, sama primjena tog para je ograničena zbog upotrebe γ-amidotrifosfata **Ds** i adenina.[2] Kako bi se izbjegle reakcije sa spomenutim analogom, a zadržala visoka selektivnost u PCR, aldehidna skupina baze **Pa** zamijenjena je s nitro skupinom. Dobiveni 2-nitropirol (**Pn**) trebao je izbjeći upotrebu γ-amidotrifosfata adenina. Nitro skupina baze **Pn** sprečava sparivanje sa adeninom elektrostatskim odbijanjem između atoma kisika nitro skupine i dušika na položaju 1 na adeninu.



Slika 23. Prikaz strukturne formule para **Ds-Pn**[2]

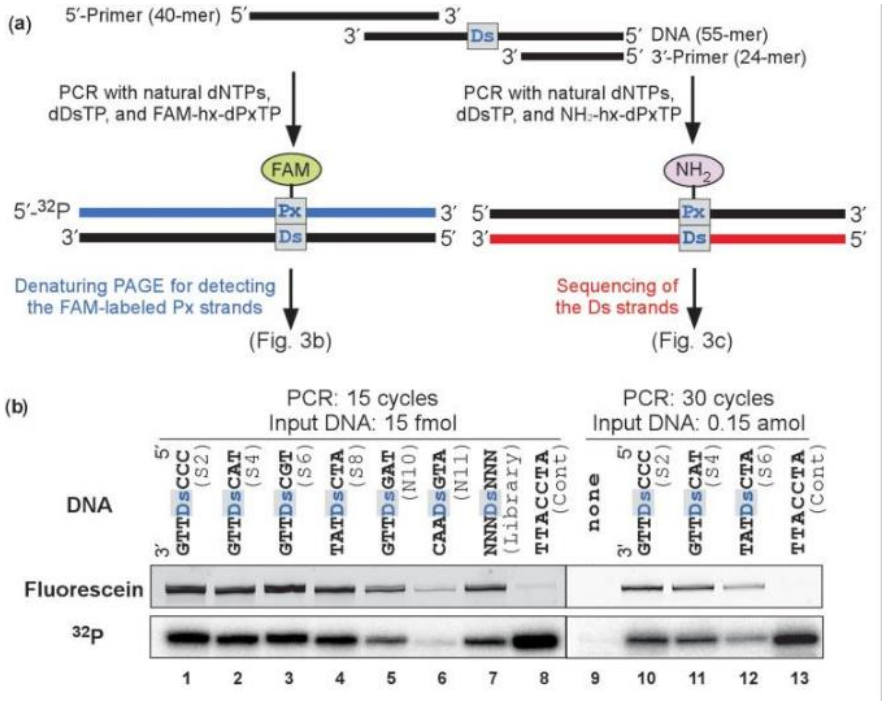
Daljnjim modifikacijama sintetiziran je i 4-[3-(6-aminoheksanamido)-1-propinil]-2-nitropirol (**Px**) kao srodan par bazi **Ds** (slika 24).[2]



Slika 24. Prikaz strukturne formule para **Ds-Px**[2]

Povećavanjem hidrofobnosti baza jača se afinitet vezanja s polimerazama što omogućuje veću učinkovitost ugradnje d**Px**-trifosfata suprotno **Ds** od onih d**Pa**-trifosfata suprotno **Ds** i d**Pn**-trifosfata suprotno **Ds**, kao i d**Ds**-trifosfata nasuprot **Ds** u eksperimentima koja su provedena s pojedinačnim nukleotidnim umetanjem koji koriste Klenowljev fragment.[4] Sustav **Ds-Px** više ne zahtijeva upotrebu γ-amidotrifosfata, a osigurava učinkovitu ugradnju u DNA molekulu.

Da bi se postigla još bolja učinkovitost i selektivnost sparivanja para **Ds-Px** u PCR-u, proučavao se utjecaj sljedova prirodnih baza koje okružuju neprirodni hidrofobni par u DNA kalupu na učinkovitost replikacije. Sintetizirano je osam fragmenata izoliranih sljedova (DNA S1-S8) koji sadrže **Ds**, kao i drugi dizajnirani sljedovi (DNA N9-N12) koje nisu dobiveni selekcijom, a njihovo umnožavanje je postignuto uporabom FAM-hx-d**Px**TP ili NH_2-hx-d**Px**TP s 5'-početnicom označenom s ^{32}P na 5'-kraju. Naime, FAM-hx-d**Px**TP i NH_2-hx-d**Px**TP su modificirani d**Px**-trifosfati, koji su funkcionalizirani s aminoheksanamidnom (NH_2-hx-d**Px**TP) ili s (fluorescein-5-karboksamidom)heksaamidnom skupinom (FAM-hx-d**Px**TP). Umnoženi DNA fragmenti analizirani su detekcijom njihove FAM fluorescencije i ^{32}P radioaktivnosti na gelu. Vrlo male količine DNA fragmenata koji su sadržavali **Ds** (DNA S2, S4, S6 i S8) učinkovito su umnoženi i detektirani fluorescentno i radioaktivno (Shema 1, pod b, linije 1-4 i 10-12). DNA fragment koji sadrži slijed 3'-TTACCTA-5' bez **Ds**, umnožen je u prisutnosti FAM-hx-d**Px**TP, otkriveno je radioaktivno, ali je vrlo teško prepoznata fluorescencija (Shema 1, pod b, linije 8 i 13). To znači da je FAM-hx-d**Px**TP selektivno ugrađen u odnosu na **Ds** u kalupima. Učinkovitost umožavanja N11 DNA, s komplementarnim slijedom S4 DNA, značajno je smanjena (Shema 1, pod b, linija 6), a N10 DNA, koja ima točnu mutaciju **Ds** na 5'-susjednoj S4 DNA, umnožena je s mnogo slabijom učinkovitosti (Shema 1, pod b, crta 5), u odnosu na onu S4 DNA. Odabrani sljedovi *in vitro* pokusima pokazuju visoku učinkovitost umnožavanja i selektivnosti za **Ds-Px** sparivanje.[4] Također, koristeći se i sljedovima 5'-CAC**Px**GTA-3'/ 3'-GTG**Ds**CAT-5' (DNA N12) utvrđena je uspješnost. Stoga, učinkoviti slijedovi za PCR mogu se sažeti kao 5'-CRM**Px**GNR-3'/ 3'-GYK**Ds**CNY-5' (gdje R = adenin ili gvanin, M = adenin ili citozin, N = adenin, gvanin, citozin ili timin, Y = citozin ili timin, te K = gvanin ili timin).[4]



Shema 1. Prikaz PCR umnožavanja DNA fragmenata (55-mer) koja sadrži jednu bazu **Ds**. Pod: (**a**) Shema PCR umnožavanja u prisutnosti FAM-hx-d**Px**TP ili NH_2-hx-d**Px**TP. Za detektiranje DNA fragmenata koji sadrže FAM-hx-**Px**, korišena je analiza PAGE. DNA fragmenti umnoženi s NH_2-hx-d**Px**TP i d**Ds**TP korišteni su za sekvenciranje **Ds** lanaca. (**b**) Analiza DNA fragmenata na poliakrilamidnom gelu umnoženih s 15 ili 30 ciklusa PCR s 5'-početnicom označenom s ^{32}P na 5'-kraju u prisutnosti FAM-hx-d**Px**TP i d**Ds**TP.[4]

*2.4.3. Uspjeh sparivanja neprirodnog para baza **Ds-Px***

Tijekom intenzivnih istraživanja u proteklih dvadesetak godina, idejom zamišljeni i kemijski sintetizirani nizovi neprirodnih parova baza bili su predstavljeni kao mogući kandidati za treći bazni par u replikaciji, transkripciji i translaciji. Ponavljanjem eksperimenata temeljenog na *"proof of concept"*, postupno se poboljšavala učinkovitost i selektivnost u sparivanju stvarajući nove modifikacije na sintetiziranim molekulama, koje su potom iskušane u replikaciji kao parovi baza. Konačno, razvijen je par **Ds-Px**, koji pokazuje izuzetno visoku učinkovitost i selektivnost u PCR-u. Selektivnost sparivanja baze **Ds** s bazom **Px** iznosi 99,8-99,9% po replikaciji, a stopa pogrešnog sparivanja neprirodnih s prirodnim bazama iznosi svega 0,005% po bazi u replikaciji.[2] **Ds-Px** par ima jedinstvenu osobinu fluorescencije zahvaljujući bazi **Ds**. Također, sintetiziran je i analog spomenute baze s još snažnijom fluorescencijom, 7-(2,2'-biti-5-il)-imidazo[4,5-b]piridin (**Dss**), vezanjem dodatne tienilne

skupine na bazu **Ds**. Slično kao i **Ds**, **Dss** je zadržao istovjetnu komplementarnost prema analognim pirolnim bazama **Pa**, **Pn** i **Px**, a ti **Dss-Pa**, **Dss-Pn** i **Dss-Px** parovi također su funkcionirali kao treći neprirodni bazni par u replikaciji i transkripciji. Ustanovljeno je da i baze **Pn** i **Px** imaju svojstvo fluorescencije.

Ds-Px sustav pružit će kao korisan alat za širok raspon tehnologija na bazi molekula DNA i RNA, kao što je senzibilizacija za imuno-PCR analize, steganografiju DNA, DNA na osnovi nanomaterijala te metode selekcije i evolucije *in vitro*.

2.5. Istraživanje razreda baza d**5SICS**-d**MMO2**

*2.5.1. Par d**5SICS**-d**MMO2** i uspješnost analoga baze d**MMO2***

Nakon uspješnih postignuća u PCR umnožavanju opisanih neprirodnih para baza povezanih vodikovim vezama i parova baza s hidrofobnom pakiranjem do učinkovitosti prirodnih parova, istraživanja se ipak nastavljaju. 2009. godine Romesbergova skupina znanstvenika objavila je studije o novosintetiziranim hidrofobnim bazama, o paru **5SICS-MMO2** (slika 25) i **5SICS-NaM** (slika 26). Studije su započele rekonstrukcijom već postojećeg para **PICS-PICS** (slika 19) iz 1999.godine, te su njegovim optimiziranjem i poboljšanjem komplementarnosti oblika dobivene nove baze.[2]



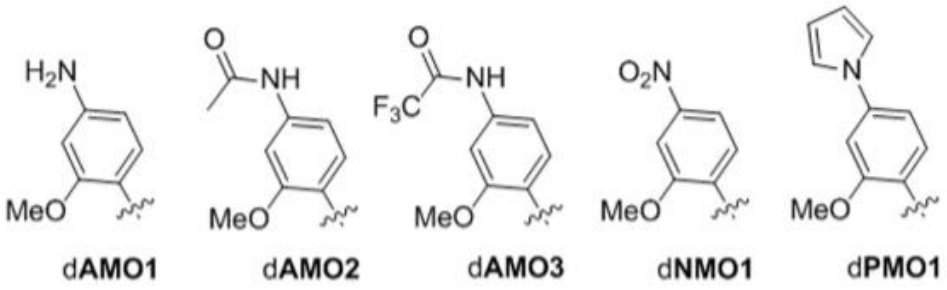
Slika 25. Prikaz strukturne formule para d**5SICS**-d**MMO2**[7]



Slika 26. Prikaz strukturne formule para d**5SICS**-d**NaM**[7]

Provedene studije replikacije s Klenowljevim fragmentom i T7-RNA-transkripcije pokazale su da par **5SICS-NaM** ima bolju učinkovitost u replikaciji i transkripciji od **5SICS-MMO2.** Međutim, struktura d**MMO2** je jednostavnija i ekonomičnija od strukture d**NaM**, što omogućava bazi d**MMO2** veći broj interakcija s potrebnim ostatcima za vezanja na specifična mjesta u DNA molekuli.[9] Analizom pomoću SAR tehnike, otkriveno je da je *orto*-metoksi skupina d**MMO2** od velike važnosti za replikaciju jer olakšava ugradnju, a kisikov atom skupine olakšava produljenje početnice kada neprirodni nukleotid bude ugrađen. Daljnjim ispitivanjima otkrivena je veća važnost *para*- položaja u odnosu na dosadašnji istraženi *meta*-položaj. No, ograničavajući korak u repliciranju je ugradnja d**MMO2**TP nasuprot d**5SICS**. Da bi se uklonio taj problem potrebno je modificirati strukturu d**MMO2**TP.

Tom idejom dizajnirane su modificirane neprirodne baze početne d**DMO**, a to su d**AMO1**, d**AMO2**, d**AMO3**, d**NMO1** i d**PMO1** (slika 27) koje imaju različite supstituente u glavnom utoru koji se stvara prilikom replikacije.



Slika 27. Prikaz stukturnih formula analoga baze d**MMO2**[6]

Svaki supstituent povezan je jednostrukom vezom na *para*- položaju jer je utvrđeno da je rotacijska fleksibilnost vrlo važna za efikasnu ugradnju baze optimizacijom interakcije d**5SICS** sa polimerazom. Najjednostavniji analog je d**AMO1**, koji ima amino skupinu na *para*- položaju, dok je u d**AMO2** i d**AMO3** amino skupina modificirana s acetilnim i trifluoroacetilnim skupinama koje povećavaju veličinu baze i smanjuju sposobnost skupine da donira elektronsku gustoću u aromatski prsten suprotnoj bazi.[6] Nitro skupina d**NMO1** je odličan akceptor elektrona. Međutim, kod baze d**PMO1** dušikov atom u pirolu trebao bi imati manji elektronski afinitet, ali usprkos tome značajno povećava strukturu aromatskim prstenom.

Kako bi se ispitala učinkovitost sintetiziranih analoga, svaki nukleozid-trifosfat analiziran je ugradnjom nasuprot srodnom i nesrodnom nukleotidu u DNA kalupu koristeći Klenowljev

fragment i *Taq*-DNA-polimerazu (termofilna polimeraza). Svaki je analog ispitan kao partner za bazu d**5SICS** (tablica 1 i tablica 2).

Tablica 1. Prikaz podataka dobivenih mjerenjem kinetičkih parametara prilikom ugradnje nukleozid-trifosfata pomoću KF suprotno d**5SICS** i d**NaM** u navedenim DNA kalupima (oznake: [a]ispod granice detekcije) [6]

5′–d(TAATACGACTCACTATAGGGAGA)
3′–d(ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTXGCTAGGTTACGGCAGGATCGC)

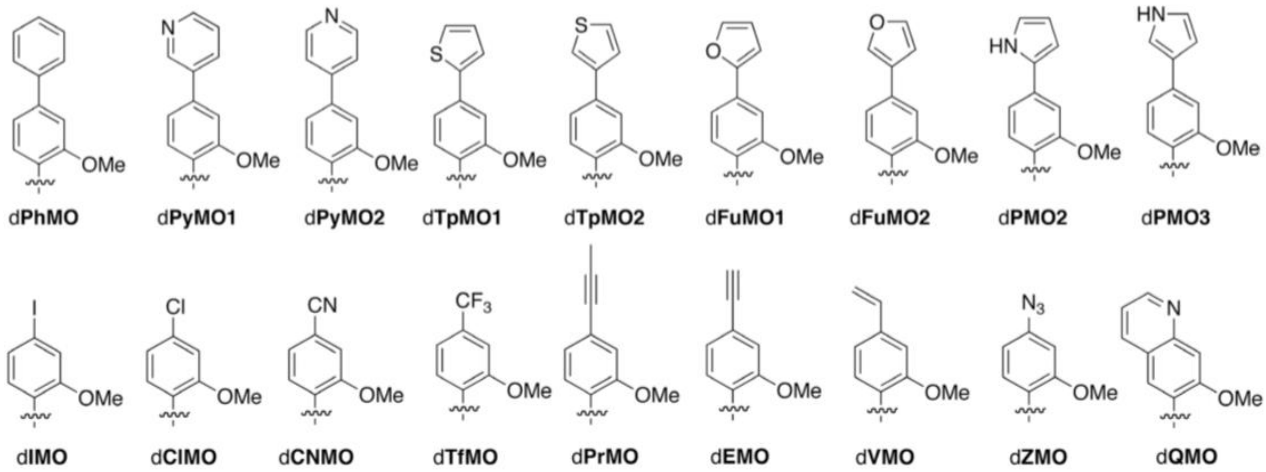
X	Y	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\times 10^5$ $M^{-1}min^{-1}$)
T	A	4.1 ± 0.3	0.0053 ± 0.0004	7700
5SICS	**NaM**	14.6 ± 0.8	0.25 ± 0.04	580
	DMO	27.0 ± 1.5	12.2 ± 1.5	22
	MMO2	13.7 ± 2.0	35.8 ± 0.6	3.8
	NMO1	50.1 ± 8.8	22.0 ± 3.5	23
	PMO1	41.7 ± 6.7	20.7 ± 2.6	20
	AMO1	15.3 ± 3.5	178 ± 62	0.86
	AMO3	13.4 ± 2.8	117 ± 30	1.1
	AMO2	7.0 ± 1.0	464 ± 100	0.15
	5SICS	12.6 ± 0.7	44.2 ± 11.7	2.9
	A	2.1 ± 0.3	52.4 ± 7.2	0.40
	G	11.7 ± 1.3	75.5 ± 3.7	1.5
	C	n.d.[a]	n.d.[a]	< 0.01
	T	2.1 ±0.4	230 ± 11	0.091
NaM	**5SICS**	8.3 ± 1.1	0.039 ± 0.004	2100
	NaM	51.5 ± 3.4	5.4 ± 0.3	95
	A	24.7 ± 4.7	14.0 ± 0.8	18
	G	n.d.[a]	n.d.[a]	< 0.01
	C	n.d.[a]	n.d.[a]	< 0.01
	T	1.6 ± 0.2	129 ± 15	0.12

Tablica 2. Prikaz podataka dobivenih mjerenjem kinetičkim parametara prilikom ugradnje nukleozid-trifosfata pomoću *Taq*-DNA-polimeraze suprotno d**5SICS** i d**NaM** u navedenim DNA kalupima (oznake: [a]ispod granice detekcije) [6]

5′–d(TAATACGACTCACTATAGGGAGA) 3′–d(ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTXGCTAGGTTACGGCAGGATCGC)				
X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (× 10^5 M^{-1}min^{-1})
T	A	2.6 ± 0.2	0.032 ± 0.002	820
5SICS	**NaM**	2.7 ± 0.4	0.35 ± 0.04	76
	DMO	3.3 ± 1.7	21.0 ± 0.5	1.6
	MMO2	3.4 ± 0.3	35.0 ± 6.0	0.97
	NMO1	5.5 ± 0.2	12.8 ± 3.4	4.3
	PMO1	3.6 ± 1.4	113 ± 25	0.32
	AMO1	0.83 ± 0.13	170 ± 31	0.049
	AMO3	0.35 ± 0.06	214 ± 28	0.016
	AMO2	0.45± 0.06	370 ± 36	0.012
	5SICS	3.4 ± 0.5	189 ± 16	0.18
	A	0.5 ± 0.05	147 ± 7	0.035
	G	4.5 ± 0.1	216 ± 42	0.21
	C	n.d.[a]	n.d.[a]	< 0.01
	T	0.8 ± 0.1	303 ± 19	0.026
NaM	**5SICS**	2.4 ± 0.6	0.34 ± 0.03	71
	NaM	7.9± 1.4	151± 9	0.52
	A	4.0 ± 0.8	84.0 ± 4.0	0.48
	G	n.d.[a]	n.d.[a]	< 0.01
	C	n.d.[a]	n.d.[a]	< 0.01
	T	1.0 ± 0.2	421± 71	0.024

Iz prikaza podataka tablice 1 i tablice 2 vidljivo je da su od svih analiziranih analoga baze d**MMO2**, najperspektivniji d**PMO1**TP i d**NMO1**TP.[6]

Osim spomenutih analoga, sintetiziran je i cijeli niz drugih *para*- derivatiziranih d**MMO2** analoga (slika 28), koji u kombinaciji s prethodno navedenim analozima, daju prilično cjelovit pregled steričkih i elektrostatskih efekata. Uz d**PMOl**, bis-aromatski analozi d**PhMO**, dP**yMOl**, d**PyMO2**, d**TpMOl**, d**TpMO2**, d**FuMOl**, d**FuMO2**, d**PMO2** i d**PMO3** dizajnirani su za istraživanje učinkovitosti prstenastih skupina, a derivati d**IMO** i d**ClMO** su dizajnirani su za elektrostatski utjecaj. Također i analozi, d**PrMO**, d**EMO**, d**VMO**, d**CNMO**, d**ZMO**, d**QMO** i d**TfMO**, osmišljeni su da pomognu u istraživanju doprinosa steričkih smetnji i elektrostatskih interakcija.[9]



Slika 28. Prikaz strukturnih formula *para*- derivatiziranih d**MMO2** analoga[9]

2.5.2. PCR umnožavanja i analiza

Ispitivanja PCR umnožavanja koja uključuju i sintezu i produljenje lanca u oba smjera prvo je istraženo *Taq*-DNA-polimerazom u slučajnim DNA kalupima koji sadrže d**5SICS** sparen nasuprot d**NaM**, d**MMO2**, d**DMO**, d**NMO1** ili d**PMO1**. Iako umnožavanje pomoću *Taq*-DNA-polimeraze nije najvjernije, sekvenciranje umnoženih odsječaka molekula DNA jasno pokazuje da se par d**5SICS**-d**NaM** najbolje replicira, dok je među ostalim analozima, d**NMO1** optimiziran za sparivanje sa nasuprotnim d**5SICS**, praćeno s d**DMO**, d**MMO2**, i d**PMO1**. Za potvrdu dobivenih rezultata, umnožavanje istih neprirodnih parova baza postavljenih unutar kalupa dvolančane DNA provedeno je praktičnijom metodom pomoću Deep Vent-DNA-polimeraze s egzonukleazom aktivnošću.[10] Rezultati su bili očekivani te je vjernost sparivanja bila jednaka. U skladu s dosadašnjim rezultatima, d**NaM**-d**5SICS** se replicirao s nevjerojatnom vjernošću od 99,7%. Zanimljivo je da su d**NMO1**-d**5SICS**, d**DMO**-d**5SICS** i d**MMO2**-d5**SICS** također umnoženi sličnom vjernošću, dok d**PMO1**-d**5SICS** bio je umnožen sa značajno nižom vjernosti.[6]

Također, provedena PCR umnožavanja drugih laboratorija, od kojih je jedan od početnih eksperimenta sadržavao 100 pb u DNA kalupa, koji sadrži neprirodan par baza na svakoj strani kalupa s tri slučajna prirodna nukleotida, 100 μM neprirodnog-trifosfata i 200 μM svakog prirodnog dNTP, te ciklusom umnožavanja u trajanju od 60 s i *OneTaq*-DNA-polimerazom, koja je komercijalno dostupna smjesa dviju srodnih DNA-polimeraza, *Taq*-DNA-polimeraze i DeepVent-DNA-polimeraze sa egzonukleazom aktivnošću (tablica 3).[9] Kako bi se olakšalo prvo sekvenciranje dobivenog slijeda, DNA je umnožena samo 14 puta, čime se spriječila potreba za razrijeđenjem tijekom umnožavanja. Pod tim uvjetima, DNA

koja sadrži d**MMO2**-d**5SICS** ili d**5SICS**-d**NaM** umnožena je oko 600 puta (2,5 puta manje od analogne DNA koja sadrži prirodni dA-dT bazni par na istom položaju) sa vjernošću od 97,5% i 99,9%.[9] DNA koja sadrži d**5SICS** sparenu suprotno s jednim od deset derivata d**PhMO**-d**PMO3** je umnožena skromnom učinkovitosti. DNA koji sadrži d**5SICS** sparenu s bilo kojim preostalim analozima, osim d**MIMO**, d**MEMO** i d**FDMO**, umnožena je između 500 i 800 puta, ali s promjenjivom vjernosti. Vjernost DNA koja sadrži d**PMO1** je vrlo niska, dok je s d**MIMO**, d**MEMO**, d**QMO**, d**5FM**, d**DMO**, d**CNMO** ili d**PrMO** bolja, ali još uvijek manja od d**MMO2**. DNA koja sadrži d**TfMO** ili d**NMOl**, ili **dFDMO** je umnožena sličnom vjernosti kao i DNA koja sadrži d**MMO2**, dok je DNA s d**VMO**, d**EMO**, d**FEMO**, d**FIMO**, d**ClMO** ili d**ZMO** umnožena s većom vjernosti od one koja sadrži d**MMO2**. Umnoženi DNA sljedovi koji sadrže d**5SICS**-d**IMO** imaju povećanu vjernost približavajući se sljedovima DNA koja sadrži d**5SICS**-d**NaM**.[9]

Tablica 3. Prikaz učinkovitosti PCR umnožavanja analoga d**MMO2**[9]

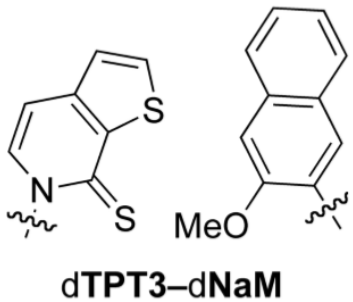
PCR amplification and fidelity with OneTaq DNA polymerase.

dMMO2 analog	Amplification	Fidelity
dPhMO	3.1×10^2	< 90
dPyMO1	2.6×10^2	< 90
dPyMO2	2.2×10^2	< 90
dTpMO1	0.4×10^2	< 90
dTpMO2	0.8×10^2	< 90
dFuMO1	3.3×10^2	< 90
dFuMO2	1.8×10^2	< 90
dPMO2	3.0×10^2	< 90
dPrMO	6.0×10^2	97.0 ± 0.3
dEMO	7.1×10^2	98.48 ± 0.04
dNMO1	5.3×10^2	97.41 ± 0.17
dPMO1	5.0×10^2	91.57 ± 0.12
dIMO	6.0×10^2	99.23 ± 0.05
dClMO	6.3×10^2	98.9 ± 0.3
dCNMO	6.8×10^2	96.89 ± 0.08
dTfMO	4.6×10^2	97.2 ± 0.2
dVMO	5.6×10^2	98.2 ± 0.2
dZMO	5.4×10^2	98.99 ± 0.07
dQMO	5.0×10^2	95.7 ± 0.3
dFIMO	6.3×10^2	98.7 ± 0.2
dMIMO	3.2×10^2	94.3 ± 0.4
dFEMO	7.5×10^2	98.6 ± 0.4
dMEMO	3.7×10^2	95.0 ± 0.8
dFDMO	4.7×10^2	97.6 ± 0.3
dNaM	5.4×10^2	99.85 ± 0.13
dMMO2	6.2×10^2	97.49 ± 0.01
dDMO	7.9×10^2	96.6 ± 0.3
d5FM	6.4×10^2	96.3 ± 0.5

2.5.3. Budućnost

Identifikacija neprirodnog para d**MMO2**-d**5SICS** bila je orijentir za razvitak osnovnog neprirodnog para, a rani napori bili su usmjereni na optimizaciju i analiziranje veće uspješnosti para d**DMO**-d**5SICS** ili d**NaM**-d**5SICS**. Dok je d**DMO**-d**5SICS** repliciran malo bolje od d**MMO2**-d**5SICS**, replikacija d**NaM**-d**5SICS** je znatno učinkovitija, iako je to jedinstveno samo za Klenowljev fragment.[6] Najbolja selektivnost para d**5SICS**-d**NaM** ispitana do sada dostigla je 99,8% po replikaciji u PCR-u. Nadalje, podaci dobiveni s pet novih ispitivanih analoga pokazuju da optimiziranje hidrofobnosti, uključujući smanjenje "troškova" desolvatacije i poboljšanje hidrofobnog pakiranja, u glavnom utoru DNA molekule koji se razvije tijekom sparivanja, predstavljaju najučinkovitiji "put" optimizacije strukture d**MMO2**.

Razmatrajući sve sintetizirane neprirodne parove baza do sada, i koncept na kojem su one razvijene, a to je na temelju svojstava prirodnih parova te modifikacijom istih, zadržavajući strukturnu homologiju samo promjenom funkcionalnih skupina, dovodi se u pitanje ispravnost sparenih baza. Tako se postavlja pitanje da li je sinteza baze d**NaM** za par d**NaM**-d**5SICS** najbolji "put" koji se mogao odabrati s obzirom na studije optimizacije d**MMO2**-d**5SICS** u kojima se jednostavnost strukture same baze d**MMO2** predstavlja kao moćan faktor za modificiranje. Vodeći se tom idejom, istraživanje se nastavilo u smjeru dizajniranja novog nukleotida komplementarnog nukleotidu d**NaM**, pri čemu je sintetiziran d**TPT3**. Neočekivano, par d**TPT3**-d**NaM** (slika 29) pokazao se jednako uspješnim kao i par d**MMO2**-d**5SICS** i d**NaM**-d**5SICS.**



dTPT3–dNaM

Slika 29. Prikaz strukturne formule para d**TPT3**-d**NaM**[7]

2.6. Zaključak i budućnost istraživanja neprirodnih parova baza

Ovaj rad pregled je mnogih znanstvenih članaka čiji su napori usmjereni u proučavanje osnovih principa rada DNA-polimeraza. Kada govorimo o reakcijama polimeraza mislimo na

jedan od koraka u čitavom procesu replikacije, usavršenom mehanizmu rada u kojem sudjeluju enzimi s impresivnom točnošću i preciznošću, koji su se usavršavali milijunima godina evolucije. Razvijanjem metoda analiza koje su omogućile uvid u taj specifičan svijet reda veličine nanometara i mnoge godine istraživanja rezultirale su saznanjima do najsitnih detalja o čitavom procesu replikacije, transkripcije i translacije. Upravo ta savršenost u regulaciji cijelog procesa od slijeda nukleotida u DNA molekuli pa sve do ekspresije proteina određene funkcije dala je mnogim znanstvenicima ideju za razvijanje neprirodnih nukleotida koji bi bili sličnih karakteristika kao i prirodni, a njihova ugradnja u DNA rezultirala bi novim poboljšanim funkcijama. Niz godina pionirskih pothvata za nalaženje odgovora na pitanje da li je biofizička značajka najvažnija za učinkovitu i točnu polimerizaciju DNA, omogućile su sagledavanje tog problema iz više kuteva. Tako, Bennerov rad ilustrira kako se polimeraze ponašaju kada se funkcionalne skupine za vezanje vodika permutiraju kako bi oblikovale različite kombinacije parova, pa sve do Koolove i Romesbergove studije o mogućnostima polimerizacije u odsutnosti vodikovih veza koje su izazvale mnoge kontradikcije. Njihovi rezultati kolektivno naglašavaju doprinos komplementarnosti oblika i moć desolvatacije tijekom reakcije polimerizacije. Osim toga, njihov rad pokazuje da učinkovitost polimerizacije i vjernost nisu identični pojmovi. Iako dosta istražen proces replikacije nudi dosta odgovora na pitanja, jedinstven model mehanizma se još istražuje. Jedinstvenost modela zapravo je kombinacija mnoštva različitih, upravo iz razloga što je svaki model nepotpun, jer svaka od postojećih metoda upotrijebljenih za proučavanje sinteze DNA pati od ograničenja koja su svojstvena njezinom dizajnu. Ta ograničenja su uzrokovana specifičnom prirodom prirodnih nukleotida koji djeluju kao supstrati za DNA-polimeraze. Kao što je ranije opisano, svaka prirodna baza posjeduje niz različitih biofizičkih svojstava uključujući potencijal vezanja vodika, π-elektronsku gustoću, hidrofobnost i jedinstvenost oblika i veličine.[3] Gledajući svaki od tih čimbenika, malo je vjerojatno da je samo jedan parametar isključivo odgovoran za visoku katalitičku učinkovitost povezanu s njihovim doprinosom, već svaki od njih doprinosi pojedinom koraku tijekom polimerizacije. Drugi se problem odražava na raznolikost DNA-polimeraza koje izvode različite stanične funkcije. Svaka polimeraza mora imati visoku vjernost kako bi za kromosomsku replikaciju upotrijebila nukleotid komplementarnog oblika, odgovarajuće energije desolvatacije i prikladnih π-elektronskih interakcija, kako bi se razlikovao srodan od nesrodnog nukleotida i kako bi se održala vjerodostojnost repliciranja.

Iako su neprirodni nukleotidi vrijedni alati za razumijevanje mehanizma replikacije DNA molekule, njihova primjena još uvijek nije u potpunosti realizirana. Ključ razvitka neprirodnih parova baza pokušaj je proširivanja genetskog koda uvođenjem trećeg neprirodnog para pri čemu bi se pružila mogućnost pohrane dodatnih informacija u molekuli DNA, a time i sinteza novih proteina koji mogu sadržavati niz neprirodnih aminokiselina.

Konačno, uspješnost parova d**MMO2**-d**5SICS**, zatim d**NaM**-d**5SICS** i d**TPT3**-d**NaM** dala je nove nade za istraživanja *in vitro* i *in vivo*. Postoji mnogo područja u biokemiji, molekularnoj biologiji i sintetskoj kemiji u kojima bi upravo ti neprirodni parovi pronašli svoju praktičnu upotrebu.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
2. I. Hirao, M. Kimoto, *Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma*, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **88**(**7**) (2012) 345-367
3. I. Lee, A. J. Berdis, *Non-natural nucleotides as probes for the mechanism and fidelity of DNA polymerases*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1804** (2010) 1064-1080
4. M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *An unnatural base pair system for efficient PCR amplification and functionalization of DNA molecules*, *Nucleic Acids Res.* **37**(**2**) (2009) e14
5. R. Yamashige, M. Kimoto, Y. Takezawa, A. Sato, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Highly specific unnatural base pair systems as a third base pair for PCR amplification*, *Nucleic Acids Res.* **40**(**6**) (2012) 2793-2806
6. T. Lavergne, D. A. Malyshev, F. E. Romesberg, *Major groove substituents and polymerase recognition of a class od predominantly hydrophobic unnatural base pairs*, *Chemistry* **18**(**4**) (2012) 1231-1239
7. K. Dhami, D. A. Malyshev, P. Ordoukhanian, T. Kubelka, M. Hocek, F. E. Romesberg, *Systematic exploration of a class of hydrophobic unnatural base pairs yields multiple new candidates for the expansion of genetic alphabet, Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 10235-10244
8. D. A. Malyshev, K. Dhami, H. T. Quach, T. Lavergne, P. Ordoukhanian, A. Torkamani, F. E. Romesberg, *Efficient and sequence-independent replication of DNA containing a third base pair establishes a functional six-letter genetic alphabet, PNAS* **109** (2012) 12005-12010
9. T. Lavergne, M. Degardin, D. A. Malyshev, H. T. Quach, K. Dhami, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *Expanding the scope of replicable unnatural DNA: Stepwise optimization of a predominantly hydrophobic base pair, I Am Chem Soc.* **135**(**14**) (2013) 5408-5419

10. Y. J. Seo, D. A. Malyshev, T. Lavergne, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *Site-specific labeling of DNA and RNA using an efficiently replicated and transcribed class of unnatural base pairs*, *I Am Chem Soc*. **133**(**49**) (2011) 19878-19888
11. https://de.wikipedia.org/wiki/Purine
12. https://de.wikipedia.org/wiki/Pyrimidine
13. https://bs.m.wikipedia.org/wiki/Datoteka:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png
14. https://en.wikipedia.org/wiki/Structure%E2%80%93activity_relationship
15. https://en.wikipedia.org/wiki/Thin-layer_chromatography
16. https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleotide
17. http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/26-structure-of-dna-and-rna/dna-structure.html
18. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction