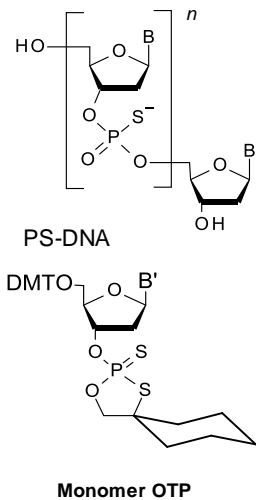


W wielu ośrodkach prowadzone są badania nad hamowaniem ekspresji genów białek chorobotwórczych i zwalczaniem chorób wywoływanych przez retrowirusy. Metoda antygenowa ma za cel wyłączenie ekspresji danego genu przez zablokowanie procesu jego transkrypcji. Natomiast metody antysensowa, rybozymowa, czy też metoda oparta o zjawisko interferencji RNA, mają za cel selektywne zniszczenie cząsteczek mRNA lub zablokowanie odwrotnej transkrypcji wirusowego RNA. W obu podejściach konieczne jest sekwencyjnie specyficzne rozpoznawanie kilkunastonukleotydowych fragmentów określonego celu DNA lub RNA, a następnie albo utworzenie w ich obrębie trwałych kompleksów, niedostępnych dla enzymów uczestniczących w kolejnych etapach, albo wywołanie procesu ich degradacji, np. z wykorzystaniem RNazy H hydrolizującej nić RNA w heteroduplexach DNA/RNA. Sonda oligonukleotydowa powinna być odporna na działanie nukleaz, dlatego praktycznie wyłącznie stosuje się modyfikowane analogi DNA, których ważnymi przedstawicielami są tiofosforanowe oligonukleotydy DNA (PS-DNA). Istotną cechą PS-DNA jest obecność centrów stereogenicznych na atomach fosforu, z czego wynika występowanie setek lub tysięcy P-diastereomerycznych form danego oligomeru. Synteza P-stereoźdefiniowanych PS-oligonukleotydów stała się możliwa dzięki opracowanej w naszym Zakładzie tzw. oksatiafosfolanowej metodzie syntezy PS-DNA wykorzystującej monomery OTP.

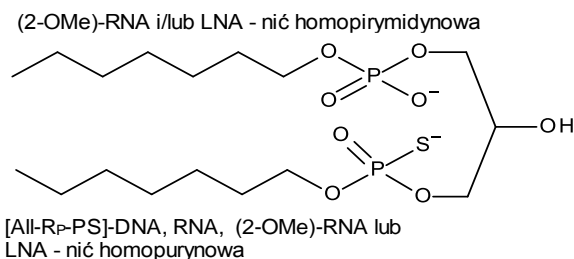
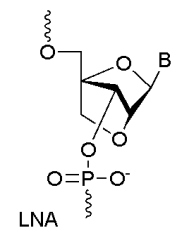


Chociaż zwykle kompleksy PS-DNA z matrycami DNA lub RNA są mniej trwałe niż analogiczne kompleksy zawierające naturalne DNA, to jednak nasz zespół odkrył wyjątki od tej reguły. Wykazaliśmy bowiem, że homopurynowe PS-DNA o konfiguracji  $R_p$  wszystkich atomów fosforu wiązań internukleotydowych ([All- $R_p$ -PS]-DNA) tworzą z oligonukleotydami RNA **równoległe trypleksy I**.

RNA (H)	5'-r(CUCCUUUUUCUC)-3'	<i>oligomer Hoogsteena</i>
[All- $R_p$ -PS]	5'-d(GAGGAAAAAGAG)-3'	<i>centralne PS-DNA</i>
RNA (WC)	3'-r(CUCCUUUUUCUC)-5'	<i>oligomer Watsona-Cricka</i>

**I**

Wykazaliśmy też, że wprowadzone do oligomeru Hoogsteena jednostki (2'-OMe)-RNA lub LNA, mające bardzo silnie zaznaczoną konformację A, zwiększają trwałość trypleksu i znacząco spowalniają proces odwrotnej transkrypcji mRNA→DNA. Jednak w dalszym ciągu zahamowanie odwrotnej transkrypcji tylko nieznacznie przekraczało 90% i usunięcie tej niedoskonałości jest celem naukowym projektu. Podejście, które chcemy zastosować wywodzi się z faktu, że trwałość termodynamiczna typowych trypleksów równoległych wzrasta znacząco, gdy nici Hoogsteena i centralna są połączone ze sobą, bo wtedy czynnik entropowy korzystnie wpływa na siłę asocjacji. Planujemy zatem syntezę dwuniciowych „widlastych” sond molekularnych. W tych sondach „górny” homopirymidynowy oligonukleotyd będzie kombinacją jednostek (2'-OMe)-RNA i LNA, natomiast „dolnym” będzie homopurynowy oligonukleotyd typu [All- $R_p$ -PS]-DNA zawierający jednostki LNA i/lub (2'-OMe)-RNA, przy czym metoda otrzymywania tych ostatnich będzie dopiero opracowana w ramach projektu. Zakładamy, że nukleozydy LNA lub (2'-OMe)-RNA w istotny sposób narzucą swoją konformację A na sąsiednie nukleozydy DNA, przez co cały oligomer będzie miał konformację znacznie przesuniętą w kierunku A. Zatem podczas



Rysunek 2.

asocjacji koszt energetyczny przejścia konformacyjnego nici tiofosforanowej będzie zmniejszony i oddziaływania stabilizujące część „równoległą” kompleksu będą silniejsze, przez co i wiązanie nici Watsona-Cricka powinno stać się efektywniejsze.

Projekt powinien zaowocować otrzymaniem sond oligonukleotydowych zdolnych do sekwencyjnie specyficznego rozpoznawania, trwałego wiązania i wyłączenia cząsteczek RNA, a być może również DNA, z dalszego udziału w szlakach metabolicznych. Byłoby to istotne uzupełnienie zestawu dostępnych narzędzi do prac w obszarze biologii molekularnej, z możliwością (w odległej perspektywie) zastosowania w szerszej rozumianej biologii.