

Jolanta Brzezińska

Rozprawa doktorska

**Poliaminooligonukleotydy oraz ich
nienukleozydowe analogii.
Synteza, struktura i badanie właściwości**

przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
celem uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Promotor: **Prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz**

Poznań 2009

Dziękuję promotorowi, prof. Wojciechowi T. Markiewiczowi za ciekawy pomysł prowadzenia badań oraz życzliwość i wsparcie w trakcie jego realizacji,

a także doc. Zofii Gdaniec, dzięki której uprzejmości i pomocy powstała część pracy dotycząca badań strukturalnych

dr Łukaszowi Popenzie

oraz wszystkim współpracownikom z Pracowni Chemii
Biokoniugatów

SPIS TREŚCI

Skróty stosowane w pracy	i
1. WSTĘP I CELE PRACY	1
2. WSTĘP TEORETYCZNY	3
2.1. Poliaminy	3
2.2. Modyfikacje chemiczne DNA za pomocą poliamin	7
2.2.1. Modyfikacje w części zasadowej nukleozydu	9
2.2.2. Modyfikacja w części cukrowej nukleozydu	10
2.2.3. Modyfikacje wiązania fosfodiestrowego	12
2.3. Nienukleozydowe analogi kwasów nukleinowych	13
2.3.1. Właściwości interkalacyjne analogów	14
2.3.2. Sztuczna rybonukleaza	17
2.3.3. Fotoprzełączniki	19
2.3.4. Nienukleozydowe analogi jako sondy i nośniki grup funkcyjnych	20
2.4 Sposoby oddziaływań poliamin w kompleksach z kwasami nukleinowymi	23
2.4.1 Badania krystalograficzne	23
2.4.2 Spektroskopia rezonansu jądrowego	26
2.4.3 Modelowanie molekularne	28
2.4.4 Spektroskopia Ramana	30
2.5 Oddziaływania poliamin kowalencyjnie związanych z kwasami nukleinowymi	34
3. BADANIA WŁASNE	37
3.1 Miejsce modyfikacji poliaminowej a trwałość struktury dupleksu DNA – analiza termodynamiczna	38
3.2. Ustalenie struktury dupleksu zawierającego modyfikację resztą dC ^{Sp} oraz dupleksu referencyjnego	43
3.2.1. Przypisanie sygnałów rezonansowych w widmach NMR dla dupleksu referencyjnego i modyfikowanego resztą dC ^{Sp}	44
3.2.2. Porównanie przesunięć chemicznych $\Delta\delta$ (¹ H) i $\Delta\delta$ (³¹ P) dupleksu referencyjnego i zawierającego resztę dC ^{Sp}	59
3.2.3. Analiza konformacyjna. Więzy strukturalne	62
3.2.4. Restryktywna dynamika molekularna	66
3.2.5. Analiza struktury dupleksu zawierającego resztę dC ^{Sp} ; Porównanie ze strukturą dupleksu referencyjnego	69
3.3. Synteza amidofosforynów analogów poliaminodeoksyrybonukleozydów	73

3.3.1. Projektowanie łączników	74
3.3.2. Synteza poliaminowych pochodnych kwasu 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowego (Bis-MPA)	76
3.3.3. Synteza poliaminowych pochodnych kwasu α,β -izopropylideno-D-glicerynowego i α,β -izopropylideno-L-glicerynowego	87
3.3.4. Synteza poliaminowej pochodnej α -hydroksy- γ -butyrolaktonu	89
3.3.5. Ochrona funkcji aminowych reszt poliaminowych	91
3.3.6. Reakcje dimetoksytrytylowania	93
3.3.7. Reakcje fosfitylacji	94
3.4. Synteza chemiczna analogów poliaminooligonukleotydów	95
3.5. Wpływ analogu poliaminonukleozydu na trwałość struktury drugorzędowej DNA	96
4. PODSUMOWANIE	100
5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	105
5.1. Odczynniki chemiczne	105
5.2. Aparatura	107
5.3. Techniki ogólne	108
5.4. Synteza pochodnych kwasu 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowego	109
5.5. Synteza pochodnych kwasów α,β -izopropylideno-D(L)-glicerynowych	116
5.6. Synteza poliaminowej pochodnej α -hydroksy- γ -butyrolaktonu	117
5.7. Trytylowanie pochodnych sperminy	119
5.8. Synteza amidofosforynów analogów poliaminonukleozydów	121
5.9. Synteza i oczyszczanie poliaminooligonukleotydów i analogów poliaminooligonukleotydów	122
5.10. Przygotowanie próbek oktameru referencyjnego (5'-CAGCCGAC-3', 5'-GTCGGCTG-3') oraz oktameru modyfikowanego resztą dC ^{Sp} (badania NMR)	124
5.11. Pomiary termodynamiczne	125
6. LITERATURA	128

Skróty stosowane w pracy

A, C, G, T - używane skróty oznaczające deoksynukleotydy w badaniach NMR
Ac₂O – bezwodnik kwasu octowego
Bis-MPA – kwas 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowy
CDI – karbonylodiimidazol
CDMT – 2-chloro-4,6-dimetoksy- 1,3,5-triazyna
COSY – ang. *CO*rrelation *Sp*ectroscopY
δ - przesunięcie chemiczne
ΔG – zmiana energii swobodnej
ΔH – zmiana entalpii swobodnej
ΔS – zmiana entropii
dC^{Sp} – 2'-deoksycytydina modyfikowana resztą sperminy
DDD – dodekamer Drew'a Dickersona
DMAP – dimetyloaminopirydyna
DMF – dimetyloformamid
DMTCI – chlorek dimetoksytrytylu
DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
DPCP – dichlorofosforan difenylu
ESI – ang. *Electrospray Ionisation*
FAdA – amidofosforan deoksyadenozyny
FAdC – amidofosforan deoksycytydyny
FAdG – amidofosforan deoksyguanozyny
FAdT – amidofosforan deoksytymidyny
FTIR – ang. *fourier transform infrared spectroscopy*
HPLC – ang. *High Pressure Liquid Chromatography*
HSQC – ang. *Heteronuclear single quantum correlation*
INA – interkalujący kwas nukleinowy
IPN – ang. *intercalating pseudo-nucleotide*
i-Pr – grupa izopropylowa
IR – spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni
MALDI-TOF – ang. *Matrix Assited Laser Desorption/Ionisation Mass Spectroscopy*
MNU – N-metylo-N-nitrozomocznik
MS – spektroskopia masowa
NDI – diimidnaftalenu
NMR – ang. *nuclear magnetic resonance*
NMI – N-metyloimidazol
NMM – N-metylomorfolina
NOESY – ang. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
ODC – dekarboksylaza ornitynowa
PA - poliamina
pH – ilościowa skala kwasowości i zasadowości roztworów wodnych związków chemicznych.
ppm – ang. *part per milion*
Py – pirydyna
Put⁺² – jon putrescyny
RNA – kwas rybonukleinowy
Spd⁺³ – jon spermidyny
Spm⁺⁴ – jon sperminy
ssDNA – ang. *single stranded DNA*
ssRNA – ang. *single stranded RNA*
TBDMS – grupa tert- butylodimetylosililowa
TCA – kwas trichlorooctowy
TFAA – kwas trifluorooctowy
THF – tetrahydrofuran
TLC – ang. *thin liquid chromatography*
TMS – grupa trimetylosililowa
T_m – temperatura topnienia dupleksów
TOCSY – ang. *TO*tal *CO*rrelation *Sp*ectroscopY
p-TSA – kwas para-toluenosulfonowy
Tsp – termospermina
UV – spektroskopia w nadfiolecie

1. WSTĘP I CELE PRACY

Poliaminy, putrescyna (Put), spermidyna (Spd) i spermina (Spm), to naturalnie występująca grupa związków wywierająca znaczący wpływ na wiele procesów biologicznych. Główną rolę odgrywają przede wszystkim w procesie wzrostu, namnażania i różnicowania się komórek. Biorą udział w regulacji transkrypcji i translacji, stabilizują membrany. Mogą działać jak wewnątrzkomórkowe cząsteczki informacyjne, czy grupy reporterowe. Stanowią ważne narzędzie w diagnostyce i monitoringu przebiegu chorób nowotworowych.

W związku z tym, że w komórkach poliaminy występują w postaci całkowicie sprotonowanej, wykazują wysokie powinowactwo do ujemnie naładowanych cząsteczek znajdujących się w komórkach, zwłaszcza w stosunku do DNA i RNA. Występowanie obdarzonych dodatnim ładunkiem grup aminowych oraz mobilność konformacyjna łańcucha poliaminy pozwala na elektrostatyczne oddziaływania ze szkieletem fosforanocukrowym kwasów nukleinowych. Szczególnie silnie wiąże się do DNA spermina, powodując tym samym jego stabilizację. Poliaminy wpływają również na zmiany konformacyjne w kwasach nukleinowych oraz pełnią względem nich rolę ochronną. Dzięki tak szerokiemu wachlarzowi funkcji są ciekawym substratem do tworzenia kowalencyjnych połączeń z kwasami nukleinowymi. Modyfikowane oligomery wykorzystywane są w wielu metodach wpływających na funkcje komórki, takich jak antysensowa, antygenowa, wykorzystująca aptamery, rybozomy czy siRNA.

Mimo że, funkcje biologiczne poliamin są od wielu lat przedmiotem badań, dokładny mechanizm ich działania w komórce nadal nie został w pełni poznany. Analogi kwasów nukleinowych zawierające kowalencyjnie związane reszty poliamin wydają się być interesującymi modelami, które mogą przybliżyć nas do zrozumienia natury oddziaływań poliamina – kwas nukleinowy.

W ciągu ostatnich lat wiele uwagi poświęcono poznaniu właściwości poliaminooligonukleotydów, powstałych w wyniku wprowadzenia łańcucha aminoalkilowego. Modyfikacje dotyczyły części zasadowej, części cukrowej (pozycje 1', 4' oraz grupy 2' i 5' hydroksylowe) oraz wiązania internukleotydowego. W wielu przypadkach został potwierdzony efekt stabilizacyjny dwu- i trójniciowych struktur kwasów nukleinowych powstających z udziałem poliaminooligonukleotydów.

Badania struktury kompleksów poliamin z DNA i RNA prowadzono z wykorzystaniem technik krystalograficznych i spektroskopowych (np. NMR). Szczególnie dużo uwagi poświęcono kompleksom z udziałem sperminy mając nadzieję na znalezienie ewentualnych specyficznych

oddziaływań elektrostatycznych czy wiązań wodorowych, Badania pokazały, że ze względu na wysoką mobilność konformacyjną i różnorodność miejsc oddziaływania trudne jest precyzyjne umiejscowienie poliamin w strukturze krystalograficznej. Również na podstawie eksperymentów NMR nie udało się dokładnie scharakteryzować oddziaływań sperminy z żadną z form DNA.

Koniugaty poliamin i oligonukleotydów, czyli poliaminooligonukleotydy były badane w jeszcze mniejszym zakresie. W Pracowni Chemii Biokoniugatów IChB PAN od szeregu lat prowadzone są badania poliaminooligonukleotydów.

Moje badania zmierzały do poznania struktury przestrzennej poliaminooligonukleotydów, oraz bliższego opisu natury oddziaływań poliamina-kwas nukleinowy poprzez syntezę analogów poliaminooligonukleotydów pozbawionych reszty cukrowej i zasady heterocyklicznej.

Realizowałam następujące cele:

- Analiza właściwości fizykochemicznych poliaminooligonukleotydów w celu usystematyzowania wiedzy na temat zależności efektu stabilizacyjnego od miejsca wprowadzenia jednostek poliaminowych, ich liczby oraz oddziaływań pomiędzy włączonymi resztami aminoalkilowymi.
- Analiza strukturalna z wykorzystaniem metody spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). W badaniach tych podjęłam próbę uzyskania odpowiedzi na pytanie o naturę i specyficzność oddziaływań kowalencyjnie związanej sperminy z jednostką nukleotydową wchodzącą w skład dupleksu DNA. Określenie czynników odpowiedzialnych za podwyższenie trwałości termodynamicznej dupleksów zawierających reszty 2'-deoksycydydiny modyfikowanej resztą sperminy (dC^{Sp}).
- Zaprojektowanie i otrzymanie nowej klasy związków, nienukleozydowych analogów poliaminonukleotydów pozbawionych reszty cukrowej i zasady nukleinowej. Poliaminowe pseudonukleotydy, wykazujące częściowe strukturalne podobieństwo do naturalnie występujących komponentów, nie powinny w sposób istotny zakłócać oddziaływań wodorowych i warstwowych w komplementarnych dupleksach DNA.

Moja praca doktorska miała na celu przybliżenie oraz próbę zrozumienia specyficznej natury oddziaływań: poliamina – kwas nukleinowy.

2. WSTĘP TEORETYCZNY

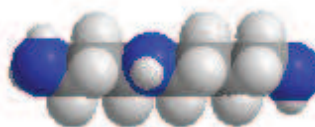
2.1. Poliaminy

Poliaminy (PA) należą do szerokiej grupy biologicznie aktywnych amin i wraz z biogennymi monoaminami (serotonina, histamina i tryptamina) pełnią istotne funkcje biologiczne¹.

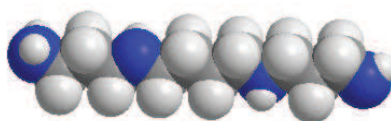
Badania nad PA datuje się na kilka wieków wstecz. W 1678 r. odkryto fosforan sperminy w formie krystalicznej². Pod koniec wieku XIX zidentyfikowano putrescynę^{3,4}, a na początku XX spermidynę². Putrescyna (Put), spermidyna (Spd) i spermina (Spm) są prostymi alifatycznymi poliaminami o niskiej masie cząsteczkowej wchodzącymi w skład wszystkich komórek zwierzęcych (rys. 1). Wszystkie komórki prokariotyczne i eukariotyczne syntezują putrescynę i spermidynę. Spermina jest syntezowana głównie w komórkach eukariotycznych.



putrescyna
1,4-diaminobutan



spermidyna
N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan



spermina
N,N-bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan

Rys.1. Struktura podstawowych poliamin biogennych.

Biosynteza poliamin zależy od aktywności dekarboksylazy ornitynowej (ODC), która katalizuje pierwszy, limitujący szybkość, etap reakcji syntezy. ODC dekarboksyluje ornitynę do putrescyny, a następnie w wyniku przeniesienia i przyłączenia łańcucha aminopropylowego do jednej lub obu grup aminowych putrescyny powstają spermidyna lub spermina. Poziom poliamin

regulowany jest za pomocą oksydazy diaminowej lub spermidyno/spermino-N-acetylotransferazy, które powodują ich degradację¹.

Funkcja biologiczna amin biogennych

W ciągu ostatnich trzech dekad prowadzono intensywne badania, które dowiodły niezbędności PA w cyklu komórkowym jak i ich roli w namnażaniu się komórek nowotworowych. PA oraz enzymy biorące udział w ich biosyntezie mają wpływ na procesy komórkowe, rozpoczynając od stymulacji replikacji, poprzez wpływ na czynniki transkrypcyjne i kończąc na syntezie białek. ODC i kilka innych poliaminowych metabolitów białkowych jest niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania tkanek i komórek (wzrost, rozwój, naprawa).^{1,3,5-8}

Biorąc pod uwagę fakt, że PA w komórce są obdarzone ładunkiem dodatnim, uczestniczą w elektrostatycznych oddziaływaniach z wieloma makrocząsteczkami, między innymi z kwasami nukleinowymi i białkami. Oddziałując z kwasami nukleinowymi mogą neutralizować ujemnie naładowane grupy fosforanowe w wyniku tworzenia wiązań typu jon-jon przez co redukują siły odpychające między nimi.

PA wpływają na strukturę przestrzenną kwasów nukleinowych, ułatwiając przekształcenia konformacyjne formy B w formę A, czy w lewoskrętną Z.⁹ Spermina i spermidyna mogą indukować przejście krótkich odcinków (dG-dC)_n będących częścią B-DNA w formę Z-DNA. W związku z tym, że te sekwencje występują w wielu organizmach, mogłyby pełnić znaczącą rolę w określaniu warunków regulacji aktywności genów.¹⁰ Ponadto PA dla naprzemiennych sekwencji pirymidynowo-purynowych stabilizują powstałą lewoskrętną formę Z-DNA.¹¹ Okazało się, że PA nie tylko wymuszają formę A helisy DNA, ale wykazują do niej większe powinowactwo niż w stosunku do formy B. Zwłaszcza duża bruzda A-DNA stanowi dogodne miejsce wiązania się wszystkich poliamin. Może być to związane z optymalizacją oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy cząsteczkami. W przypadku B-DNA, putrescyna jako miejsce wiązania preferuje szkielet fosforanowo-cukrowy zaś spermina i spermidyna wiążą się wzdłuż rdzenia lub do dużej lub małej bruzdy.¹²

Dodatkową korzyścią wynikającą z interakcji pomiędzy PA i DNA jest zabezpieczenie genomowego DNA przed szkodliwym działaniem wolnych rodników oraz promieniowania jonizującego^{13,14}, a co za tym idzie przed mutacjami i innymi transformacjami. W roztworze z polinukleotydami PA hamują aktywności endonukleaz (również DNazy I).^{15,16} Jeżeli DNA występuje w formie nieuporządkowanej aktywność endonukleaz powoduje przecięcie wiązań fosfodiesterowych, natomiast dla formy skondensowanej trawienie restrykcyjne zostaje zahamowane. Zmiana aktywności endonukleazy może być związana z kondensacją DNA w wyniku zablokowania ponad 90% ujemnych ładunków DNA przez PA.^{17,18,66} Badając niekowalencyjne oddziaływania poliamin z kwasami nukleinowymi wykazano ich rolę w stabilizacji struktur dwu- i trójniciowych. PA zwiększają również trwałość syntetycznych DNA o anomalnych sekwencjach⁹⁹ czy z niesparowaniami. Podnoszą temperaturę topnienia (T_m) dupleksów z wybrzuszeniami czy struktur typu szpilki do włosów. Ta różnorodność funkcji w interakcjach z

DNA może być istotna w procesach formowania nukleosomów¹⁹, zmiany stopnia upakowania chromatyny i specyficznej regulacji ekspresji genów.²⁰

Ostatnio wykazano, że naturalne poliaminy oddziałując w jądrze komórkowym z grupami fosforanowymi DNA tworzą agregaty (NAPs; ang. *nuclear aggregate of polyamines*). Dotychczas zidentyfikowano trzy NAPs o masie 1000, 4800 i 8000 D. Te bogate w dodatnie ładunki struktury mogą uczestniczyć w indukowaniu zmian konformacyjnych, stabilizowaniu różnych struktur DNA i RNA i pełnić rolę ochronną np. genomowego DNA.²¹

Wiadomo, że poliaminy wiążą się z fosfolipidami, zwiększając tym samym trwałość błon biologicznych. Efektywność oddziaływań z membranami rośnie w szeregu $\text{Put}^{2+} < \text{Spd}^{3+} < \text{Spm}^{4+}$, czyli wraz ze wzrostem długości i wielkości ładunku sprotonowanej formy aminy.²²

Od niedawna postuluje się również ich aktywność jako czynników antyglikacyjnych,⁵ gdyż ze względu na obecność grup aminowych mogłyby pełnić rolę „buforów” chroniących komórki przed reakcjami z grupami karbonyłowymi cukrów.

Istotność poliamin w funkcjonowaniu komórki odzwierciedla ścisła regulacja kontroli ich poziomu wewnątrzkomórkowego. Stężenie poliamin w komórce jest restrykcyjnie kontrolowane i regulowane przez ich biosyntezę, degradację i transport. Zakłócenie tej równowagi może się skończyć śmiercią komórki.²³

Od dawna znany jest fakt, że w komórkach nowotworowych następuje dramatyczny wzrost stężenia PA.^{24,25} Stwierdzono również, że ich stężenie zmienia się w czasie chemioterapii. PA mogą być wykorzystywane jako markery do określania stopnia zaawansowania choroby, monitorowania skuteczności terapii czy wczesnego wykrywania przerzutów. Niestety ze względu na swój charakter, rolę stabilizacyjną i ochronną DNA wspomagają również proces angiogenezy. Ta dwoistość funkcji fizjologicznej oraz złożoność szlaku metabolicznego poliamin powoduje, że nie udało się do tej pory efektywnie wykorzystać PA w terapii antynowotworowej.²⁶

Paradoksalnie, chociaż minęło ponad 300 lat odkąd po raz pierwszy udokumentowano istnienie poliamin i mimo wieloletnich intensywnych badań potwierdzających szeroki wachlarz zastosowań, nadal brak szczegółowego zrozumienia funkcji PA i mechanizmu ich działania.

Budowa poliamin

Kluczem do zrozumienia różnorodnych funkcji biologicznych poliamin może być ich budowa oraz efektywność oddziaływań z makrocząsteczkami w komórce.

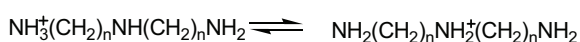
Mimo nieskomplikowanej budowy cząsteczki poliamin niosą unikalne cechy strukturalne związane z regularnym rozmieszczeniem dodatnich ładunków poprzedzielanych hydrofobowymi mostkami metylenowymi. Silny zasadowy charakter atomów azotu występujących w cząsteczce decyduje o stopniu sprotonowania i wydajności tworzenia kompleksów molekularnych.

Wysokie stałe protonowania powodują, że PA mają charakter polikationowy, nawet w środowisku słabo zasadowym (tabela 1).

Tabela 1. Stałe protonowania amin biogennych (oznaczone metodą potencjometryczną).

PA	Wzór aminy	log K ₁	log K ₂	log K ₃	log K ₄	T [°C]	μ [mol/dm ³]	literatura
Put	NH ₂ (CH ₂) ₄ NH ₂	10,67	9,49			25	0,1 NaCl	27
Spd	NH ₂ (CH ₂) ₃ NH(CH ₂) ₄	10,83	9,83	8,35		25	0,1 NaCl	28
Spm	NH ₂ (CH ₂) ₃ NH(CH ₂) ₄ NH(CH ₂) ₃ NH ₂	10,86	10,05	8,82	7,95	25	0,1 NaCl	28

Reakcje protonowania grup pierwszorzędowych w PA dają wyższy efekt egzotermiczny niż drugorzędowych.²⁹ Różnice w wartościach ΔH kolejnych etapów protonowania poliamin NH₂(CH₂)_nNH₂ maleją wraz ze wzrostem długości łańcucha metylenowego. Grupy aminowe oddzielone długim łańcuchem ($n \geq 4$) zachowują się jak dwa niezależne ugrupowania donorowe. Jeżeli łańcuch zawiera mniej niż 3 atomy węgla pomiędzy grupami aminowymi, wartość pKa jednej stałej protonowania tych amin jest mniejsza niż 7. W komórce taka amina nie jest obdarzona ładunkiem dodatnim, nie ma, więc możliwości oddziaływać z makrocząsteczkami w przeciwieństwie do amin biogennych.³⁰ Badania eksperymentalne wykazały różnice w mechanizmie protonowania amin symetrycznych i niesymetrycznych. W przypadku amin symetrycznych w wyniku pierwszego etapu protonowania postuluje się utworzenie równowagi tautomerycznej. Ładunek dodatni umieszczony jest na terminalnym atomie azotu lub na drugorzędowej grupie aminowej.



W kolejnym etapie kation wodorowy zostaje przeniesiony z aminowej grupy drugorzędowej na pierwszorzędową. Dla amin niesymetrycznych protonowanie zachodzi równocześnie na obu atomach azotu lub protonowanie azotu drugorzędowego następuje po całkowitym sprotonowaniu grup pierwszorzędowych.³⁰ PA są całkowicie sprotonowane w roztworze o fizjologicznym pH, a tym samym wykazują wysokie powinowactwo do polianionowych kwasów nukleinowych, enzymów oraz mają ułatwioną dyfuzję przez błony komórkowe.

Tworzenie kompleksów molekularnych oraz skuteczność ich wzajemnego dopasowania zależy od wielu czynników. Po pierwsze od zasadowości poliaminy, po drugie od liczby i charakteru centrów oddziaływań, ale także od całkowitego ładunku niesionego przez PA, który nie może być rozpatrywany jako ładunek punktowy jak w przypadku jonów metali. Usytuowanie ładunku wzdłuż całego ruchliwego łańcucha metylenowego, umożliwia PA jedyny w swoim rodzaju sposób interakcji. Ta unikalna topografia cząsteczki pozwala działać np. sperminie, która może łączyć duży i mały rowek helisy, trzymać razem jak klamra dwie różne nici lub dwie odległe części tej samej nici DNA. Długość łańcucha aminoalkilowego i położenie grup aminowych są również istotnymi czynnikami, które mają wpływ np. na wzrost trwałości termodynamicznej kompleksów PA z dupleksami i trypleksami kwasów nukleinowych. W związku z tym przez lata badano wiele modyfikowanych PA powstałych w wyniku zmiany ilości ładunków,³¹ różnych

długości i liczby łańcuchów węglowych pomiędzy azotami³² lub dodania łańcucha do jednej lub obu terminalnych grup aminowych.^{33,34}

Proponowane modele oddziaływań PA/DNA zakładają, że kompleksy te są stabilizowane w wyniku oddziaływań pomiędzy donorowymi protonami PA (Spm^{+4}) i akceptorowymi grupami cząsteczki DNA, a w konsekwencji do ulokowania się PA w głębokim i reaktywnym dużym rowku. Terminalna grupa aminowa może oddziaływać z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi, natomiast wewnątrzcząsteczkowe atomy azotu mogą być zaangażowane w specyficzne wiązania wodorowe z parami zasad heterocyklicznych w szczególności z GC w dużej bruzdzie i AT w małej.⁴⁸ Mimo tego że, strukturalnie, poliaminy są prostymi ligandami to ich oddziaływania z kwasami nukleinowymi odbywają się prawdopodobnie na wielu poziomach (co zostanie szczegółowo omówione w rozdziale 3 pracy).

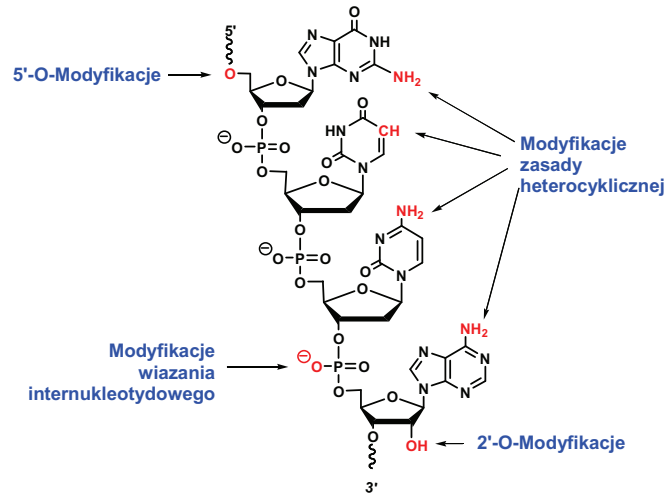
2.2. Modyfikacje chemiczne DNA za pomocą poliamin

Poliaminy wykazują wysokie powinowactwo do ujemnie naładowanych kwasów nukleinowych. Obdarzone dodatnim ładunkiem cząsteczki wzmacniają trwałość kwasów nukleinowych przeciwko chemicznej jak i enzymatycznej degradacji, ułatwiając formowanie drugo- i trzeciorzędowych struktur oraz ich dyfuzję przez błony komórkowe. PA są więc idealnymi substratami do tworzenia kowalencyjnych połączeń z kwasami nukleinowymi. Powstałe modyfikowane oligomery można wykorzystać jako cząsteczki transportujące, ze względu na łatwość ich przenikania przez błony komórkowe^{42,49,63}, stabilizację struktur dwu- i trójniciowych^{40-43,45,51}, indukcję aktywności rybonukleaz^{43,63}, a także jako łączniki umożliwiające wprowadzenie grup reporterowych.^{63,66}

Syntetyczne oligonukleotydy są wykorzystywane w wielu dziedzinach nauki (biotechnologia, biologia molekularna) i medycyny (diagnostyka, terapia). Spektrum zastosowań oligonukleotydów wzrasta w wyniku chemicznej modyfikacji ich struktury. Modyfikowane DNA wykorzystuje się między innymi jako efektywne czynniki modulujące funkcje komórki, hamujące ekspresję genów na poziomie transkrypcyjnym (terapia antygenowa) i translacyjnym (terapia antysensowa)^{43,48} czy w metodach wykorzystujących aptamery, rybozimy czy siRNA^{43,49}.

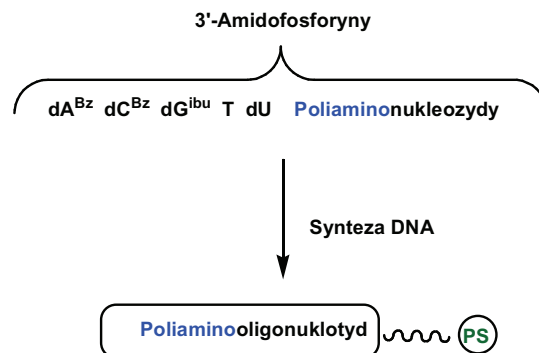
Jak wspomniałam wcześniej, mimo że funkcje biologiczne poliamin i ich biokoniugatów są przedmiotem intensywnych badań, to dokładny mechanizm działania PA w komórce nadal nie został w pełni poznany. Analogi kwasów nukleinowych zawierające kowalencyjnie związane reszty poliamin wydają się być interesującymi modelami mogącymi przybliżyć nas do zrozumienia natury oddziaływań poliamina – kwas nukleinowy.

W ciągu ostatnich lat przeprowadzono wiele badań w celu poznania właściwości poliaminooligonukleotydów, powstałych w wyniku wprowadzenia łańcucha aminoalkilowego w różne części nukleotydu. Modyfikacje dotyczyły części zasadowej, cukrowej (pozycje 1', 4' oraz grupy 2' i 5' hydroksylowe) oraz wiązania internukleotydowego (rys. 2).



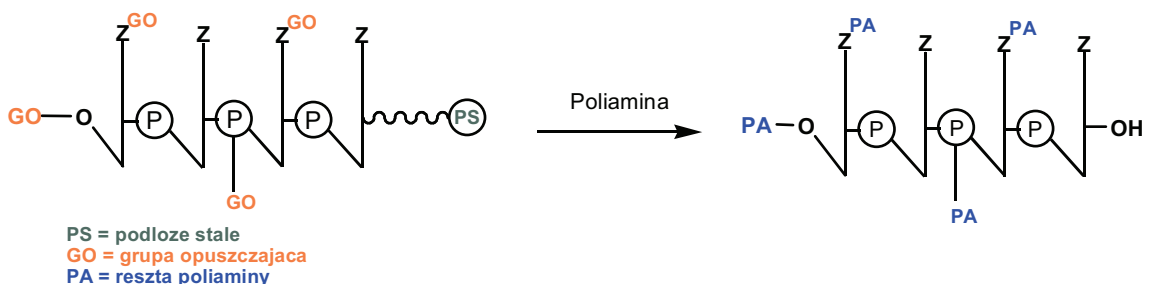
Rys. 2. Miejsca modyfikacji oligonukleotydu poliaminą.

Reszty poliaminowe można wprowadzać do kwasów nukleinowych na dwa sposoby. Jedną z nich jest metoda bezpośrednia, wykorzystująca modyfikowane nukleozydy, które po wcześniejszej fosfitylacji wprowadza się w na drodze automatycznej syntezy w określone miejsce w łańcuchu DNA (rys. 3).



Rys. 3. Metoda bezpośrednia syntezy poliaminooligonukleotydów.

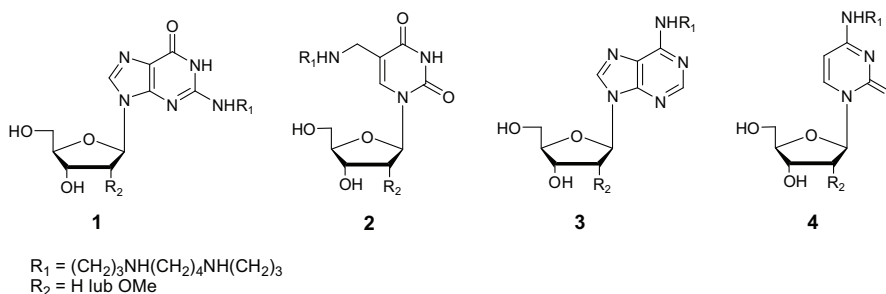
Drugą drogą jest metoda postsyntetyczna – oparta jest na reakcji poliaminy z odpowiednim nukleotydem w DNA, który posiada dobrą grupę opuszczającą w warunkach substytucji nukleofilowej (rys. 4).



Rys. 4. Metoda postsyntetyczna syntezy poliaminooligonukleotydów.

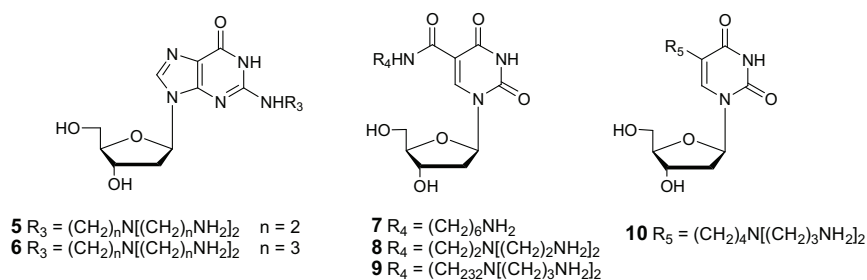
2.2.1. Modyfikacje w części zasadowej nukleozydu

Modyfikacje poliaminowe dotyczyły zarówno zasad purynowych jak i pirymidynowych. Jednostki aminoakilowe były wprowadzane w pozycje egzoaminowe jak i w obrębie pierścienia. W naszym laboratorium przez wiele lat prowadzono badania nad opracowaniem efektywnej syntezy wprowadzania symetrycznych poliamin (np. sperminy) w część zasadową wszystkich klasycznych nukleotydów występujących w DNA^{40,41} (schemat 1). Otrzymane modyfikowane poliaminonukleotydy posłużyły do przeprowadzenia badań nad trwałością powstałych poliaminooligonukleotydów z komplementarnymi nićmi DNA.



Schemat 1. Modyfikacje części zasadowej nukleozydów.

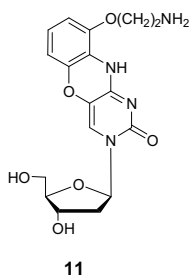
Dodatknie ładunki protonowanej reszty sperminy powodują w większości przypadków wzrost temperatury topnienia struktur dwu- i trójniciowych. Efekt ten jest zależny od liczby oraz miejsca modyfikacji. Wykazano też nieco zwiększoną odporność tak modyfikowanych oligonukleotydów na działanie enzymów nukleolitycznych np.: fosfodiesterazy z jadu węża.⁴³



Schemat 2. Struktury modyfikowanych nukleozydów z łańcuchem amino alkilowym.

W dalszych badaniach wykorzystano oligonukleotydy niosące łańcuchy aminoalkilowe w pozycji 5 deoksyurydyn (**7-10**).⁴³ Dupleksy 17-merów z trzema jednostkami poliaminonuklezydowymi wykazywały zwiększoną trwałość termodynamiczną. Największy efekt uzyskano dla oligonukleotydu modyfikowanego związkiem **7** (+2,6 do + 6,0 °C; 0,01 M NaCl; pH 7) w dupleksie z DNA i związkiem **8** (-1,2 do +3,1 °C; 0,01 M NaCl; pH 7) w dupleksie z RNA. Dalsze eksperymenty wykazały, że jeżeli pomiar temperatury topnienia był prowadzony w buforze o wyższym stężeniu soli (do 1 M NaCl) lub zablokowano terminalne grupy aminowe grupą

acetylową to obserwowano niższą trwałość analizowanych dupleksów. Może to prowadzić do wniosku, że terminalny atom azotu jest czynnikiem stabilizacyjnym, redukując ilość ujemnych ładunków szkieletu fosforanowego. Podobne właściwości wykazała 2'-deoksyurydina zmodyfikowana w pozycji 5 za pomocą *syn*-norspermidyny (**10**) oraz 2-[*N*-[3-[*N,N*-bis(2-aminoetylo)amino]etylo]-2'-deoksyinozyna (**5**) i 2-[*N*-[3-[*N,N*-bis(3-aminoetylo)amino]etylo]-2'-deoksyinozyna (**6**).⁴³ Ponadto stwierdzono, że oligonukleotydy zawierające modyfikowane związki **5** i **6** na końcu 5'-oligomeru charakteryzują się większą odpornością na działanie nukleaz.

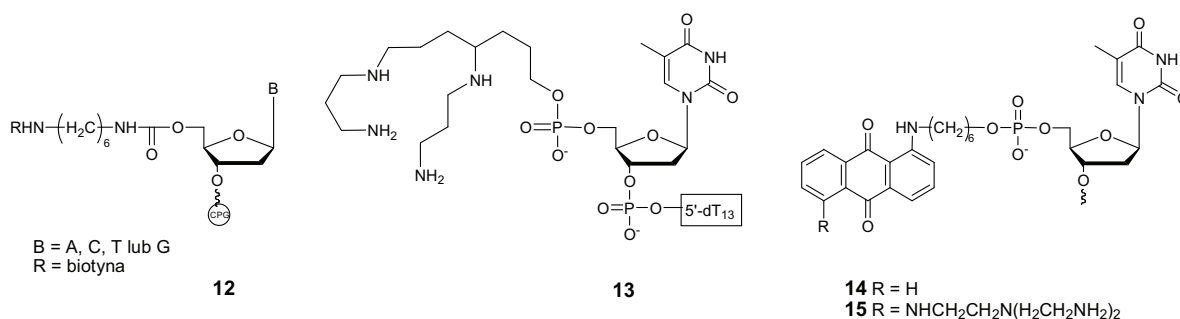


Tricykliczny analog cytozyny (**11**) z grupą 2-aminoetoksyową w pozycji 9-fenoksazyny („G-clamp”) znacznie podwyższa trwałość termodynamiczną kompleksów z DNA i RNA. Temperatura topnienia dupleksu w stosunku do niemodyfikowanego była wyższa o +18,0 °C. Wzrost ten autorzy tłumaczą nałożeniem się dwóch efektów: efektywniejszymi oddziaływaniami warstwowymi zasad i tworzeniem dodatkowych specyficznych wiązań wodorowych.⁴⁴

2.2.2. Modyfikacja w części cukrowej nukleozydu

Modyfikacje w pozycji 5' i 2' pierścienia cukrowego

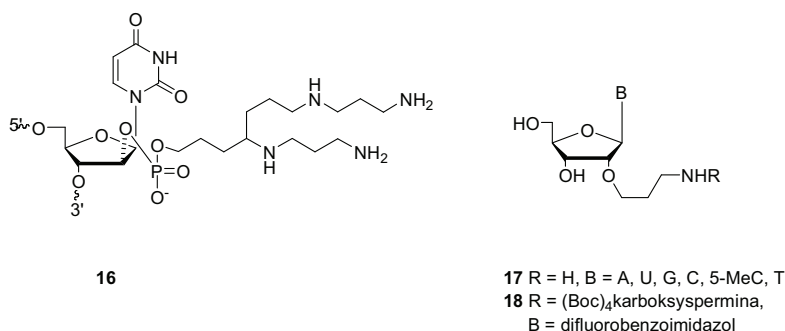
Chattopadhyaya i współpracownicy zsyntezowali oraz przyłączyli do *ara*-urydyny C-rozgałęzioną pochodną sperminy⁴⁵. Zmodyfikowano pozycję 5' (**13**) oraz 2' (**16**) deoksyrybozy, a następnie przebadano wpływ tych cząsteczek na trwałość struktur trypleksowych DNA. Autorzy wykazali dużą zdolność tego typu struktur do stabilizowania trypleksów ze względu na wzmocnienie stopnia wiązania się z trzecią nicią modyfikowanego oligomeru. Związki te efektywnie działają w dość szerokim zakresie pH (5,5 – 7,6), a ponadto umożliwiają przestrzenną orientację w kierunku małej lub dużej bruzdy i ułatwiają umieszczenie ich w sąsiedztwie rdzenia fosforanowego.



Schemat 3. Modyfikacje pozycji 5'-rybozy.

Związek (**12**), modyfikowany w położeniu 5' diaminą niosącą biotyne, został wykorzystany do oszacowania ilości przetransportowanego do wnętrza komórki neoglikoproteinowego (M6P-BSA)

koniugatu z DNA i wykrycia miejsca jego lokalizacji.⁴⁶ Odnotowane temperatury topnienia dupleksów DNA zawierających w jednej nici modyfikowaną koniugatem poliamino-antrachinonowym w pozycji 5' resztę tymidyny (**14**) i (**15**) wskazują, że na wzrost temperatury topnienia formy dwuniciowej mają wpływ nie tylko właściwości interkalacyjne cząsteczki, ale i łańcuch poliaminowy.⁴⁷



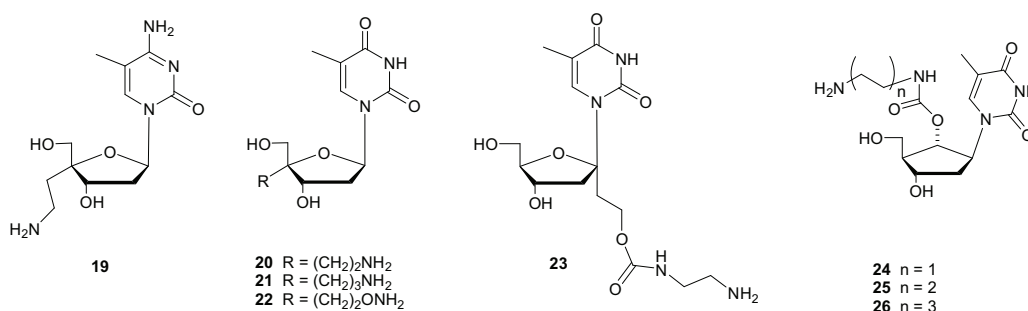
Schemat 4. Modyfikacje pozycji 2'-rybozy.

Oligonukleotyd zawierający modyfikację (**17**) poddano hybrydyzacji z komplementarnym fragmentem RNA. Uzyskane wyniki nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o wpływ modyfikacji na trwałość dupleksu. W zależności od sekwencji, długości i liczby wprowadzonych modyfikacji obserwowano wzrost lub obniżenie trwałości badanych struktur.⁴³

W innym doniesieniu⁴⁹ przedstawiono syntezę 12-meru RNA bogatego w reszty adenozyne z wbudowaną w środek sekwencji nukleotydową pochodną sperminy (**18**). Mimo niskiej wydajności syntezy otrzymane oligomery mogą być wykorzystane w terapii RNAi. Mogą ułatwiać przenikanie siRNA przez błony komórkowe oraz podwyższać ich odporność na enzymy hydrolityczne.

Modyfikacje w pozycji 1', 4', i 6' pierścienia cukrowego

Związki **23**, **19-22** oraz **24-26** wykorzystano w syntezie oligonukleotydów.^{43,50} W dalszych badaniach stwierdzono między innymi iż wszystkie modyfikowane oligomery wykazują podwyższoną odporność na trawienie endo- i egz nukleazami, zwłaszcza z nukleotydami modyfikowanymi w pozycji 4' rybozy **20-22**.⁴³

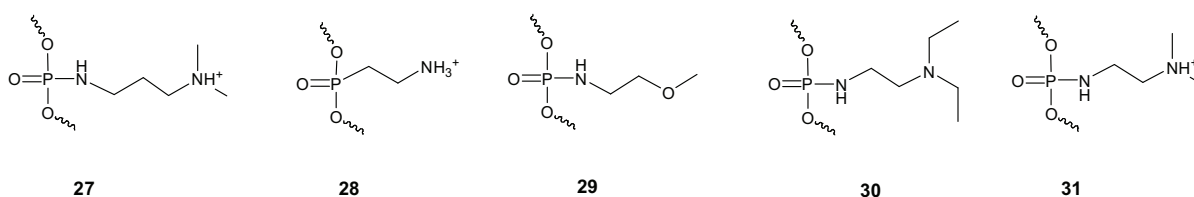


Schemat 5. Struktury modyfikowanych nukleotydów.

Odporność nukleolityczna wzrosła 90-krotnie w przypadku związku **20**. Zsyntezowano również oligomer zdolny do utworzenia struktury trypleksowej z dwuniciowym DNA o odpowiedniej sekwencji. Oligonukleotyd posiadał modyfikowaną resztę **19**, która miała wpływ na podwyższenie termicznej stabilności otrzymanego trypleksu. Pochodna metylodeoksytydyny włączona do jednej nici zwiększała odporność 3'-egzonukleazową struktury trypleksowej. Stwarza to potencjalną możliwość wykorzystania tego typu związków w terapii np. antygenowej. W dalszej kolejności mierząc temperaturę topnienia form dupleksowych oligonukleotydów zawierających w jednej z nici reszty **24**, **25** i **26** wykazano ich destabilizujący wpływ na trwałość kompleksów z DNA i RNA. Jedynie związek **24** powodował wzrost trwałości dupleksów z DNA.

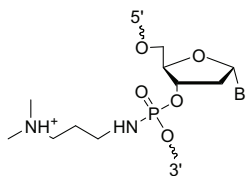
2.2.3. Modyfikacje wiązania fosfodiesterowego

Aminoalkilowe modyfikacje wiązania internukleotydowego znacząco wpływają na właściwości hybrydazyjnych oligonukleotydów. Oligomery o charakterze jonu obojnego (niem. *zwitterion*) wykazują zwiększone powinowactwo do hybrydazyjacji z komplementarnymi niciami w roztworach o niskich stężeniach soli.⁵¹



Schemat 6. Modyfikacje wiązania internukleotydowego.

Dowodzono, iż obecność modyfikacji aminowych **27** i **28** w oligonukleotydzie wpływa na trwałość struktur dupleksowych z DNA i RNA i jest to zjawisko niezależne od stężenia soli w roztworze. Daje to możliwości wykorzystania, modyfikowanych poliaminami oligomerów, jako sond molekularnych.⁵¹ Związek **27** wykorzystano, jako modyfikację w syntezie α -nukleotydów, które zostały włączone do nici polinukleotydowej. W dalszych badaniach stwierdzono między innymi, iż modyfikowany oligonukleotyd (α -ON) wykazywał zwiększone powinowactwo do pojedynczych nici DNA i RNA. Dupleksy zawierające łańcuchy aminoalkilowe wykazywały podwyższoną trwałość termiczną. Dupleks α -ON/RNA nie był substratem dla RNazyH.⁵²



Modyfikowany α -nukleotyd

W warunkach fizjologicznych jony potasowe utrudniają tworzenie się form trypleksowych DNA z użyciem niemodyfikowanych bogatych w puryny oligonukleotydów. Zmiana ujemnie naładowanych wiązań fosfodiesterowych na wiązania neutralne pozwala na tworzenie TFO (ang. *triple-helix-forming oligonucleotide*). Wprowadzenie do nici obdarzonych dodatnim ładunkiem

reszt **29** i **30** w znacznym stopniu zmienia powinowactwo oligonukleotydów do tworzenia TFO oraz obniża zależność od jonów Mg^{2+} i K^+ .⁵³

Oligomery zawierające w części wiązania fosfodiesterowoamidowe **31** wykorzystano w badaniach trwałości struktur trypleksowych.⁵⁴ Wprowadzenie kilku grup *N,N*-dimetyloaminoetylowych wpłynęło na zwiększenie odporności nukleazowej, jednak nie przyczyniło się do ułatwienia tworzenia trypleksów. Autorzy sugerują, że pełna użyteczność badanych struktur ujawni się w roztworach o wyższym pH.

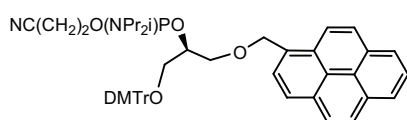
2.3. Nienukleozydowe analogi kwasów nukleinowych

Oligonukleotydy, stosowane jako terapeutyki muszą spełniać kilka warunków. Są to: efektywne wiązanie się z komórkowym RNA, odporność na działanie enzymów hydrolitycznych oraz zdolność efektywnego przenikania przez błony komórkowe. Włączenie jednej i kilku cząsteczek np. aminy czy interkalatora do oligomeru nadaje mu szczególnych właściwości. Tak modyfikowane oligonukleotydy wykazują określonego rodzaju właściwości, pozwalające na reakcje z innymi kwasami nukleinowymi czy białkami, mogą również być wykorzystywane jako nieradioaktywne sondy lub w procesie zautomatyzowanego sekwencjonowania. Wśród wielu funkcji biokoniuugatów można wyróżnić, między innymi, możliwość specyficznych wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań takich jak interkalowanie, wzrost dyfuzji przez błony komórkowe czy specyficzne wiązanie się z docelową makrocząsteczką. Istotnym i pożądanym skutkiem wprowadzanych zmian może być np. wzrost trwałości oligomeru w płynach komórkowych, zwłaszcza odporności na działanie nukleaz.

2.3.1. Właściwości interkalacyjne analogów

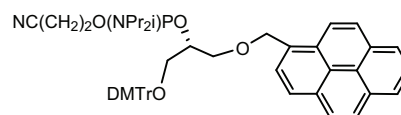
Acykliczne analogi nukleotydów posiadające właściwości fluorescencyjne odgrywają ważną rolę w rozwoju nowych metod rozpoznawania i wykrywania specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych.

Pedersen i współpracownicy⁵⁵ zaproponowali syntezę amidofosforynu (S)-1-O-(4,4'-dimetoksytrytylofenylometylo)-3-O-(1-pyrenylometylo)glicerolu (**32**) (IPN, ang. *intercalating pseudo-nucleotide*) (schemat 7), który włączyli do oligonukleotydu otrzymując interkalujący kwas nukleinowy (INA).



Amidofosforyn (S)-1-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-3-O-(1-pyrenylometylo)glicerolu

32



Amidofosforyn (R)-1-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-3-O-(1-pyrenylometylo)glicerolu

33

Schemat 7. Struktura amidofosforynów IPN.

Modyfikowany w ten sposób oligonukleotyd wykazywał większe powinowactwo do komplementarnej nici DNA (ssDNA) niż w stosunku do pojedynczej nici RNA (ssRNA). Temperatura topnienia (T_m) otrzymanego dupletu DNA/INA jest o 12,6 °C wyższa niż odpowiedniego RNA/INA (tabela 1, wers 3). Autorzy podkreślają, że skuteczność rozróżniania docelowej ssDNA od ssRNA zależy od ilości wprowadzonych modyfikacji, ich miejsca w łańcuchu polinukleotydowym oraz sąsiadujących par zasad. Włączenie do oligomeru dwóch cząsteczek IPN rozdzielonych czterema parami zasad (tabela 1, wers 4) powoduje wzrost trwałości struktury dwuniciowej z DNA o 13,4 °C w stosunku do trwałości dupletu niemodyfikowanego, a różnica w trwałości pomiędzy zhybrydowanymi DNA/INA a RNA/INA wzrasta do 25,8 °C.

Tabela 2. Temperatury topnienia dupletów zawierających INA jako wybrzuszenie.

Lp.	Oligonukleotyd	Komplementarny DNA 5'-AGCTTGCTTGAG-3'		Komplementarny RNA 5'-AGCUUGCUUGAG-3'		Rozróżnianie $T_m(\text{DNA})-T_m(\text{RNA})$
		T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	ΔT_m [°C]
1.	3'-TCGAACGAACTC- 5'	47,4	—	42,2	-	5,2
2.	3'-TCGAAC _G GAACTC- 5'	34,6	-12,8	37,8	-4,4	-3,2
3.	3'-TCGAAC _X GAACTC- 5'	50,4	3,0	37,8	-4,4	12,6
4.	3'-TCGA _X ACGA _X ACTC- 5'	60,8	13,4	35,0	-7,2	25,8

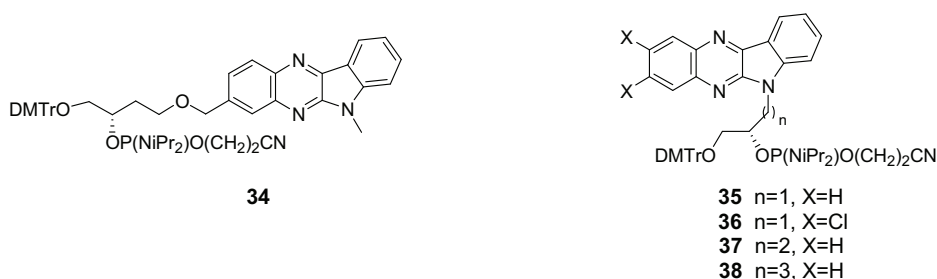
Analiza danych termodynamicznych pozwala wysnuć wniosek, że reszty pyrenu nie interkalują⁵⁴ w dupletach RNA/INA oraz, że tak modyfikowane oligonukleotydy mogą stać się użytecznym narzędziem dla rozróżniania pojedynczych nici DNA i RNA z identycznymi sekwencjami zasad.

W kolejnym kroku autorzy postanowili sprawdzić czy na właściwości interkalujące analogu ma wpływ zmiana stereochemii łącznika. W związku z tym zsyntezowali stereoizomer (R)-1-O-(pyren-1-ylometylo)glicerolu (**33**) i poddali hybrydacji z komplementarnymi ssDNA i ssRNA. Różnice w trwałości modyfikowanych dupletów DNA obejmują zakres od 3 °C w przypadku włączenia jednej reszty pyrenu (tabela 2, wers 3) do 3,5 °C dla dupletu z dwiema modyfikacjami rozdzielonymi czterema parami zasad (tabela 2, wers 4). Uzyskane rezultaty prowadzą również do wniosku, że związek **32** charakteryzuje się niższą skłonnością do hybrydacji z pojedynczą nicią DNA, niż związek **33**.

Tabela 3. Temperatury topnienia INA dupleksów z DNA i RNA.

Lp	Oligonukleotydy	Komplementarny DNA 5'-AGCTTGCTTGAG-3'				Komplementarny RNA 5'-AGCUUGCUUGAG-3'				Rozróżnianie Tm(DNA)- Tm(RNA)	
		32		33		32		33		32	33
	X =	Tm [°C]	ΔTm [°C]	Tm [°C]	ΔTm [°C]	Tm [°C]	ΔTm [°C]	Tm [°C]	ΔTm [°C]	ΔTm [°C]	ΔTm [°C]
1.	3'-TCGAACGAACTC-5'	48,0				40,5				7,5	
2.		32		33		32		33		32	33
3.	3'-TCGAAC GAACTC-5' X	51,5	3,5	48,0	0,5	38,0	-2,5	37	-3,5	13,5	11,5
4.	3'-TCGA ACGA ACTC-5' X X	61,0	13,0	57,5	9,5	34,8	-5,7	36,5	-4,0	26,2	21,0

Niższą zdolność do tworzenia dupleksów przez oligonukleotydy zawierające analog **33** autorzy tłumaczą mniejszą giętkością łącznika, która uniemożliwia efektywne interkalowanie reszty pyrenu w dupleksie. Z przeprowadzonych badań, zdaniem autorów, wynika, że istotnym elementem jest długość i rodzaj linkera za pomocą, którego włączano interkalator do oligonukleotydu. Wykorzystując dotychczasowe wyżej przedstawione wyniki⁵⁵⁻⁵⁷ autorzy postanowili znaleźć heteroaromatyczny interkalator, który charakteryzowałby się wysokim powinowactwem w stosunku do RNA. Otrzymali kilka pochodnych 6*H*-indolo-[2,3-*b*]chinoksaliny (schemat 8), a następnie przeanalizowali zależność długości łącznika od trwałości dupleksów DNA/DNA, DNA/RNA i DNA/LNA.



Schemat 8. Struktura pochodnych 6*H*-indolo-[2,3-*b*]chinoksaliny.

Umieszczone w Tabeli 3. dane termodynamiczne wskazują, że analogi (**35-37**) posiadające jeden lub dwa atomy węgla w łańcuchu alkilowym łącznika obniżają trwałość dupleksów DNA. Stabilizacja struktur dwuniciowych zachodzi, jeżeli łańcuch alkilowy łącznika zawiera więcej niż dwa atomy węgla (związki **38** i **34**). Ponadto autorzy zaobserwowali zwiększoną trwałość zhybrydowanych DNA/DNA, jeżeli interkalatory **35-37** włączono pomiędzy reszty guaninowe oligomeru, nie zaś cytozynowe. Efekt ten tłumaczą wzrostem siły oddziaływań warstwowych.

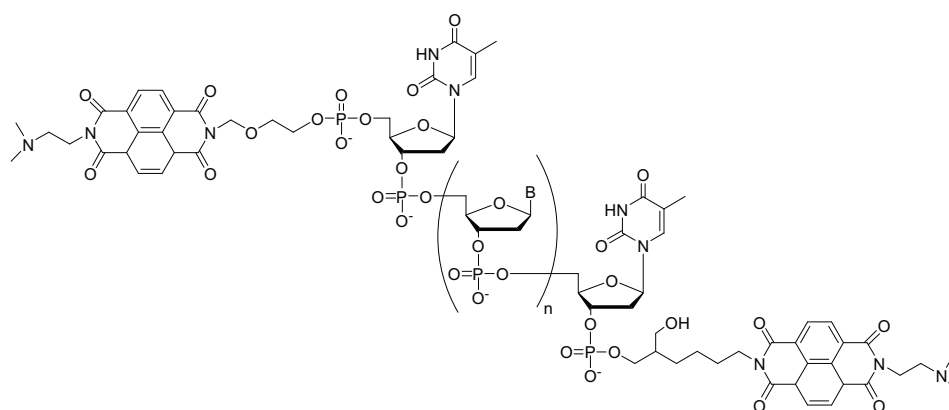
Tabela 4. Temperatura topnienia dupleksów DNA/DNA z modyfikacją włączoną jako wybrzuszenie.

	X=		35	36	37	38	34
	Sekwencja	Tm [°C]	Δ Tm [°C]	Δ Tm [°C]	Δ Tm [°C]	Δ Tm [°C]	Δ Tm [°C]
ODN1	5'-AGCTTG – GTTGAG-3'	49,6	-9,0	-8,3	-1,0	+1,7	+4,5
ODN2	3'TCGAACXCAACTC-5'						
ODN3	5'-AGCTTGXGTTGAG-3'	49,6	-6,0	-5,7	-1,9	+4,3	-0,9
ODN4	3'TCGAAC –CAACTC-5'						

W kolejnych eksperymentach przebadano trwałość dupleksów hybrydowych DNA/RNA oraz DNA/LNA z analogami **34-38** włączonymi na końcu 5' jednej nici oraz tworzącymi wybrzuszenie. Stabilizacja powstałych struktur, tak jak w przypadku dupleksów z DNA, była obserwowana dla analogów **34** i **38**. Podsumowując, autorzy pracy stwierdzają, że długość łącznika jest istotna ze względu na odpowiednią orientację przestrzenną pierścieni interkalatora. Interkalacja zachodzi tylko wtedy, kiedy wprowadzenie cząsteczki interkalatora powoduje optymalizację oddziaływań warstwowych z zasadami dupleksu.

NDI (ang. *naphthalene diimide*; naftalenodiimid), efektywnie stabilizuje zarówno dupлексы jak i dwie zhybrydowane sekwencje DNA. Grupa McLaughlina⁵⁸ postanowiła zbadać właściwości asymetrycznej pochodnej NDI oraz zdolność modyfikowanego oligomeru do tworzenia struktur trypleksowych (schemat 9).

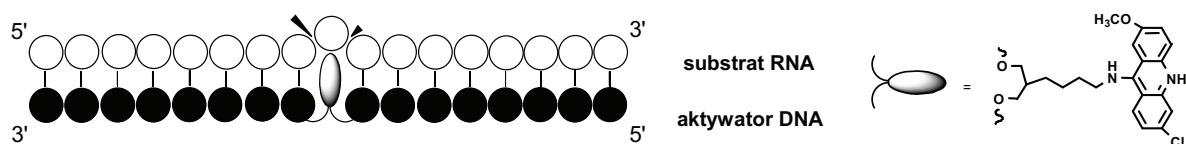
Otrzymane wyniki wskazują, że NDI jest bardzo efektywnym ligandem, przyczyniającym się do wzrostu zdolności trzeciej nici do wiązania się z docelowym dupлекsem DNA. Obecność pojedynczej reszty NDI w modyfikowanym oligonukleotydzie, niezależnie, który z końców nici jest modyfikowany, powoduje zmianę właściwości termodynamicznych trypleksu. Temperatura dysocjacji trzeciej nici wzrasta o 17 °C, natomiast dla dysocjacji dupлекsu zanotowano wzrost temperatury o 26 °C. Ponadto, wprowadzenie NDI na obu końcach pojedynczej nici spowodowało wzrost trwałości trypleksu o 41 °C.



Schemat 9. Struktura 3',5'-NDI bis-koniugatu z NDI jako interkalatorem na końcach oligonukleotydu.

2.3.2 Sztuczna rybonukleaza

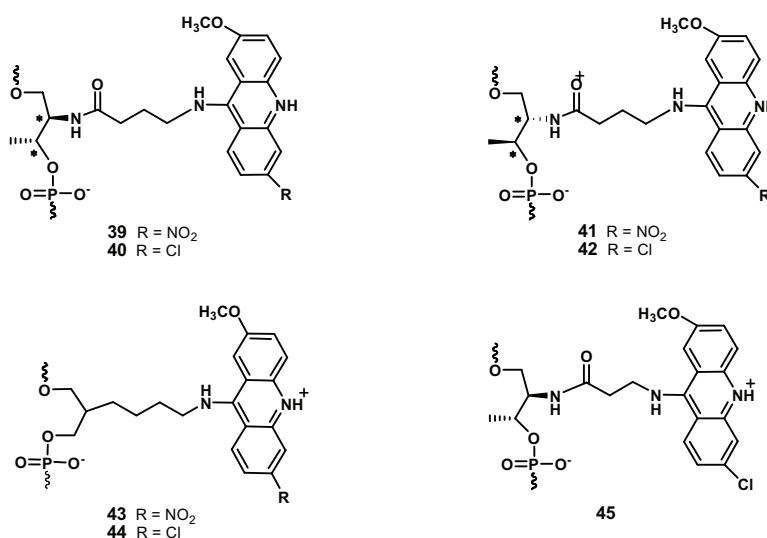
Modyfikowane antysensowe oligonukleotydy umożliwiają kontrolę ekspresji genów przez wiązanie się do mRNA. Do zwiększenia efektywności terapii antysensowej może przyczynić się odkrycie metody sekwencyjnie-specyficznej hydrolizy RNA. Jednym z takich podejść jest projektowanie sztucznej rybonukleazy. W tym celu zostały wykorzystane nienuklozydowe analogi akrydyny, których włączenie do oligonukleotydu pozwoliło na aktywowanie docelowego wiązania fosfodiesterowego w RNA (rys. 5).^{59,60}



Rys 5. Schematyczne przedstawienie działania sztucznej rybonukleazy.

Cząsteczka akrydyny „wypycha” niesparowaną zasadę na zewnątrz nici, powodując zmianę konformacji pierścienia cukrowego w nukleotydzie. Atom 2'-O rybozy zostaje przesunięty w pobliże atomu fosforu rozszczepianego wiązania fosfodiesterowego, inicjując wewnątrzcząsteczkowy atak nukleofilowy. Przeniesienie protonu z aromatycznego atomu azotu akrydyny ułatwia rozerwanie wiązania w pozycji 5' z pięciokoordynowanego związku pośredniego.⁵⁹ Selektywna i wydajna hydroliza zachodzi pod wpływem takich katalizatorów jak kompleksy La(III) oraz sole Zn(II) i Mn(II). Zaletą metody jest fakt, że pozostałe wiązania w substratowym RNA pozostają nienaruszone. Istotnym elementem wpływającym na efektywność hydrolizy okazało się pKa pochodnej akrydyny oraz długość i struktura przestrzenna łącznika, do którego przyłączona jest reszta akrydyny.

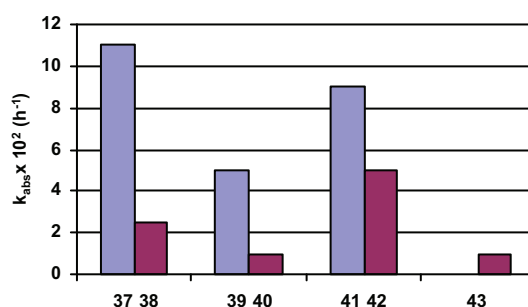
Spośród kilku przebadanych koniugatów (schemat 10) największą skutecznością wyróżniają się pochodne 9-amino-2-metoksy-6-nitroakrydyny (**39**, **41**, **43**) o pKa 7,3,⁵⁹ które przyspieszają protonowanie wiązania fosfodiesterowego sąsiadującego z niesparowanym nukleotydem.



Schemat 10. Monomery pochodnych akrydyny.

Na wykresie 1 przedstawiono wyniki aktywności przebadanych koniugatów DNA-akrydyna. Najbardziej efektywnym łącznikiem okazała się pochodna L-treoninolowa **39** oraz związek **43**, którego łącznik posiada również tetrametylenowy łańcuch alkiłowy, jednak ze względu na brak ugrupowania amidowego, charakteryzuje się większą ruchliwością konformacyjną. Ponadto zebrane wyniki wskazują, że najniższą aktywność wykazuje pochodna D-treoninolowa akrydyny

42 oraz analog **45**, którego łącznik cechuje się większą sztywnością strukturalną węglowego łącznika. Usztywnienie to może utrudniać odpowiednie umieszczenie pierścieni aromatycznych „rybonukleazy” pomiędzy parami zasad docelowego RNA.



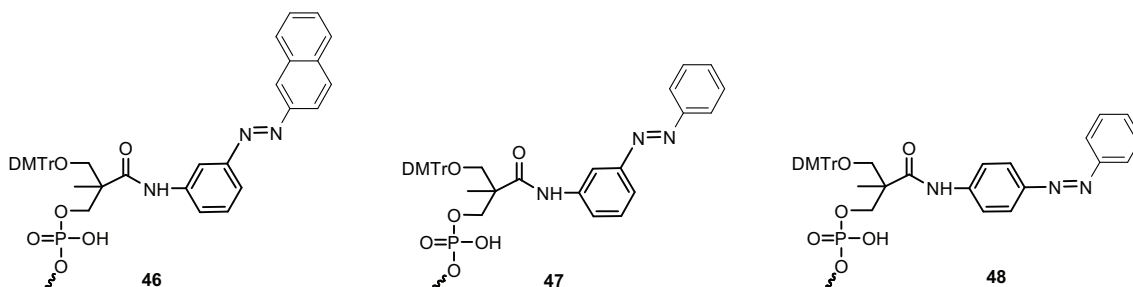
Wykres 1. Zależność aktywacji RNA od aktywności koniugatu DNA-akrydyna ze względu na strukturę łącznika.

Na podstawie dotychczasowych badań nie udało się jednoznacznie ustalić, czy efektywność cięcia jest zależna od sekwencji zasad wchodzących w skład substratowego RNA.

Autorzy postulują użyteczność pochodnych akrydyny w biologii molekularnej i nowych podejściach terapeutycznych: precyzyjne sekwencjonowanie genów, regulacja specyficznej ekspresji genów, manipulowanie RNA.⁵⁹

2.3.3. Fotoprzełączniki

Światłoczułe cząsteczki są stosowane do regulacji tworzenia i dysocjacji dupleksów i trypleksów. Najpopularniejszym związkiem jest cząsteczka azobenzenu, zwłaszcza pochodne zawierające podstawniki w pozycji *para* pierścienia (np. $-NH_2$, $-COOH$ czy $-OH$).^{61,62} Jednak ze względu na szybką, zależną od temperatury izomeryzację form *cis-trans* tych pochodnych umieszczono podstawniki w pozycji *meta* pierścienia. Dzięki temu, jak wykazano, otrzymano bardziej odporną na temperaturę formę *cis*-azobenzenu. Umożliwia to kontrolowanie powstawania i dysocjacji struktur dwu- i trójniciowych.



Schemat 11. Struktura pochodnych azobenzenu włączanych do oligonukleotydu.

Tworzenie trypleksów może być fotoregulowane w wyniku izomeryzacji *cis-trans* pochodnej azobenzenu włączonej do trzeciej nici. Płaski pierścień *trans*-azobenzenu (**48**) wprowadzony do trzeciej nici stabilizuje formę trypleksową przez oddziaływania warstwowe. Inny

wynik otrzymuje się w przypadku wprowadzenia formy *cis*, która wpływa na trypleks destabilizująco, tworząc zawadę steryczną. Prowadzi to do zmniejszenia prawdopodobieństwa hybrydacji z docelowym dupleksem (tabela 4).

Tabela 5. Wartość T_m utworzonych trypleksów.

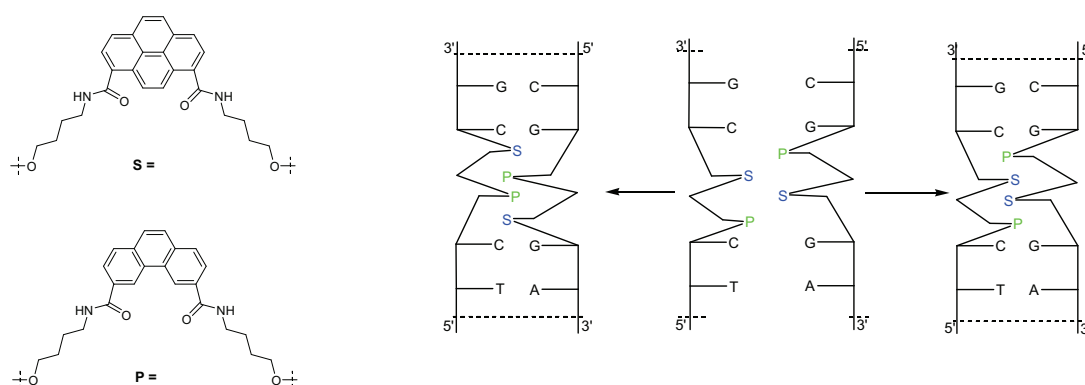
Modyfikowany oligonukleotyd	T_m [°C]		ΔT_m [°C]
	Forma- <i>trans</i>	Forma- <i>cis</i>	
46-T ₁₃	45,5	5,0	40,5
47-T ₁₃	29,5	13,5	16,0
48-T ₁₃	30,2	10,7	19,5

Okazało się, że wprowadzenie do oligomeru cząsteczki wielopierścieniowej podwyższa efektywność fotoregulacji. Szczególnym przypadkiem jest fenyloazonaftalen (**46**), którego wprowadzenie w formie *trans* zwiększa trwałość trypleksu o 40 °C (tabela 4).

2.3.4. Nienukleozydowe analogi jako sondy i nośniki grup funkcyjnych

Syntetyczne, nieizotopowo znaczone oligonukleotydy znajdują szerokie zastosowanie w sekwencjonowaniu, diagnostyce medycznej oraz jako sondy w biologii molekularnej. Strukturalne modyfikacje nukleotydów ułatwiają dostarczanie fragmentów kwasów nukleinowych do wnętrza komórki lub zwiększają ich odporność na działanie enzymów hydrolitycznych.⁶³

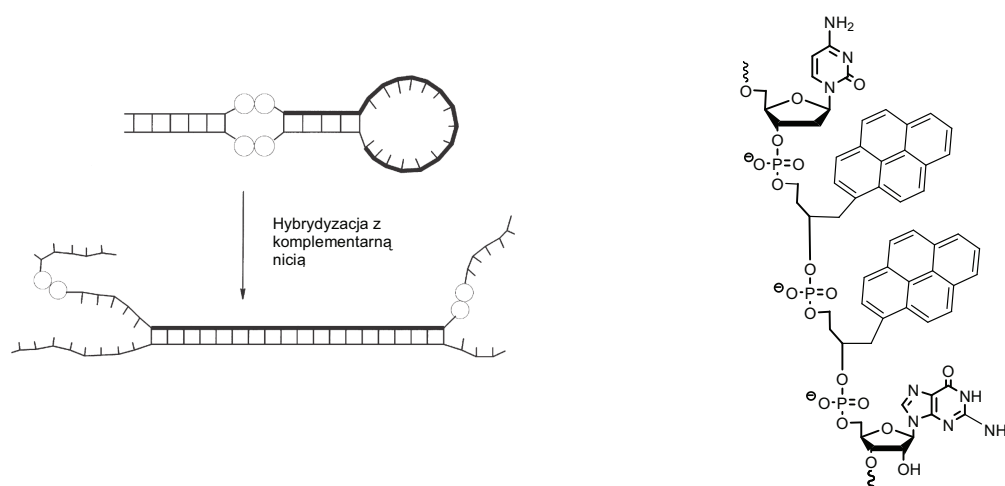
W jednej z prac⁶⁴ zaprezentowano syntezę i badania spektroskopowe dupleksów DNA, w których każdą z nici modyfikowano podobnymi strukturalnie, ale różnymi elektronowo cząsteczkami pyrenu i fenantrenu (rys. 6)



Rys. 6. Struktury poliaromatycznych interkalatorów. Prawdopodobny model oddziaływań pomiędzy komplementarnymi niciami modyfikowanymi parami fenantrenu (P) i pyrenu (S).⁶⁴

W efekcie umieszczenia w każdej z nici pojedynczych cząsteczek pyrenu i fenantrenu obserwowane są różnice we właściwościach spektroskopowych obu hybrydowych dupleksów. Jedynie w modelu zakładającym oddziaływanie pomiędzy resztami pyrenu następuje

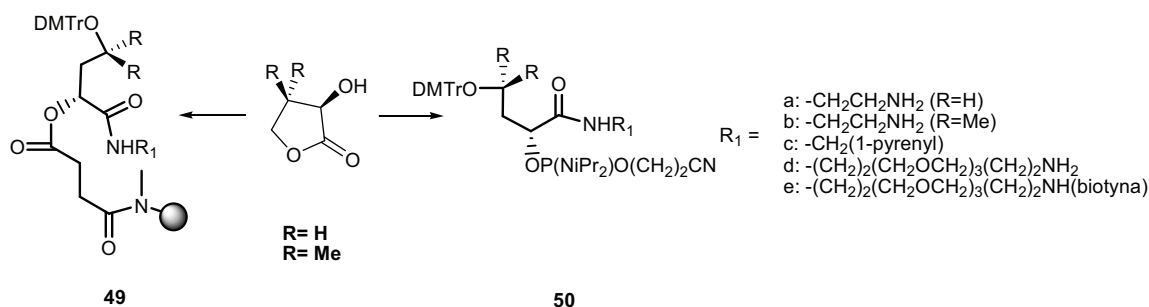
wzmocnienie pasma absorpcji (lub emisji) w wyniku utworzenia ekscymeru. Ponadto zaobserwowano, że oddziaływania warstwowe pomiędzy poliaromatycznymi związkami odznaczają się również wysokim stopniem selektywności i zachodzą w przypadku oddziaływań pomiędzy dwiema cząsteczkami pyrenu, ale nie fenantrenu. Pozwala to kontrolować właściwości spektroskopowe tworzących się hybryd DNA przez dobór miejsca wprowadzenia reszt poliaromatycznych. Tak modyfikowane oligonukleotydy mogą znaleźć zastosowanie w tworzeniu fluorescencyjnych nanomateriałów lub jako sondy wykorzystywane w celach diagnostycznych. Te same właściwości cząsteczek pyrenu wykorzystano do zaprojektowania sond monitorujących miejsca hybrydyzacji pomiędzy fragmentami kwasów nukleinowych.⁶⁵ Przebadano właściwości spektroskopowe modyfikowanych oligonukleotydów i ich zdolność do hybrydyzacji z komplementarnym DNA lub komplementarnym DNA z włączonymi jednostkami pyrenu (rys. 7).



Rys. 7. (po lewej) Model sondy monitorującej hybryzację DNA w wyniku obserwacji zaniku pasma fluorescencyjnego ekscymeru; (po prawej) fragment modyfikowanego oligonukleotydu.

Dla przebadanych dupleksów zawierających jedną lub kilka cząsteczek pyrenu zaobserwowano wzrost natężenia pasma fluorescencyjnego, w wyniku utworzenia ekscymeru (~470 nm). Największe różnice były widoczne w przypadku modyfikowania wewnętrznej części oligomeru za pomocą dwóch reszt pyrenowych lub tandemowo włączanych cząsteczek pyrenu do komplementarnych nici. Uzyskane rezultaty pozwalają na konstruowanie specyficznych detektorów DNA, opartych na pojawianiu się i zanikaniu pasm fluorescencyjnych ekscymerów podczas hybrydyzacji z docelowym kwasem nukleinowym (rys. 7). Nienukleozydowe analogi mogą być również wykorzystywane, jako nośniki różnych grup funkcyjnych czy reporterowych. Przeprowadzone eksperymenty wskazują, że wprowadzenie modyfikacji nie obniża powinowactwa modyfikowanego oligonukleotydu do tworzenia dupleksów z komplementarnymi nićmi DNA czy RNA.

Do grupy takich analogów należą dwie rodziny znaczników, których struktura oparta jest na pochodnych α -hydroksy- γ -butyrolaktonu⁶⁶ (schemat 12) oraz estru dietylowego kwasu 2,2-bis(hydroksyetylo)malonowego⁶³ (schemat 13).



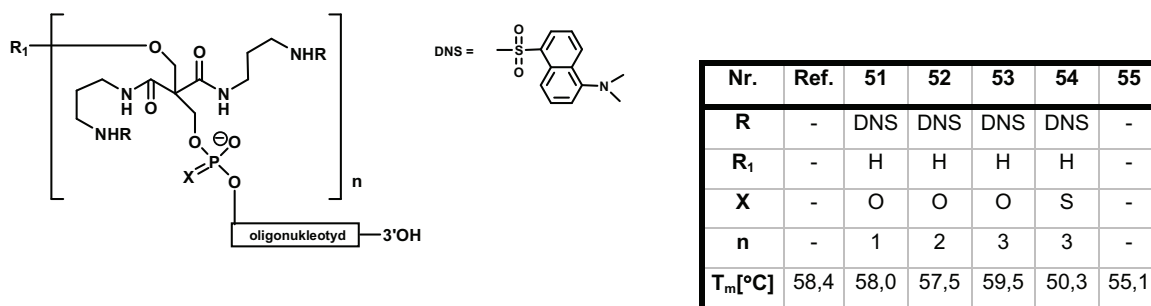
Schemat 12. Struktura pochodnych (*R*)-2,4-Dihydroksybutyroamidu.

Zaletą tej grupy nienukleozydowych reagentów są szerokie możliwości włączania grup funkcyjnych, prosta budowa, jak również występowanie tylko jednego centrum stereogenicznego w obrębie cząsteczki.

Tabela 6. Trwałość dupleksów w zależności od rodzaju modyfikacji i jej miejsca w oligonukleotydzie. Komplementarna nić: 5'-GAGGGTCCGAGTTTA-3'.

	Oligonukleotydy	T _m [°C]	$\Delta T_m/\text{mod.} [^\circ\text{C}]$
	5'-CTCCAAGGCTCAAAT-3'	56,7	-
49a	5'-CTCCAAGGCTCAAAT(7a)-3'	57,3	-0,3
50b	5'-(6b)CTCCAAGGCTCAAAT-3'	57,7	+0,1
50c	5'-CTCCAAGGCTCAAAT(6c)p-3'	60,0	+2,4
50c	5'-C(6c)CCAAGGC(6c)CAAAT-3'	50,7	-3,4
49c	5'-CTCCAAGGCTCAAAT(7c)-3'	61,6	+4,0
49d	5'-CTCCAAGGCTCAAAT(7d)-3'	57,7	+0,1
49e	5'-CTCCAAGGCTCAAAT(7e)-3'	57,2	-0,4

Nienukleozydowe analogi (schemat 13) mogą być wykorzystane do modyfikacji końca 3' nukleozydu wewnątrz nici, końca 5' oraz jako linkery w syntezie na podłożu stałym. Wśród przebadanych związków znalazły się krótko- i długo-łańcuchowe aminy oraz grupy reporterowe: pyren, biotyna i fluoresceina (tabela 5). Badania termodynamiczne nie wskazują, aby zdolność do hybrydyzacji z komplementarnymi nićmi DNA i RNA malała wraz z włączeniem modyfikacji. W kilku przypadkach odnotowano wzrost trwałości drugorzędowych struktur kwasów nukleinowych.⁶⁵



Schemat 13. Struktura multiznaczników i temperatury topnienia badanych dupleksów. Komplementarny oligonukleotyd: 5'-AGTCTACGACCATGATGTTTCGTTTCAG-3'.

Podobne wyniki uzyskano, kiedy jako łącznik wykorzystano pochodną kwasu malonowego (schemat 13). Otrzymano multiznaczniki w dwóch seriach: pierwsza zawierała grupę dansylową, druga oprócz grupy reporterowej miała modyfikowane wiązanie fosfodiesterowe.

Wyniki badań termodynamicznych dowodzą, że wprowadzenie modyfikacji nie wpływa znacząco na obniżenie temperatury topnienia powstałych dupleksów. Jedynie wprowadzenie pochodnej tiolowej powoduje niewielkie obniżenie trwałości dupleksu. Jednak autorzy sugerują, że jest to raczej skutek modyfikacji grupy fosforanowej⁶³ niż obecności nienukleozydowego łącznika.

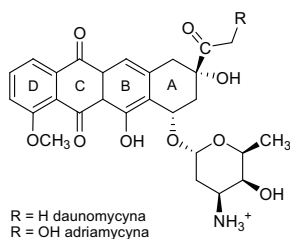
2.4 Sposoby oddziaływań poliamin w kompleksach z kwasami nukleinowymi

Jak wspominałam wcześniej, poliaminy wykazują tendencję do oddziaływań z kwasami nukleinowymi. Wynika to między innymi z ich polikationowego charakteru, który umożliwia neutralizowanie ładunku ujemnego zlokalizowanego na szkielecie fosforanocukrowym.^{74,91} Badania nad próbą określenia modelu tych oddziaływań obejmują techniki spektroskopowe (NMR, Raman), krystalograficzne, termodynamiczne i modelowanie komputerowe. Dotychczasowe wyniki wskazują różne sposoby tych interakcji. PA mogą oddziaływać bezpośrednio lub za pośrednictwem cząsteczek wody, tworząc wiązania wodorowe z nukleozasadami oraz w wyniku oddziaływań van der Waalsa z hydrofobowymi częściami zasad. Wyniki wielu badań krystalograficznych wskazują, że PA wykazują większe powinowactwo do form A-DNA, Z-DNA⁸⁴ niż do klasycznej helisy B-DNA. Warto jednak podkreślić, że oligonukleotydy wykorzystywane w tych badaniach są zwykle bogate w pary GC, które krystalizując, częściej przyjmują konformację A-DNA lub Z-DNA. Wysokie powinowactwo PA do nieklasycznych form DNA może sugerować, że zarówno struktura drugorzędowa jak i kompozycja zasad jest czynnikiem determinującym w rozpoznaniu poliaminowym.

2.4.1 Badania krystalograficzne

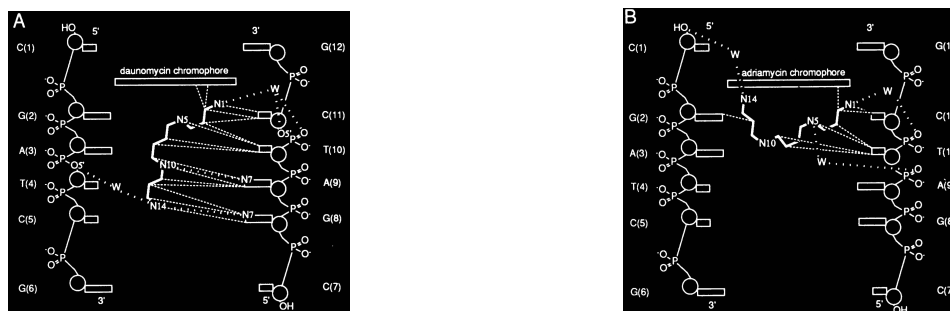
Miejsca wiązania w B-DNA

Analiza mapy gęstości elektronowej kryształów dodekameru Drew-Dickerson'a $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ (DDD)⁶⁷ pozwalała wnioskować, że pojedyncza cząsteczka Spm^{4+} oddziałuje z obiema niciami dupleksu w regionie $d(\text{CGCG})_2$, tworząc mostek w poprzek dużej bruzdy. Dzięki kolejnym badaniom kryształów tego samego dodekameru, otrzymywanych w obecności sperminy okazało się, że nie zawsze istnieje możliwość detekcji cząsteczki PA.⁶⁸ Opisano również⁶⁹ strukturę, w której jon Spm^{4+} tworzy tylko pojedynczy kontakt z DNA. Postuluje się, że problemy z detekcją poliamin w kryształach B-DNA mogą być wynikiem ruchliwości konformacyjnej sperminy, która nie przyjmuje w kryształach wyraźnego strukturalnie kształtu. Ponadto przyjmuje się, że brak detekcji może być związany z nieobecnością poliaminy w kryształach. Mniejsze problemy z wykryciem cząsteczek sperminy występują w kompleksach z DNA przyjmujących lewoskrętną formę Z lub prawoskrętną formę A. Jest to związane z tym, że formy te wykazują większą gęstość upakowania, zredukowaną ilość wiązanych cząsteczek wody i brak dużych wolnych wnęk w komórce krystalograficznej.



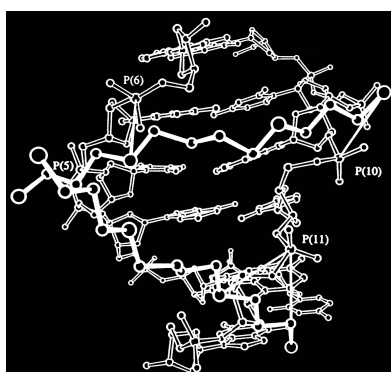
Rys. 8. Struktura antybiotyków z rodziny antracyklin

Antracykliny interkalują w drugorzędowych strukturach DNA, stanowiąc powszechnie używaną grupę chemioterapeutyków. Aktywność biologiczna poliamin, podobnie jak antracyklin, może ujawniać się w oddziaływaniach kompleksów DNA/PA (lub DNA-lek) z innymi czynnikami wiążącymi się do DNA.⁷⁰ Otrzymano trzy struktury krystalograficzne heksameru, w których autorzy zaobserwowali oddziaływanie sperminy z kompleksem antracyklina/ $d(\text{CGATCG})$ (schemat 15). W każdym z kompleksów PA tworzy oddziaływania van der Waalsa z częścią hydrofobową dupleksu: grupą metylową i atomem węgla C6 tyminy (T10), C5 i C6 cytozyny (C11) oraz pierścieniem D antracykliny (atomy węgla C1, C2 i C3). W wyniku tych oddziaływań w rejonie dużej bruzdy obserwowano zredukowaną ilość cząsteczek wody, Bogate w elektrony π pierścienie antracyklin ułatwiają wiązanie się sperminy, która oddziałując, przyjmuje różne konformacje (schemat 14). W wyniku przeprowadzonych badań autorzy zaproponowali dwa modele oddziaływań. Z jednej strony sekwencyjnie specyficzny (PA oddziałuje tylko z jednym rejonem dupleksu), a z drugiej dynamiczny. Spermina może łatwo zmienić konformację przyjmowaną w kompleksie z daunomycyną na konformację obserwowaną dla kompleksu z adriamycyną.



Schemat 14. Schemat oddziaływań sperminy z kompleksami DNA/daunomycyna (A) i DNA/adriamycyna (B).⁷⁰

Zbadano wpływ sperminy na heksamer d(CGGTGG)/d(CCACCG), który jest środkową częścią operatora *gal* operonu.⁷¹ Fragment kwasu nukleinowego zawiera trójki GTG/CAC często występujące w rejonach DNA istotnych dla oddziaływań z białkami. W strukturze krystalograficznej dupleksu zaobserwowano utworzenie nieklasycznego, innego niż parowanie typu Watsona-Cricka, pojedynczego wiązania wodorowego pomiędzy adeniną i tymidyną w rejonie trójki GTG. Obecna w strukturze PA łączy w poprzek małą bruzdę, oddziałując z grupami fosforanowymi sąsiadującymi z 'otwartą' parą zasad. Utworzenie 'klamry' jest możliwe, ponieważ



odległości pomiędzy resztami fosforanowymi przeciwległych nici są krótsze niż w klasycznej helisie B-DNA. Wynikiem specyficznego oddziaływania spermina/DNA jest utrwalenie powstałej alternatywnej konformacji (rysunek). Autorzy podsumowując stwierdzili, że skoro w rejonie kontrolnym, gdzie występuje sekwencja GTG/CAC, spermina wykazuje tendencje do stabilizowania otwartej pary AT, może to prowadzić do ułatwienia rozpoznania sekwencji docelowej DNA przez białka. Dzięki temu PA może służyć jako czynnik sygnalizacyjny

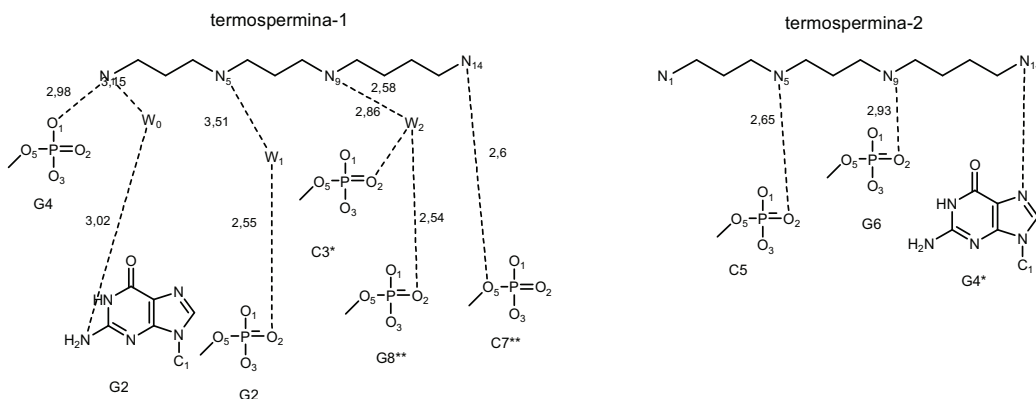
powodując wzrost dokładności działania enzymów restrykcyjnych. Ponadto potwierdzili, że rodzaj oddziaływań poliaminy z DNA zależy od typu struktury drugorzędowej kwasu nukleinowego.^{72,73}

Oddziaływanie z formami A-DNA i Z-DNA

Pierwsze wysokorozdzielcze badania krystalograficzne kompleksu Z-DNA/spermina pozwoliły na wyróżnienie kilku modeli oddziaływań.⁷⁴ Okazało się, że w komórce krystalograficznej kilka cząsteczek Spm⁴⁺ związa się wzdłuż jednej strony rowka neutralizując ujemny ładunek grup fosforanowych. Efekt ten ma zapobiegać silnemu odpychaniu znajdujących się blisko siebie reszt fosforanowych, co mogłoby doprowadzić do destabilizacji dupleksu. Pozostałe cząsteczki sperminy formują mostek przy 'wejściu' do rowka poprzez utworzenie wiązań wodorowych z grupami fosforanowymi z przeciwległych końców nici. Te specyficzne oddziaływania są jedną z przyczyn zwiększonej trwałości dupleksów Z-DNA. W Z-DNA zasady heterocykliczne są znacznie bardziej odsłonięte na działanie innych biomolekuł. Spm⁴⁺ dzięki

rozłożonemu wzdłuż całej cząsteczki systemowi ładunków dodatnich oddziałuje z akceptorami atomów wodoru zasad powodując dalszą stabilizację tej formy DNA.

Analizowano również oddziaływania kompleksu $d(CG)_3$ z termosperminą (T^{Sp}).⁷⁵ W kryształ $d(CG)_3$ przyjmuje konformację Z, z dwiema cząsteczkami T^{Sp} i jednym atomem Mg^{2+} . Mimo, że termospermina różni się od sperminy tylko położeniem jednego atomu azotu to oddziaływania z helisą obu poliamin są różne.

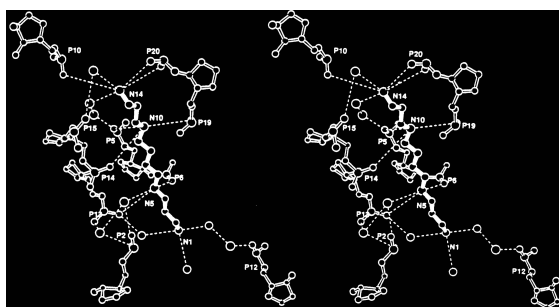


Schemat 15. Schematyczne przedstawienie oddziaływań T^{Sp} z $d(CG)_3$; z uwzględnieniem cząsteczek wody (W).⁷⁵

Pierwsza cząsteczka T^{Sp} lokuje się pomiędzy trzema symetrycznymi dupleksami $d(CG)_3$ podczas gdy spermina, oddziałuje tylko z dwoma.⁷⁰ Druga termospermina wiąże się do pierwotnego dupleksu w małej bruzdzie (schemat 15). Jak sugerują autorzy ten rodzaj oddziaływań może w istotny sposób pełnić rolę ochronną przed hydrolizą oraz zapobiegać rozplataniu się nici w dupleksie.

Wiele poliamin, które tworzą kompleksy z Z-DNA, zidentyfikowano jako linkery łączące dwie autokomplementarne nici lub mostki pomiędzy sąsiednimi dwuniciowymi strukturami.⁷⁶ Wyjątek stanowi kryształ kompleksu $d(CG)_3$ /spermina (otrzymany w temperaturze $-110\text{ }^\circ\text{C}$). W heksamerze, który przyjmuje formę Z-DNA, PA wiąże się do małej bruzdy.⁷⁷ Obecność sperminy wpłynęła na zmianę organizacji cząsteczek wody w małej bruzdzie, osłabiła siły elektrostatycznego odpychania pomiędzy obdarzonymi ujemnym ładunkiem szkieletami cukrowo-fosforanowymi obu nici, co doprowadziło do zwężenia bruzdy i wzrostu trwałości formy Z.

W badaniach oddziaływań autokomplementarnego chimerycznego dupleksu



$r(C)d(CGGCGCCG)r(G)$ ze sperminą, wszystkie cząsteczki rybozy wchodzące w skład oligomeru przyjmując konformację C3'-endo charakterystyczną dla formy A-DNA.⁷⁸ W modelu tym, pięć symetrycznie powiązanych dupleksów otaczało cząsteczkę sperminy, która bezpośrednio oraz za pośrednictwem cząsteczek

wody oddziaływała (rysunek powyżej) z grupami fosforanowymi. Oddziaływania te powodują drastyczne zagięcie dupleksu o 31° w stronę dużej bruzdy w miejscu zajmowanym przez czwartą parę G(4)-C(17) i przesuwają 'arkusz zasad' w stronę małej bruzdy. Ta para zasad razem z sąsiednimi parami pochodzącymi z górnej części dupleksu oraz odpowiednimi nieprawidłowo sparowanymi zasadami z dołu helisy, tworzy cztery małe bruzdy w wyniku wielokrotnego oddziaływania z terminalnymi parami zasad dwóch sąsiednich dupleksów.

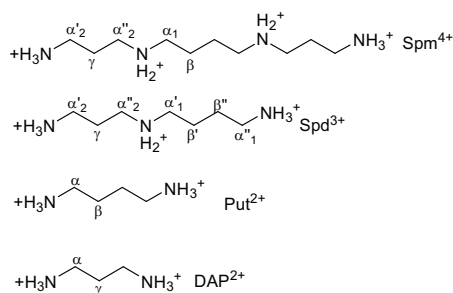
Inne doniesienia zwracają uwagę, że w oktamerze A-DNA d(GTGTACAC) spermina wiąże się na dnie dużej bruzdy, przyjmując konformację w kształcie litery S przez zaadoptowanie konformacji *gauche* wokół wiązań C-N i C-C.⁹⁰

2.4.2 Spektroskopia rezonansu jądrowego

Analiza widm spektroskopii rezonansu jądrowego dodekameru d(CGCGAATTCGCG)₂ ujawniła, że tworzący się dupleks przyjmuje konformację B-DNA. Zaobserwowano również wysoką mobilność zasocjowanej z helisą sperminy.⁷⁹ Częsteczką poliaminy charakteryzuje się dużą ruchliwością konformacyjną w przeciwieństwie do częsteczki dupleksu. Potwierdziły to pomiary efektu NOE (ang. *Nuclear Overhauser Effect*) dla protonów sperminy. Wartość wzmocnienia efektu NOE ma znak dodatni, który jest charakterystyczny dla małych cząsteczek. W związku z tym zaproponowano dwa modele oddziaływań. W pierwszym z nich PA, ze względu na dużą dynamikę strukturalną może przemieszczać się wzdłuż dupleksu pomiędzy specyficznymi miejscami oddziaływań. W drugim modelu nie zajmuje żadnego konkretnego miejsca.

Z drugiej strony badania Banvilla oddziaływań sperminy z heksamerem d(m⁵CG)₃ tworzącym formę Z-DNA, dowodzą mniejszej ruchliwości sperminy w kompleksie z Z-DNA niż z heksamerem B-DNA.⁸⁰ Nie zaobserwowano jednak widocznych sygnałów NOE sugerujących specyficzne oddziaływania z nukleozasadami częsteczki DNA.

Wykorzystując pomiary efektów NOE⁸¹ przebadano oddziaływania dwóch oktamerów DNA d(m⁵CG)₄ i d(GGAATTCC) ze Spm⁴⁺ i Spd³⁺. Okazało się, że roztwór d(m⁵CG)₄ zawiera 50% formy Z-DNA. Wewnątrzcząsteczkowy efekt NOE poliaminowych protonów łańcucha propylenowego posiadał taką samą dodatnią wartość NOE dla oddziaływań z jednym i drugim oligomerem. Natomiast dla łańcucha butylenowego efekt NOE wykazywał nieznacznie większą wartość ujemną dla d(m⁵CG)₄ niż dla drugiego z oligomerów. Przetestowano również całkowicie metylowane analogi sperminy (Me₁₀Spm⁴⁺), spermidyny (Me₈Spd³⁺) oraz 1,3-diaminopropanu (DAP²⁺) i putrescyny (Put²⁺), żeby określić ich zdolność do przekształcania oligomeru d(m⁵CG)₄ z formy B-DNA w formę Z-DNA. W widmach protonowych powstałych kompleksów zaobserwowano, że najwięcej formy Z powstało w wyniku oddziaływań oligomeru ze sperminą.



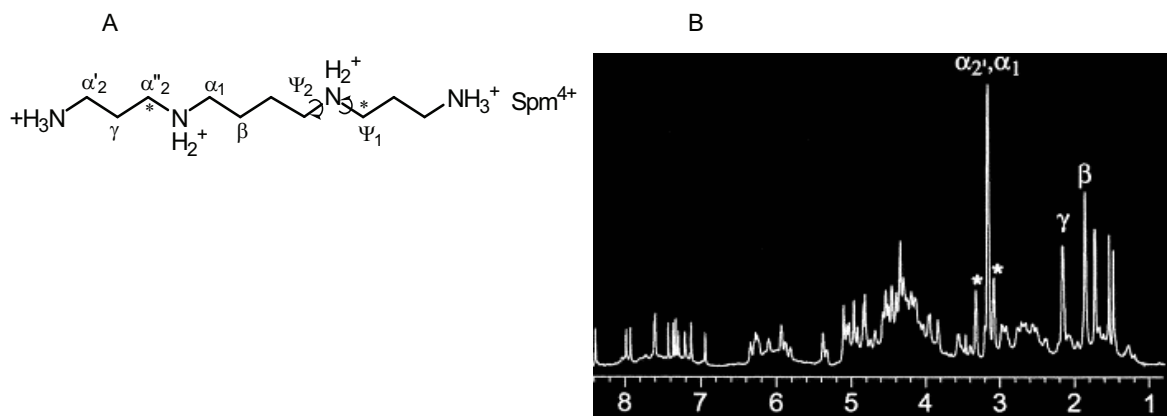
Oligomer	Poliamina	NOE (γ)	NOE (β)	Procentowa zawartość formy Z-DNA
d(m ⁵ GC) ₄	Spd	++	0	45
d(m ⁵ GC) ₄	Spm	-	----	57
d(GGAATTCC)	Spd	++	+	
d(GGAATTCC)	Spm	-	---	

Rys. 9. Struktura badanych poliamin; wewnątrzcząsteczkowy efekt NOE PA z dwoma różnymi dupleksami.⁸¹

Autorzy potwierdzili wcześniejsze eksperymenty, z których wynikało, że ze względu na mniejsze odległości pomiędzy grupami fosforanowymi w formie Z-DNA (8 Å) niż w B-DNA (ok. 12 Å), spermina przyjmie kształt przypominający literę S lub Z, a jej łańcuch butylenowy będzie wykazywał mniejszą ruchliwość konformacyjną.^{83,84} Potwierdzili również, że występowanie łańcucha butylenowego w strukturze cząsteczki poliaminy jest istotne dla indukowania przejść formy B w formę Z.

Keniry⁸² wykorzystując techniki spektroskopowe, przeprowadził badania znakowanej ¹³C sperminy i jej interakcje z dupleksem i kwadrupleksem DNA. W różnicowym widmie 1D NOE zaobserwował słaby wewnątrzcząsteczkowy dodatni efekt NOE dla protonów sperminy tworzącej kompleksy z dupleksem d(ATGCAT)₂ lub kwadrupleksem d(TG₄T)₄, złożonym z czterech nici oligonukleotydowych. Z drugiej strony, uzyskał ujemny efekt NOE dla protonów sperminy w kompleksach tworzonych przez poliaminę z dwuniciowym [d(G₄T₄G₄)₂] i jednociowym kwadrupleksem, zawierającym pętle T₄ (ang. *two-stranded diagonally looped folded quadruplex*). Wartość jądrowego efektu Overhausera sugeruje stosunkowo duże 'unieruchomienie' cząsteczki sperminy. Zaobserwowane wydłużenie czasu korelacji powstałego kompleksu z poliaminą w stosunku do samego DNA może być związane z dłuższym czasem 'przebywania' sperminy w miejscach wiązania i jest potwierdzeniem konformacyjnego usztywnienia łańcucha poliaminy. W związku z tym, że analiza widm kwadrupleksu złożonego z czterech nici oligonukleotydowych wskazywała tylko niski stopień asocjacji z PA autor postulował, biorąc pod uwagę również inne dane ekperymentalne, że spermina może preferencyjnie wiązać się do jednej z reszt tyminowych, wchodzącej w skład pętli w jednociowym lub dwuniciowym kwadrupleksie. Nie wykluczał jednak wpływu struktury drugorzędowej DNA na stopień oddziaływań z poliaminą. Z innych badań wiadomo, że na stopień asocjacji sperminy z DNA ma wpływ szerokość rowków helisy, jak również bliskość sąsiadujących grup fosforanowych.⁸¹ W kwadrupleksie d(TG₄T)₄ wyróżniamy cztery bruzdy równej wielkości, natomiast w kwadrupleksie [d(G₄T₄G₄)₂] trzy bruzdy różnej wielkości (pierwszą szeroką, drugą średnią i ostatnią wąską).⁸² Bruzda średniej wielkości jest miejscem, do którego wykazują powinowactwo kationy wielowartościowe (obdarzone wielokrotnym ładunkiem). W widmie 2D NOESY sygnały korelacyjne pomiędzy protonami cząsteczki sperminy wskazują na różnice w wartościach przesunięć chemicznych protonów metylenowych β i γ. W kompleksie PA z kwadrupleksem złożonym z czterech nici wartości

przesunięć chemicznych protonów metylenowych β i γ są takie same. Może to być dowodem na to, że jedno lub oba wiązania C-N pomiędzy grupami metylenowymi α_2 i β (wyznaczone przez kąty rotacji Ψ_1 i Ψ_2) (rys. 10) przyjmują konformację *gauche*, jak to było proponowane w modelu Liquori'ego⁸³ i/lub grupa diaminobutylenowa z grupami metylowymi β ma mniejszą ruchliwość konformacyjną niż łańcuchy aminopropylenowe z grupami metylowymi α i γ .



Rys. 10. (A) Selektywnie wyznakowana $[1',1''\text{-}^{13}\text{C}_2]$ spermina; (B) widmo ^1H NMR kompleksu $[1',1''\text{-}^{13}\text{C}_2]$ sperminy z $[\text{d}(\text{G}_4\text{T}_4\text{G}_4)]_2$ w stosunku 1:1.⁸²

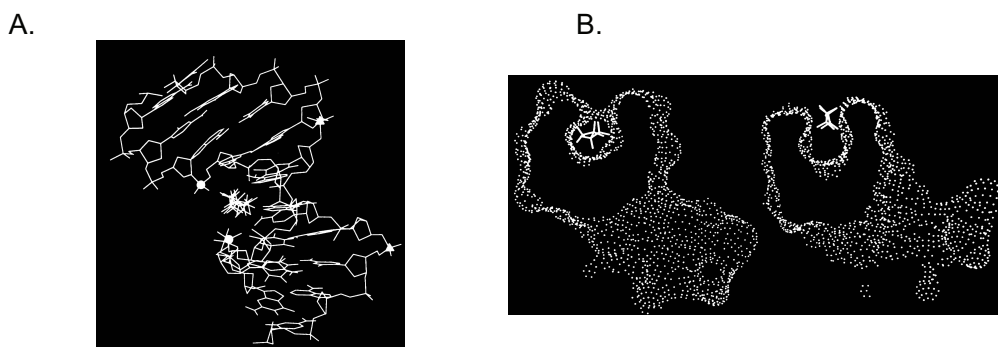
Autor podsumowując stwierdza, że spermina nie oddziałuje z DNA przypadkowo. Sposób interakcji może być związany z konformacją cząsteczki DNA. Otrzymane wyniki mogą wpłynąć na lepsze zrozumienie ekspresji genów zwłaszcza roli G-kwadrupleksów w rejonie promotorowym onkogenu *c-myc*, który jest transaktywatorem dekarboksylazy ornitynowej.⁸²

2.4.3 Modelowanie molekularne

W badaniach teoretycznych oddziaływań PA/kwas nukleinowy najlepiej znanym modelem cząsteczkowym jest kompleks Spm/ B-DNA, zaproponowany przez Liquori'ego i Suwalsky'ego.^{83,84} W modelu Liquori'ego spermina łączy małą bruzdę w B-DNA. Ramię propylenowe skierowane jest w kierunku $5' \rightarrow 3'$ przeciwnych nici, grupy aminowe oddziałują tylko z resztami fosforanowymi szkieletu DNA. Jeżeli szkielet helisy DNA jest w pozycji poziomej w stosunku do cząsteczki poliaminy, to oddziałująca z nią spermina przyjmuje kształt litery S (model S). Natomiast Suwalsky i współpracownicy zaproponowali model, w którym ramię propylenowe powinno być skierowane w kierunku $3' \rightarrow 5'$, wówczas spermina przybiera kształt litery Z (model Z).⁸⁴

Kolejny model zaproponowany przez Zakrzewską i Pullmana dla dodekameru $\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})$ postuluje najkorzystniejsze ulokowanie sperminy w centrum małej bruzdy.⁸⁵ Z drugiej strony, Feuerstein, wykorzystując obliczenia kwantowo mechaniczne, zaproponował model, w którym spermina, przyjmując konformację *trans* łączy dwie komplementarne nici w poprzek dużej bruzdy dupleksu $\text{d}(\text{GC})_3$.⁸⁶ Ta sama grupa badawcza, dla sekwencji homopolimerycznej $\text{d}(\text{G})_{10}\text{-d}(\text{C})_{10}$ i polipuryno/pirymidynowych $\text{d}(\text{AC})_5\text{-d}(\text{GT})_5$ oraz

$d(AT)_5-d(AT)_5$, ustaliła zależność sekwencyjną wiązania sperminy oraz jej wpływ na strukturę dupleksu (rys. 11). Okazało się, że w przypadku sekwencji mieszanej poliamina wykazuje większe powinowactwo w stosunku do dużej bruzdy. W konsekwencji dochodzi do ‘zamknięcia’ sperminy przez zmniejszenie rozmiaru bruzdy i zgięcia dupleksu, mała bruzda ulega poszerzeniu (rys. 11 A). Według autorów, jeżeli sekwencja wpływa na dynamikę strukturalną DNA, to również na siłę oddziaływań ligand/kwas nukleinowy. Mniej uprzywilejowanym miejscem oddziaływań jest dno małej bruzdy (rys. 11 B), najbardziej niekorzystnym – wejście do małej bruzdy (rys. 11 B).



Rys. 11. (A) Sekwencja mieszana $d(AC)_5-d(GT)_5/Spm^{4+}$ – zgięcie dupleksu; (B) Oddziaływania w małej bruzdzie $d(AT)_5-d(AT)_5$ - spermina lokuje się na dnie bruzdy (po lewej); $d(AC)_5-d(GT)_5$ – spermina lokuje się u wejścia do bruzdy (po prawej).

Podejmowano próby udowodnienia zależności specyficzności interakcji PA od sekwencji DNA.⁸⁷ Otrzymano struktury dwuniciowe, w których każdy z oligonukleotydów zawierał jedną parę GC i przeprowadzono symulację komputerową w celu określenia potencjalnych miejsc wiązania się sperminy w dupleksach DNA bogatych w pary GC. Wyniki nie potwierdzają jednoznacznego wiązania do konkretnego miejsca, sugerują raczej, że spermina ‘poszukuje’ rejonów bogatych w pary GC, wykazując w stosunku do nich większe powinowactwo. Zwłaszcza do dużej bruzdy, której obszar jest zajęty przez bogate w elektrony pierścienie imidazolowe i pary niewiążące atomów tlenu reszt guaninowych. Autorzy proponują dwa sposoby oddziaływań, pierwszy poprzez kontakty tylko z zasadami, drugi przez kontakty z zasadami i grupami fosforanowymi.⁸⁷ Jednak według autorów, za pomocą eksperymentów, nie ma możliwości rozróżnienia i potwierdzenia obu typów oddziaływań. Utrudnieniem jest zmienność konformacyjna sperminy w rejonach par GC. Z jednej strony symulacje w fazie gazowej sugerują, że pierwszorzędowe atomy azotu PA oddziałują z grupami fosforanowymi, z drugiej strony symulacje systemów w pełni solwatowanych wskazują, że poliamina przyjmuje kształt litery, U co eliminuje oddziaływania terminalnych grup aminowych z fosforanami.

Korolev i współpracownicy zauważyli, że obecność Spm^{4+} ma znaczący wpływ na liczbę cząsteczek wody pierwszej warstwy hydratacyjnej DNA oraz na oddziaływania jonów Na^+ z DNA.^{88,89} Spermina wypycha cząsteczki wody na zewnątrz małej bruzdy, podczas gdy jony sodu przyciągają i organizują warstwę hydratacyjną wokół DNA.



A. Widok z przodu małej bruzdy

B. Widok wzdłuż małej bruzdy

Rys. 12. Region preferencyjnego wiązania sperminy do dekameru DNA.

W obecności jonów sodu struktura DNA jest silnie hydratowana. Obecność PA powoduje (jej hydrofobowy łańcuch metylenowy oddziałuje z DNA) uwolnienie części cząsteczek wody z miejsc bogatych w elektrony. Główne miejsca wiązania grup aminowych Spm^{4+} i jonów sodu znajdują się w szkielecie fosforanowym. Mimo, że zarejestrowano obecność sperminy w małej bruzdzie, to ze względu na dużą mobilność nie tworzy ona trwałych i strukturalnie zdefiniowanych kompleksów. Ponadto jony sodu współzawodniczą ze Spm^{4+} by wiązać się z zasadami heterocyklicznymi w małej bruzdzie.

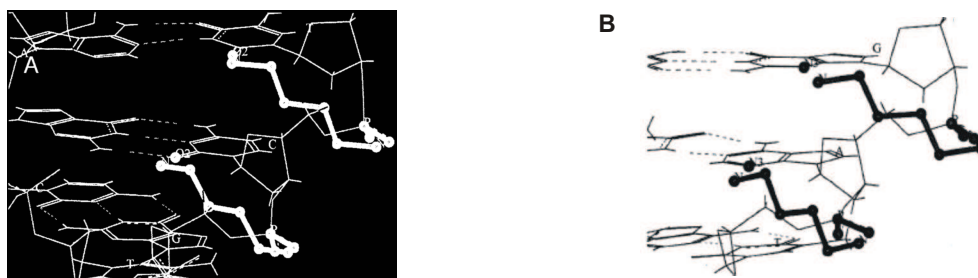
Podsumowując, autorzy stwierdzają, że głównymi miejscami wiązania obdarzonych ładunkiem grup aminowych Spm^{4+} są atomy fosforu O1-P i O2-P (rys. 12). Ponadto, długa poliamina tworzy liczne mostki pomiędzy sąsiednimi dupleksami DNA w poprzek małej i dużej bruzdy każdej podwójnej helisy. Dwa obszary małej bruzdy dekameru wskazują na obecność cząsteczek sperminy. W pierwszym zwarta, która nie przyjmuje trwale żadnej z konformacji, poliamina oddziałuje w regionie A5-C8/G12-T15 (rys. 12 B) wzdłuż małej bruzdy. W drugim, warstwa cząsteczek sperminy pokrywa szkielet cukrowo fosforanowy wzdłuż sekwencji G16-C17-A18 od strony małej bruzdy (rys. 12 A). Nie zaobserwowano również, jakichkolwiek oddziaływań sperminy z zasadami heterocyklicznymi wchodzącymi w skład dużej bruzdy.

2.4.4 Spektroskopia Ramana

Rezonansowa Spektroskopia Ramana (RRS) odgrywa współcześnie ważną rolę w poznawaniu i badaniu struktur cząsteczek chemicznych, szczególnie tych o dużych rozmiarach, takich jak białka czy DNA. Dzięki niskiemu poziomowi detekcji, pozwalającemu na rejestrację niewielkich zmian strukturalnych (szybkie zmiany konformacyjne) spektroskopia Ramana znajduje zastosowanie w badaniach dynamiki procesów enzymatycznych, oddychania komórkowego, czy oddziaływań biopolimerów z małymi cząsteczkami. Technika ta jest udoskonaleniem i rozwinięciem techniki spektroskopii rozproszeniowej Ramana, oraz uzupełnieniem techniki spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (IR).

Dzięki wykorzystaniu techniki RRS z transformacją Fouriera został zaproponowany model oddziaływań biogennych poliamin z DNA.⁹¹ Na podstawie dokonanych obserwacji autorzy stwierdzają, że charakter oddziaływań poliamina-DNA nie opiera się wyłącznie na oddziaływaniach elektrostatycznych. Uzyskane widma kompleksu putrescyny z dwuniciową

cząsteczką DNA wskazują na preferencyjne wiązanie się poliaminy w małej bruzdzie. W zaproponowanym modelu widoczne są oddziaływania pomiędzy grupą NH_3^+ aminy a grupami fosforanowymi jak również z atomami tlenu grup karbonylowych O2-Thy lub O2-Cyt (po utworzeniu kompleksu z poliaminą następuje zmiana w obszarze widmowym grup karbonylowych tymidyny i cytydyny: zanik pasma 1669 cm^{-1} oraz wzrost intensywności pasma przy liczbie falowej 772 cm^{-1} (rys. 13 A). Obdarzona ładunkiem dodatnim grupa aminowa tworzy również wiązania wodorowe z atomem azotu N3 należącym do reszty guaniny lub adeniny (rys. 13 B). Ponadto zaobserwowano oddziaływania hydrofobowe pomiędzy szkieletem węglowym putrescyny a grupą 5'-metylenową deoksyrybozy.



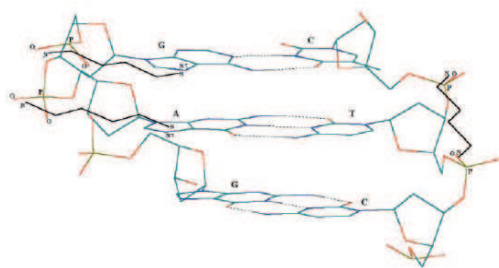
Rys. 13. Proponowany model oddziaływań pomiędzy putrescyną a DNA.⁹¹

Na rysunku 13 można zauważyć, że w proponowanych modelach putrescyna oddziałuje z DNA wyłącznie w obrębie jednej nici, co może mieć istotny wpływ na jej właściwości ochronne DNA. Zwiększoną tendencją do oddziaływań w małej bruzdzie charakteryzuje się również spermidyna. Jednakże oprócz oddziaływań terminalnej grupy aminowej z grupami fosforanowymi zaobserwowano interakcje z komplementarnymi nićmi (O2-pirymidyny jednej i N3-puryny drugiej nici). Propozycja oddziaływań pomiędzy sperminą a DNA obejmuje dwa modele, które jednoznacznie wskazują, że miejscem wiązania się tej PA jest duża bruzda. W pierwszym z nich spermina lokuje się w poprzek bruzdy. Potwierdzają to obserwowane układy pasm absorpcyjnych przy 1488 cm^{-1} dla atomu azotu N7-Gua i 1669 cm^{-1} dla karbonylowego tlenu O2-Thy (rys.14 A) oraz widoczne oddziaływania terminalnych NH_3^+ z dwiema grupami fosforanowymi należącymi do przeciwnych nici. Oddziaływanie spermidyny i sperminy z obiema nićmi DNA może tłumaczyć ich zdolność do ochrony DNA przed działaniem wolnych rodników.



Rys. 14. Proponowane modele oddziaływań sperminy z DNA.⁹¹

W drugim modelu (rys. 14 B) cząsteczka sperminy powoduje neutralizację grup fosforanowych i oddziałuje z purynowymi atomami azotu (N7) stanowiącymi część jednej z nici DNA. Autorzy sugerują, że poliamina oddziałując w obszarze tylko jednej z nici może obniżyć swoje działanie antyoksydacyjne. W kolejnych badaniach^{92,93} wysunięto hipotezę, że oddziaływania poliamin z kwasami nukleinowymi mają charakter specyficzny. Badając wpływ poliamin na właściwości oligomerów bogatych w pary GC⁹² zaobserwowano częściową zmianę konformacji dupleksu, która powodowała indukowanie przejścia od formy B-DNA do Z-DNA. W przypadku dupleksów bogatych w pary AT⁹³ stwierdzono oddziaływania z obiema bruzdami i brak jakichkolwiek zmian w strukturze drugo- lub czwartorzędowej DNA. Eksperymenty te potwierdzają różnorodność funkcji, jakie spełniają regiony AT i GC w komórce. O ile regiony AT zaangażowane są w etapy inicjujące syntezę dużych makrocząsteczek⁹¹⁻⁹³, o tyle z regionami GC jest związany stopień upakowania DNA.⁹¹⁻⁹³



Rys. 15. Model oddziaływań putrescyna – DNA⁹⁴

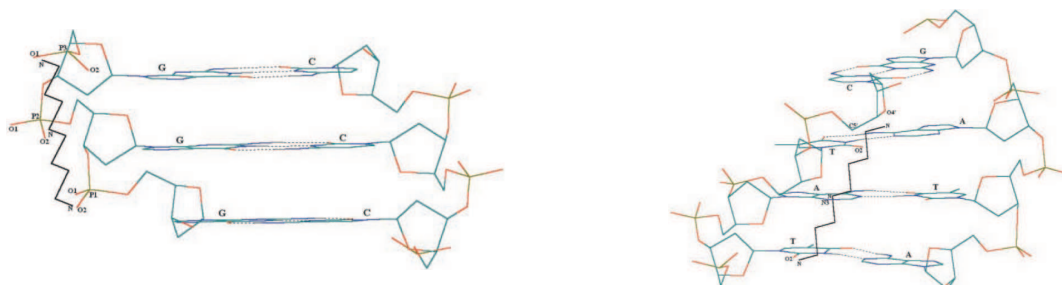
Wynik ten kontrastuje z wnioskami płynącymi z innej pracy, w której po przebadaniu czterech genomów DNA o różnej zawartości par GC (*Micrococcus luteus* 72% GC, *Escherichia coli* 50% GC, *calf thymus* 42% GC i *Clostridium perfringens* 27% GC) ustalono mechanizm niespecyficznego wiązania się poliamin z dupleksem.⁹⁴ Obniżenie intensywności pasm absorpcyjnych charakterystycznych dla grup fosforanowych (785 cm^{-1} i 1090 cm^{-1}) jest

konsekwencją oddziaływań polikationów ulokowanych wzdłuż szkieletu fosforanowego helisy DNA. Dane te potwierdzają wcześniejsze eksperymenty, w których indukowanie tworzenia skondensowanej struktury DNA przez poliaminy kierowane jest niespecyficznymi oddziaływaniami elektrostatycznymi.⁹⁴ Oddziaływaniom PA z fosforanami towarzyszą zmiany w dużej bruzdzie. Wskazują na to przesunięcia pasma absorpcyjnego guaniny (1485 cm^{-1}) w stronę niższych częstotliwości w DNA bogatych w GC i spadek intensywności pasma tyminy (1375 cm^{-1}) dla genomów DNA bogatych w pary AT. W przeciwieństwie do badań Ramirez autorzy postulują, że oddziaływania PA ze szkieletem fosforanowym są bardziej prawdopodobne niż z dużą bruzdą (N7-Gua i CH₃-Thy).⁹¹ Nieznaczna zależność wiązania się poliamin z genomowymi DNA o różnym składzie zasad sugeruje, że sekwencja odgrywa drugorzędną rolę. W żadnym z przebadanych DNA nie znaleziono dowodów na istnienie przejść konformacyjnych formy B w formę A lub B w Z. Autorzy stwierdzają, że zdolność spermidyny i sperminy do wiązania się i kondensacji genomowego DNA związane jest raczej z utwaleniem natywnej formy B-DNA. Poliaminy w przeciwieństwie do jonów metali oddziałują bezpośrednio ze szkieletem fosforanowym, nie zakłócając parowania zasad i oddziaływań warstwowych, w rezultacie zabezpieczają i stabilizują dupleks.

Na podstawie widm FTIR⁹⁵ przeanalizowano prawdopodobne miejsca oddziaływań PA z DNA, zwracając uwagę na wewnątrzcząsteczkowe odległości pomiędzy grupami funkcyjnymi

helisy oraz najbardziej uprzywilejowaną konformację poliamin (wszystkie kąty torsyjne w pozycji *trans*). Widma absorpcyjne kompleksów Put²⁺/DNA i Spd³⁺/DNA wskazują, na możliwość oddziaływań z dużą i małą bruzdą w zależności od stężenia poliaminy. W dużej bruzdzie znajdują się bogate w elektrony atomy azotu N7 guaniny i adeniny. Miejsce jest wolne od napięć sterycznych i wiązań wodorowych typu Watsona –Cricka. Odległość do najbliższego atomu tlenu grupy fosforanowej wynosi około 6,36 Å i 6,47 Å. Maksymalna odległość pomiędzy terminalnymi atomami azotu w cząsteczce putrescyny wynosi 6,23 Å. Autorzy proponują model (rys. 15), w którym jedna z grup NH₃⁺ Put tworzy wiązania wodorowe z resztą fosforanową a druga grupa NH₃⁺ z imidazolowym atomem azotu puryny. W drugim z przedstawionych modeli terminalna grupa aminowa, oddziałuje w małej bruzdzie z atomami tlenu O2 reszt tymidynowych oraz grupami fosforanowymi leżącymi w obrębie jednej nici. Postulowane modele wykluczają możliwość tworzenia wiązań z ugrupowaniami należącymi do obu nici DNA. Spermidyna zawiera w swojej strukturze dwie terminalne grupy NH₃⁺ i jedną -NH₂⁺- oddzielone odpowiednio łańcuchem propyleno- i butylenowym. Przyjmując konformację o najniższej energii odległość pomiędzy terminalnymi N₁-N₁₀ w cząsteczce wynosi 11,2 Å. Taka budowa umożliwia PA oddziaływania w obszarze obu nici.

W zaproponowanych modelach spermidyna może oddziaływać z atomami tlenu trzech sąsiednich grup fosforanowych leżących w odległości 11,9 Å od siebie (rys. 16 A).



Rys. 16. Modele oddziaływań spermidyna – DNA.⁹⁵

Obie terminalne grupy aminowe mogą tworzyć wiązania wodorowe z akceptorowymi atomami azotu N7 zasad purynowych i atomem tlenu grupy fosforanowej wchodzącymi w skład dużej bruzdy. W modelu, w którym spermidyna umieszczona jest w małej bruzdzie, autorzy proponują zarówno oddziaływania elektrostatyczne (-NH₃⁺ z O2-tyminy i O4-deoksurybozy; -NH₂⁺ z N3-adeniny) jak i hydrofobowe z grupą 5'- metylenową deoksurybozy (rys. 16 B).

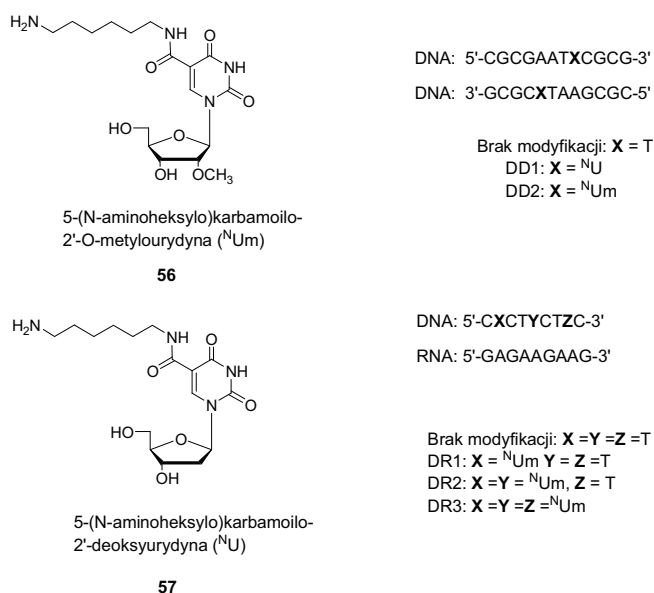
Wnioski płynące z analiza widm oscylacyjnych kompleksu spermina – DNA potwierdziły modele oddziaływań proponowane w pracach Ramirez.⁹¹⁻⁹³ Wykazano, że spermina charakteryzuje się większą tendencją do oddziaływań z ugrupowaniami leżącymi w dużej bruzdzie, a tworzenie mostków pomiędzy grupami fosforanowymi należącymi do przeciwnych nici może zachodzić pomiędzy atomami należącymi zarówno do dużej jak i małej bruzdy.

2.5 Oddziaływania poliamin kowalencyjnie związanych z kwasami nukleinowymi

W wielu pracach poruszane jest zagadnienie specyfiki oddziaływań kompleksów poliamin z kwasami nukleinowymi.⁶⁷⁻⁹⁵ Brak jednak badań mających na celu ustalenie swoistości oddziaływań poliaminooligonukleotydów z DNA lub RNA. Jedyne opublikowane prace dotyczą prostych modyfikacji o charakterze alkilowym z terminalną grupą aminową włączonych do łańcuchów kwasów deoksy- i rybonukleinowych.⁹⁶⁻⁹⁸

Konformacja DNA jest kontrolowana przez wiele czynników, takich jak wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa, elektrostatyczne odpychanie grup fosforanowych oraz ilość związanych cząsteczek wody. Każda włączona modyfikacja zaburza ten system powodując zmiany topologiczne. Selekttywne włączenie do jednostek nukleotydowych cząsteczek obdarzonych dodatnim ładunkiem może wpływać nie tylko na neutralizację ładunków w grupach fosforanowych, a analiza tego typu struktur może być wstępem do zaproponowania modelu przybliżającego nas do zrozumienia natury oddziaływań, poliamina – kwas nukleinowy.

Otrzymano struktury krystalograficzne dupleksów DNA:DNA modyfikowanych 5-(N-aminoheksylo)karbamoilo-2'-deoksyurydyną (**57**) oraz hybryd DNA:RNA modyfikowanych 5-(N-aminoheksylo)karbamoilo-2'-O-metylourydyną (**56**) (rys. 17 A). Analiza danych rentgenograficznych miała na celu znalezienie korelacji pomiędzy zmianami konformacyjnymi modyfikowanych dupleksów a ich funkcjami biologicznymi zwłaszcza powinowactwem do wiązania z innymi makrocząsteczkami i odpornością na działanie nukleaz.⁹⁶

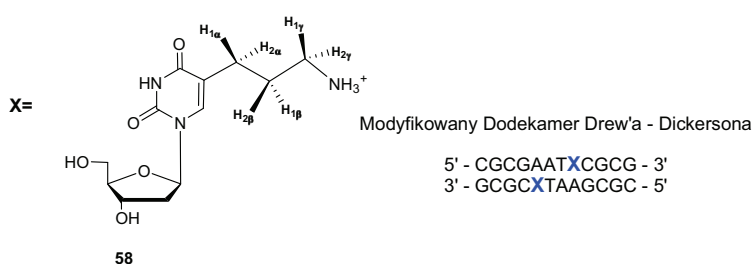


Rys. 17. Struktura modyfikowanych analogów nukleozydów (po lewej); sekwencje i miejsca modyfikacji (po prawej).

We wszystkich modyfikowanych resztach ugrupowanie karbamoilowe przyjmuje konformację *syn* w stosunku do karbonylowego tlenu O4 modyfikowanej urydyny. Taka

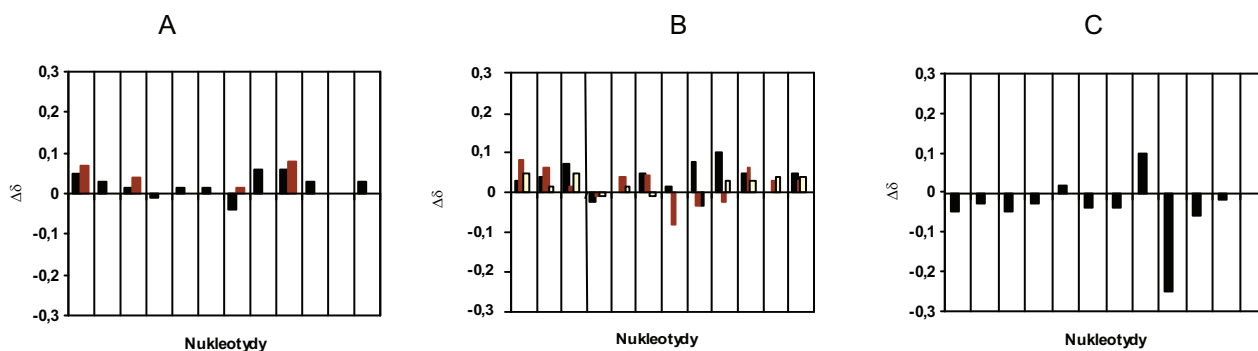
konformacja grupy karbamoilowej wymusza skierowanie łańcucha heksametylenowego w stronę dużej bruzdy helisy DNA. Dodatkowo duża mobilność konformacyjna łańcucha umożliwia oddziaływanie grupy NH_3^+ z resztami należącymi do tej samej nici, do nici przeciwnej jak również z sąsiednim dupleksem oraz cząsteczkami rozpuszczalnika. Oddziaływania, które mają miejsce pomiędzy łańcuchem aminoheksametylenowym i szkieletem fosforanowym wpływają na neutralizację ładunków szkieletu, co może tłumaczyć duże powinowactwo tych modyfikacji do docelowych kwasów nukleinowych. Z danych termodynamicznych wynika, że w przypadku zmodyfikowania pozycji 8 w jednej nici i 20 w nici komplementarnej (rys. 17 B, dupleks DD2) pierścień rybozy $^N\text{U}_m$ przyjmuje konformację *C3'-endo* typową dla formy A-DNA. Autorzy sugerują, że zmiana geometrii szkieletu helisy jest powodem obniżenia temperatury topnienia i związanego z tym efektu destabilizującego. Dzięki temu, że oligonukleotydy z resztami ^NU tworzą dupleksy (rys. 17 B dupleks DD1) przyjmujące konformację prawoskrętnej formy B-DNA, mogą być wykorzystane w terapii antygenowej, ponieważ nie obniżają powinowactwa modyfikowanej nici do wiązania się z docelowym DNA. W badanych oligonukleotydach serii rybo, reszty cukrowe przyjmują konformacje charakterystyczne dla formy A-RNA i w konsekwencji mogą być substratami w terapii antysensowej. Ponadto wprowadzenie w duplesie DD2 modyfikacji 2'-O-metylowej zmienia zarówno wielkość małej bruzdy helisy jak i jej warstwę hydratacyjną. Zmiany te mają wpływ na odporność nukleazową dupleksów. Modyfikacja w pozycji 2'-rybozy tworzy zawadę przestrzenną, w konsekwencji mała bruzda ulega poszerzeniu, co wpływa na obniżenie powinowactwa nukleaz do wiązania się do szkieletu fosforanowego.

Li i współpracownicy przeprowadzili badania wykorzystujące technikę spektroskopii rezonansu jądrowego, mające na celu określenie sposobu oddziaływań pomiędzy dodatnio naładowanymi łańcuchami aminopropylowymi kowalencyjnie związanymi w duplesie DNA i ich wpływ na strukturę kwasu nukleinowego (rys. 18).⁹⁷



Rys. 18. Struktura modyfikowanego nukleozydu i modyfikowana sekwencja

Analiza widm 2D NOESY duplesu DNA pozwoliła na zidentyfikowanie 19 dodatkowych sygnałów, które są wynikiem oddziaływań pomiędzy łańcuchem aminoalkilowym a DNA. Potwierdzono również, że oddziaływania te nie zaburzają parowania zasad typu Watsona-Cricka, a cząsteczka DNA przyjmuje prawoskrętną formę B.



A – protony dużej bruzdy (czarny H8-Gua/Ade lub H6 Cyt/Thy; bordowy H5-Cyt lub CH₃-Thy)

B – protony małej bruzdy (czarny H1'; bordowy H2'; żółty H2'')

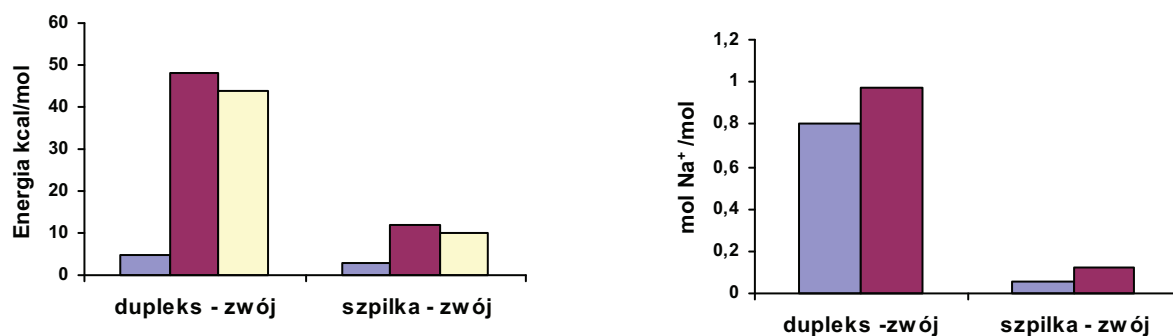
C – atomy fosforu

$$\Delta\delta = [\delta_{\text{oligonukleotyd modyfikowany}} - \delta_{\text{oligonukleotyd niemodyfikowany}}] \text{ (ppm)}$$

Rys. 19. Różnice przesunięć chemicznych protonów dupleksów w kompleksie ze sperminą i bez poliaminy.

Zróznicowanie widm modyfikowanego i niemodyfikowanego dupleksu dotyczy głównie protonów pochodzących od samej modyfikacji (rys. 19). Nieznaczny wzrost trwałości modyfikowanego DNA wynika z braku dodatkowych oddziaływań pomiędzy łańcuchem aminoalkilowym a kwasem nukleinowym. W efekcie zaobserwowano tylko niewielkie różnice w przesunięciach chemicznych protonów wchodzących w skład obu dupleksów. Z wykonanych widm 2D NOESY wynika, że wprowadzony łańcuch umiejscowiony jest na dnie dużej bruzdy z grupą ω-aminową skierowaną w kierunku 3' od miejsca modyfikacji. Dowodem takiej orientacji łańcucha jest zmiana przesunięcia atomu fosforu tworzącego pierwsze wiązanie fosfodiesterowe pomiędzy modyfikowanym nukleozydem a sąsiednią resztą C9 (rys. 19 D). Modelowanie molekularne oraz zmiany przesunięć w widmie ³¹P NMR pomiędzy C9-G10 wskazują, że obdarzona ładunkiem dodatnim grupa aminowa oddziałuje z atomem tlenu O6 reszty guaniny w parze C3-G10 powodując lokalne zmiany konformacji helisy. Obserwacje te zostały poparte badaniami 'odcisku palca' (ang. *fingerprinting*), w których w wyniku wprowadzenia alkilowej modyfikacji selektywnie zatrzymano w kierunku 3' metylowanie N7 guaniny przez N-metylo-N-nitrozomocznik (MNU).⁷

W innym laboratorium wykonano analizę termodynamiczną tego samego dupleksu modyfikowanego dwiema resztami 3-aminopropylo-2'-deoksyurydyny (rys. 18).⁹⁸ W badaniach tych autorzy pokazali, że modyfikacje są przyczyną lokalnych zmian w strukturze dupleksu, a także obniżenia jego trwałości. Umieszczenie łańcucha kationowego wywiera efekt destabilizacyjny głównie ze względu na widoczną redukcję udziału oddziaływań warstwowych pomiędzy parami zasad i zmianę ilości wiązanych cząsteczek wody w modyfikowanym duplesie.



Wykres 2. Dane termodynamiczne dupleksu i spinki zawierających włączony łańcuch kationowy. Po lewej dane termodynamiczne (niebieski $\Delta\Delta G^\circ$, bordowy $\Delta\Delta H$, żółty $\Delta(T\Delta S)$); po prawej wiązanie się jonów i cząsteczek wody (niebieski $\Delta\Delta n_{Na^+}$, bordowy $\Delta\Delta n_W$).

Zdaniem autorów, zmiany te są wynikiem usunięcia cząsteczek wody, z obszarów zajmowanych przez obdarzone ładunkiem grupy funkcyjne aminy i unieruchomienia wody strukturalnej (cząsteczki wody otaczające polarne i niepolarne grupy). Wszystkie wyniki są zgodne z badaniami NMR modyfikowanego dupleksu oraz ukazują lokalne deformacje strukturalne w każdym miejscu modyfikacji.

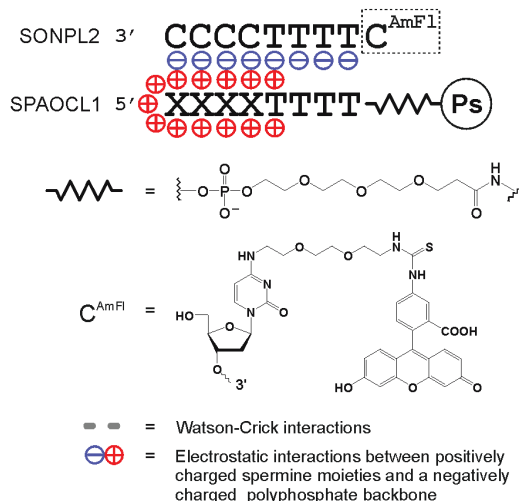
3. BADANIA WŁASNE

3.1 Miejsce modyfikacji poliaminowej a trwałość struktury dupleksu DNA — — analiza termodynamiczna

Znajomość właściwości termodynamicznych kwasów nukleinowych pozwala ustalić wewnątrz- i międzycząsteczkowe oddziaływania ważne dla drugorzędowej struktury DNA lub RNA. Badając oddziaływania poliamin z kwasami nukleinowymi wykazano ich rolę w stabilizacji struktur dwu- i trójniciowych. PA zwiększają również trwałość syntetycznych DNA o anomalnych sekwencjach, sekwencjach z niesparowaniami oraz 'podnoszą' temperaturę topnienia (T_m) dupleksów z wybrzuszeniami i struktur typu szpilki do włosów. W literaturze opisano również efekt stabilizacyjny oraz destabilizacyjny poliaminooligonukleotydów w strukturach dupleksowych i trypleksowych^{40-43,45,51}. Oddziaływania poliamina-kwas nukleinowy zależą od kilku czynników. Jednym z najistotniejszych jest struktura poliaminy, czyli długość łańcuchów alkilowych oraz liczba grup aminowych. W przypadku poliaminooligonukleotydów należy brać pod uwagę liczbę modyfikowanych jednostek włączonych do nici kwasu nukleinowego oraz miejsce ich usytuowania.

W Pracowni Chemii Biokoniugatów IChB PAN od lat prowadzone są badania właściwości fizykochemicznych poliaminooligonukleotydów. Przemysław Godzina w swojej pracy doktorskiej¹⁰⁰ zmodyfikował syntezę poliaminooligonukleotydów oraz przeprowadził wstępną analizę właściwości modyfikowanych oligomerów z wykorzystaniem bibliotek kombinatorycznych. Zaobserwował między innymi wzrost powinowactwa poliaminooligonukleotydu do komplementarnej jednostki kwasu nukleinowego. W tych samych warunkach eksperymentalnych (0,1 M NaCl, 5% formamid) przeprowadził reakcję hybrydyzacji biblioteki oligonukleotydowej i poliaminooligonukleotydowej z komplementarną sondą molekularną. Okazało się, że tworzenie struktury dwuniciowej miało miejsce tylko w przypadku hybrydyzacji z poliaminooligonukleotydami. W kolejnym eksperymencie zastosował niekomplementarną sondę oligonukleotydową. Pozwoliło to oszacować udział oddziaływań niespecyficznych, tzn. takich, które prowadziły do tworzenia się kompleksów bez uczestnictwa komplementarnych par zasad (rys. 20). Możliwymi czynnikami powodującymi tworzenie się kompleksu były oddziaływania elektrostatyczne obdarzonych dodatnim ładunkiem łańcuchów poliaminy z ujemnymi ładunkami szkieletu fosforocukrowego. Zaobserwował również obniżenie trwałości niektórych kompleksów tworzonych przez oktamer kombinatorycznej biblioteki ($XXXXT_4$; $X=dC/dC^{Sp}$) z komplementarną sondą w roztworze o wysokim stężeniu soli. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań DNA o charakterze poliakcyjnym.¹⁰¹ Przemysław Godzina stwierdził, że powinowactwo

poliaminooligonukleotydu do niemodyfikowanego komplementarnego oligonukleotydu jest związane ze zmianami stężenia soli w środowisku hybrydacyjnym. W przypadku niemodyfikowanych dupleksów DNA obserwuje się wzrost ich trwałości przy wyższych stężeniach soli, odwrotnie niż w przypadku dupleksów modyfikowanych poliaminonukleotydami. Wysunięta została hipoteza, że trwałość struktur drugorzędowych jest zmienna w zależności od liczby wprowadzonych modyfikowanych jednostek nukleotydowych. Wprowadzenie dużej liczby PA może nie tylko znacząco zmienić właściwości fizyczne i chemiczne fragmentu kwasu nukleinowego, ale i jego zdolność do hybrydacji.



Rys. 20. Schematyczne przedstawienie eksperymentu, w którym biblioteka poliaminooligonukleotydu SPAOCL1 oddziałuje elektrostatycznie z niekomplementarną sondą SONPL2.¹⁰⁰

Z kolei badania przeprowadzone przez dr Orłowską⁴¹ dotyczyły analizy trwałości dwu- i trójniciowych struktur DNA. Stosowane poliaminooligonukleotydy, pochodziły z wcześniej otrzymanej biblioteki kombinatorycznej $(dC/dC^{Sp})_4T_4$.⁴¹ Analiza polipirymidynowego 8-meru $d(C_4T_4)$ modyfikowanego poliaminonukleotydem (dC^{Sp}) w jednej z nici, wykazała wzrost trwałości powstających struktur w przypadku włączenia jednej modyfikacji, niezależnie od miejsca jej usytuowania w nici oktameru. Badania były prowadzone w roztworach o 1 M i 0,1 M stężeniu NaCl. Dla oligomerów zawierających więcej niż jedną resztę dC^{Sp} Anna Orłowska obserwowała zarówno efekty stabilizacji jak i destabilizacji struktur drugorzędowych, a w przypadku wprowadzenia czterech jednostek dC^{Sp} nie zaobserwowała tworzenia się dupleksu. Wykonane zostały również badania trwałości pirymidynopurynowego dupleksu autokomplementarnego w roztworze o 0,1 M i 1 M stężeniu soli. W tym przypadku modyfikowane były obie nici poprzez wprowadzenie odpowiednio 3 ($d(AC^{Sp}GTACGT)$) i 6 ($d(AC^{Sp}GTAC^{Sp}GT)$) ładunków dodatnich w wyniku kowalencyjnego związania z oligonukleotydem reszty sperminy. Otrzymane wyniki dotyczące badań dupleksu $(d(AC^{Sp}GTACGT))$ pokazały mniejszy efekt destabilizacyjny w roztworach o niższym stężeniu soli, co potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące właściwości dupleksów modyfikowanych poliaktionami.^{100,101} W przypadku włączenia czterech

modyfikacji (schemat poniżej) w komplementarnych niciach nie obserwowano tworzenia się dupleksu.



Badania te miały charakter wstępny, dlatego podjęłam próbę bardziej systematycznych badań termodynamicznych, w celu uzyskania odpowiedzi na temat zależności efektu stabilizacyjnego od miejsca wprowadzenia jednostek poliaminowych, ich ilości oraz oddziaływań pomiędzy włączonymi resztami aminoalkilowymi.

Postanowiłam zsyntezować dwa rodzaje modyfikowanych poliaminooligonukleotydów. Pierwszym rodzajem były oligomery zawierające dwie jednostki poliaminonukleotydowe w jednej z nici (tabela 6 A). Drugim były oligomery zawierające po jednej modyfikacji w niciach komplementarnych (tabela 6 B). Dodatkowo przeprowadziłam analizę oktameru (5'-GTCGGCTG-3'; 5'-CAGCC^{Sp}GAC-3') modyfikowanego jedną resztą dC^{Sp} (tabela 7 D), który wykorzystałam w badaniach strukturalnych za pomocą spektroskopii NMR (dokładne omówienie tematu rozdział 5.1)

Tabela 6. Otrzymane poliamino-2'-deoksyoligonukleotydy; X = dC^{Sp}

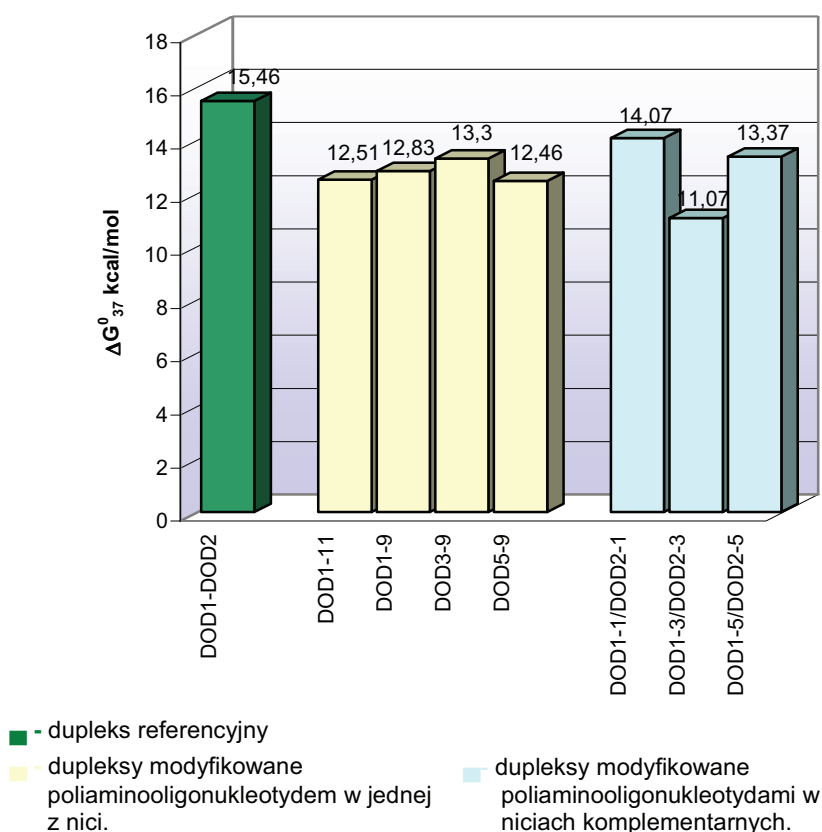
A			B		
Symbol	Sekwencja (5'→3')	Całkowity ładunek	Symbol	Sekwencja (5'→3')	Całkowity ładunek
DOD1	CTC ACA TGC GCG	-11	DOD1-1	XTC ACA TGC GCG	-8
DOD2	CGC GCA TGT GAG	-11	DOD2-1	XGC GCA TGT GAG	-8
DOD1-11	XTC ACA TGC GXG	-5	DOD1-3	CTX ACA TGC GCG	-8
DOD1-9	XTC ACA TGX GCG	-5	DOD2-3	CGX GCA TGT GAG	-8
DOD3-9	CTX ACA TGX GCG	-5	DOD1-5	CTC AXA TGC GCG	-8
DOD5-9	CTC AXA TGX GCG	-5	DOD2-5	CGC GXA TGT GAG	-8

Do badań wybrałam sekwencję dodekameru Drew'a – Dickersona, który zmodyfikowałam tak, by zawierał jak największą możliwą ilość reszt deoksytydyny (tabela 7 A) i nie był dupleksem autokomplementarnym. Ze względu na zawartość ośmiu par GC w zmienionym dodekamerze spodziewałam się, że utworzony dupleks referencyjny będzie charakteryzował się dużą trwałością termodynamiczną. Ponieważ z badań Anny Orłowskiej wynika, że oligomery modyfikowane dwiema resztami poliaminonukleotydu w komplementarnych niciach obniżają trwałość dupleksów, prowadzone przeze mnie badania miały na celu sprawdzenie wyżej wymienionych obserwacji w odniesieniu do wybranego dupleksu.

Najpierw zbadałam właściwości dupleksów z dwiema modyfikacjami w jednej z nici. W badanych przez Annę Orłowską kompleksach z dwiema jednostkami dC^{Sp} (całkowity ładunek

oligomeru -1) obserwowano dwa rodzaje efektów. Jeżeli modyfikacje dC^{Sp} były rozdzielone jedną niemodyfikowaną resztą deoksytydyny ($XCXCT_4$; $X = dC^{Sp}$) trwałość dupletu była wyższa ($\Delta\Delta G = 1,5$ kcal/mol), również gdy reszty dC^{Sp} występowały obok siebie na końcu 5' oligomeru ($XXCCT_4$; $X = dC^{Sp}$) obserwowano wzrost ΔG o 1,5 kcal/mol. Dla sekwencji poliaminooligonukleotydu $CXCXT_4$ ($X = dC^{Sp}$) zanotowano spadek trwałości struktury dwuniciowej w roztworze o wyższym stężeniu soli (1 M NaCl), natomiast wzrost trwałości tego samego dupletu w roztworze o stężeniu soli 0,1 M.

Moje obserwacje właściwości termodynamicznych poliaminooligonukleotydów wskazują, że włączenie dwóch reszt dC^{Sp} (całkowity ładunek -5) nieznacznie obniża trwałość powstałego dupletu (tabela 7 B). Różnica energii swobodnej ($\Delta\Delta G$) dla wszystkich badanych dupletów leży w zakresie ok. 2-3 kcal/mol niezależnie od miejsca modyfikacji. Spadek trwałości badanych przede mną dupletów w przeciwieństwie do obserwowanego wzrostu trwałości dupletu ($XCXCT_4:A_4G_4$) oraz dupletu ($XXCCT_4:A_4G_4$) może mieć związek z obniżeniem całkowitego ładunku oligomeru (wewnątrzcząsteczkowa 'neutralizacja'), jak i z sekwencją zasad.



Wykres 3. Wykres wpływu modyfikacji poliaminowej na trwałość dupletów.

W przypadku dupletów z jedną modyfikacją w niciach komplementarnych obserwowałam również obniżenie trwałości układów dwuniciowych. Obserwacja ta potwierdza wcześniejsze wyniki z pracy dr Orłowskiej. Badania trwałości autokomplementarnych oktamerów, które zawierały po jednej modyfikacji w nici (całkowity ładunek -4) pokazały obniżenie trwałości

dupleksów. Zaobserwowano również, że zmiana stężenia soli w roztworze hybrydizacyjnym wpływa nieznacznie na trwałość struktury dwuniciowej.

Najwyższą energię swobodną ΔG wykazywał dupleks z poliaminami związanymi kowalencyjnie i położonymi na trzecim miejscu od końca 5'-oligomeru (wykres 3). Natomiast dupleks, w którym obie modyfikacje rozdzielone były dwiema parami zasad AT charakteryzował się większą trwałością (tabela 7 B, wers 2). Obserwacje te wskazują, że bliskie sąsiedztwo jednostek modyfikowanych, nie musi wpływać niekorzystnie na trwałość dupleksu. W badanych przeze mnie dupleksach całkowity ładunek, po włączeniu reszty dC^{Sp} do każdej nici wynosił -8, w oktamerach autokomplementarnych -4. Mimo, różnej długości i różnej sekwencji dupleksów efekt destabilizacyjny był podobny (ok. 1,5 – 4 kcal/mol).

Badania termodynamiczne modyfikowanego dupleksu dodekameru Drew'a- Dickersona potwierdzają wcześniej uzyskane wyniki. Trwałość dupleksów z poliaminooligonukleotydami zależy od długości i sekwencji zasad oligomeru, jeżeli reszty modyfikowane włączone są do tej samej nici. Jeżeli w badanych dupleksach, zawierających po dwie reszty sperminy obserwowałam podobne zmiany trwałości, mogę stwierdzić, że oddziaływania pomiędzy resztami sperminy nie 'przeszkadzają' w efektywnym oddziaływaniu z cząsteczką DNA.

Przeprowadzone badania sugerują, że wysoka trwałość badanych struktur jest częściowo związana z neutralizacją ładunku szkieletu fosforanowego, co wpływa korzystnie na tworzenie się dupleksu. W związku z tym, że nieznaną jest dokładny model oddziaływań poliamin z kwasami nukleinowymi możemy postulować, że niekorzystny efekt energetyczny może być związany np. z lokalnym osłabieniem wiązań wodorowych par sąsiadujących z modyfikacjami.

Badania termodynamiczne oktameru z włączoną jedną resztą dC^{Sp} (tabela 7 D) są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami właściwości poliaminooligonukleotydów wchodzących w skład badanej biblioteki kombinatorycznej. Analiza 8-meru d(C₄T₄) modyfikowanego jedną resztą dC^{Sp}, wykazała wzrost trwałości powstających struktur ΔG o około 2-2,5 kcal/mol (stężenie soli 1 M NaCl). W badanym przeze mnie oktamerze obserwowany wzrost trwałości dupleksu wynosił 0,5 kcal/mol (stężenie soli 0,1 M NaCl). Obserwowany efekt może być związany między innymi z wybraną sekwencją zasad.

Wykonane analizy potwierdzają wcześniejsze badania świadczące o dużym powinowactwie poliaminooligonukleotydów do komplementarnych sekwencji DNA. Rozszerzenie badań trwałości dupleksów w roztworach o niższym i wyższym stężeniu, pozwoli zweryfikować uzyskane obserwacje. Nadal nie ma jednoznacznej odpowiedzi, w jaki sposób poliamina oddziałuje z kwasem nukleinowym.

Podjęłam, więc próbę określenia czynników odpowiedzialnych za trwałość termodynamiczną dupleksów zawierających reszty dC^{Sp}. Wyniki badań przedstawione w następnym rozdziale, pozwoliły otrzymać struktury dwóch dupleksów DNA, z których jeden zawiera włączoną kowalencyjnie resztę dC^{Sp}.

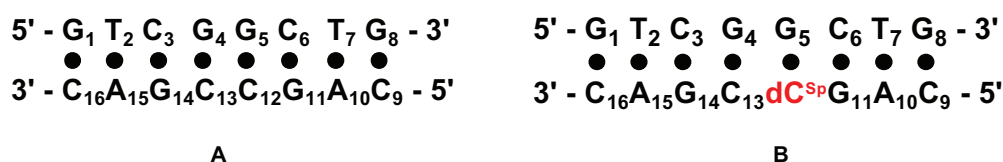
Tabela 7. Parametry termodynamiczne tworzenia dupleksów poliaminooligonukleotydów (bufor zawiera 100 mM NaCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM Na₂EDTA, pH 7)

Dupleksy		Średnia dopasowania krzywych topnienia					Wykres zależności T_M^{-1} od $\log C_T$				
DNA lub PA-DNA	DNA lub PA-DNA	$-\Delta H^\circ$ [kcal/mol]	$-\Delta S^\circ$ [eu]	$-\Delta G_{37}^\circ$ [kcal/mol]	T_M [°C]	$-\Delta H^\circ$ [kcal/mol]	$-\Delta S^\circ$ [eu]	$-\Delta G_{37}^\circ$ [kcal/mol]	T_M [°C]	$\Delta\Delta G_{37}^\circ$ [kcal/mol]	ΔT_M [°C]
5'→3'	5'→3'										
A. Parametry termodynamiczne dupleksu referencyjnego DNA/DNA											
CTC ACA TGC GCG	CGC GCA TGT GAG	115,9±4,8	322,1±14,2	16,00±0,41	64,6	108,5±1,8	300,1±5,4	15,46±0,12	64,8	0	0
B. Parametry termodynamiczne dupleksów zawierających dwie modyfikowane reszty dC^{sp} w tej samej nici oligomeru; X = dC^{sp}											
XTC ACA TGC GCG	CGC GCA TGT GAG	66,0±8,4	174,2±25,4	11,96±0,50	64,8	74,3±5,7	199,3±517,3	12,51±0,30	64,2	+2,95	-0,6
XTC ACA TGX GCG	CGC GCA TGT GAG	65,9±3,6	173,6±11,1	12,10±0,21	65,7	77,2±3,5	207,4±10,7	12,83±0,24	64,7	+2,63	-0,1
CTX ACA TGX GCG	CGC GCA TGT GAG	75,3±1,7	203,0±5,30	12,41±0,10	63,3	87,6±3,6	239,8±10,8	13,30±0,26	63,0	+2,16	-1,8
CTC AXA TGX GCG	CGC GCA TGT GAG	60,4±5,1	158,2±14,9	11,42±0,53	64,3	75,0±2,7	201,6±8,2	12,46±0,19	63,6	+3	-1,2
C. Parametry termodynamiczne dupleksów zawierających jedną resztę modyfikowaną dC^{sp} w niciach komplementarnych; X = dC^{sp}											
XTC ACA TGC GCG	XGC GCA TGT GAG	96,9±3,0	267,0±9,1	14,15±0,23	63,4	96,0±2,0	264,3±6,2	14,07±0,14	63,4	+1,39	-1,4
CTX ACA TGC GCG	CGX GCA TGT GAG	84,0±5,7	234,4±17,5	11,30±0,32	55,7	78,8±2,5	218,6±7,7	11,07±0,10	56,0	+4,39	-8,2
CTC AXA TGC GCG	CGC GXA TGT GAG	90,0±5,0	247,8±15,3	13,15±0,31	61,3	94,0±1,7	260,0±5,4	13,37±0,11	61,3	+2,9	-3,5
D. Parametry termodynamiczne oktameru z jedną resztą modyfikowaną dC^{sp}; X = dC^{sp}											
GTCGGCTG	CAGCCGAC	66,2±3,4	183,9±11,9	9,21±0,10	50,1	62,8±3,1	173,1±9,8	9,15±0,08	50,5	0	0
GTCGGCTG	CAGXCGAC	66,5±5,7	182,3±17,0	10,0±0,43	54,2	58,6±0,2	150,0±0,8	9,65±0,01	54,4	-0,52	+4

3.2. Ustalenie struktury dupleksu zawierającego modyfikację resztą dC^{Sp} oraz dupleksu referencyjnego

Poliaminy wykazują wysokie powinowactwo do ujemnie naładowanych kwasów nukleinowych. Obdarzone dodatnim ładunkiem cząsteczki wzmacniają odporność kwasów nukleinowych na chemiczną jak i enzymatyczną degradację i ułatwiają formowanie struktur drugo- i trzeciorzędowych.¹⁰² Jak wcześniej wspominałam, mimo że funkcje biologiczne poliamin i ich biokoniugatów są przedmiotem intensywnych badań, to dokładny mechanizm działania PA w komórce nadal nie został w pełni poznany. Analogi kwasów nukleinowych zawierające kowalencyjnie związane reszty poliamin mogą przybliżyć nas do zrozumienia natury oddziaływań poliamina – kwas nukleinowy. W celu określenia sposobu oddziaływania pomiędzy kowalencyjnie włączoną resztą sperminy a cząsteczką DNA, postanowiłam wykorzystać metodę spektroskopii rezonansu magnetycznego NMR. Badania prowadziłam pod kierunkiem doc. dr hab. Zofii Gdaniec z Grupy Biomolekularnego NMR Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. Eksperymenty NMR pozwoliły mi otrzymać dane, które wykorzystałam do określenia struktur przestrzennych dwóch dupleksów o identycznej sekwencji zasad: modyfikowanego dupleksu B i dupleksu referencyjnego A (rys. 21).

Na drodze syntezy chemicznej otrzymałam oktamer, który zawierał modyfikowany nukleotyd – dC^{Sp} (rys. 22). Przeprowadziłam badania trwałości dupleksu powstałego poliaminooligonukleotydu z komplementarną nicią DNA. Porównanie trwałości termodynamicznej dupleksu zawierającego modyfikację w stosunku do cząsteczki referencyjnej wskazuje na niewielki wzrost trwałości dupleksu zawierającego resztę dC^{Sp} (tabela 8).



Rys. 21. Struktura drugorzędowa dupleksów referencyjnego A i modyfikowanego B jedną resztą dC^{Sp}. Tabela zawiera parametry termodynamiczne badanych oktamerów (X = dC^{Sp}).

Tabela 8. Parametry termodynamiczne badanych oktamerów (X = dC^{Sp})

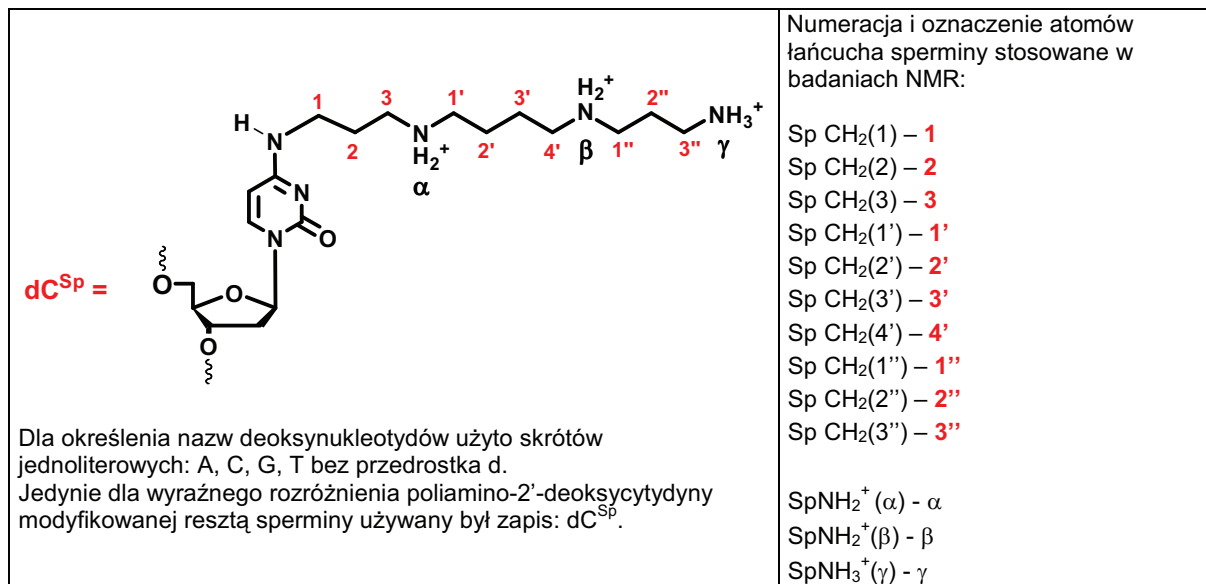
DNA (5'→3')	DNA lub PA-DNA (5'→3')	-ΔG° ₃₇ [kcal/mol]	T _M [°C]	-ΔG° ₃₇ [kcal/mol]	T _M [°C]	ΔΔG° ₃₇ [kcal/mol]	ΔT _M [°C]
GTCGGCTG	CAGCCGAC	9,21±0,10	50,1	9,15±0,08	50,5	0	0
GTCGGCTG	CAGXCGAC	10,0±0,43	54,2	9,65±0,01	54,4	-0,52	+4

Interesowało mnie, czy poznanie struktury przestrzennej obu dupleksów pozwoli na znalezienie źródła odpowiedzialnego za wzrost trwałości dupleksu z dC^{Sp}.

3.2.1. Przypisanie sygnałów rezonansowych w widmach NMR dla dupletu referencyjnego i modyfikowanej reszty dC^{Sp}

Analiza widm ¹H NMR w D₂O

Jednowymiarowe widma ¹H NMR badanych dupletów (A i B) wykonane w D₂O w temperaturze 25 °C przedstawione są na rysunku 23.

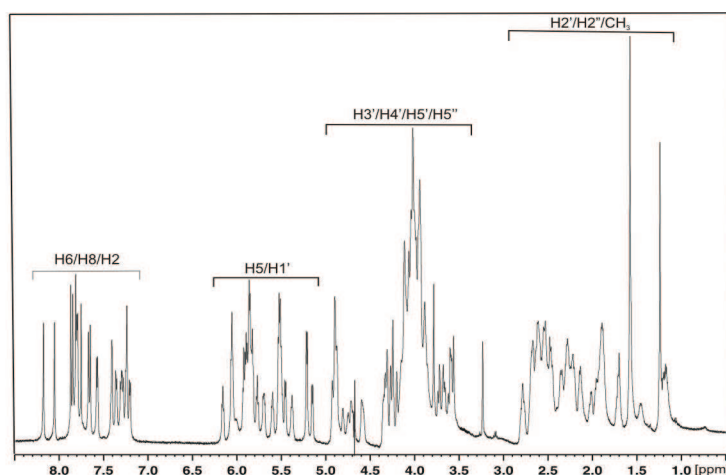
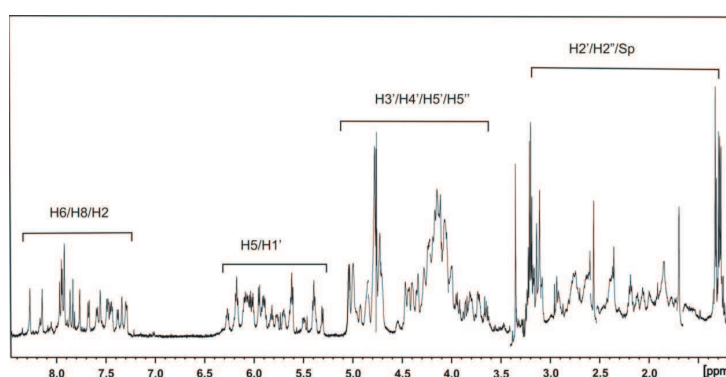


Rys. 22. Schemat modyfikowanej reszty deokscytydyny dC^{Sp}. Oznaczenie atomów łańcucha sperminy oraz ich numeracja stosowane w badaniach struktury modyfikowanego dupletu.

Sygnały rezonansowe obu dupletów koncentrują się w czterech charakterystycznych dla cząsteczek DNA zakresach spektralnych (rys. 23):

- 6,5 – 8,5 ppm – sygnały pochodzące od protonów H2 reszt deoksyadenozyny, H6 pirymidyny i H8 puryny,
- 5,2 – 6,3 ppm – sygnały pochodzące od protonów H5 reszt deokscytydyny i protonów anomerycznych H1',
- 3,7 – 5,1 ppm – sygnały pochodzące od protonów reszt deoksyrybozy H3', H4', H5' i H5'',
- 1,3 – 3,2 ppm – sygnały pochodzące od protonów reszt deoksyrybozy H2', H2'' i grupy metylowej tymidyny.

W widmie modyfikowanego dupletu (rys. 23 B) widoczne są dodatkowo sygnały pochodzące od protonów reszty sperminy, które znajdują się w zakresie przesunięć chemicznych 1,3 – 3,2 ppm. Obecność tych dodatkowych sygnałów w regionie, gdzie występują sygnały pochodzące od protonów H2'/H2'' deoksyrybozy prowadzi do silnego zagęszczenia sygnałów, co utrudniało ich identyfikację.

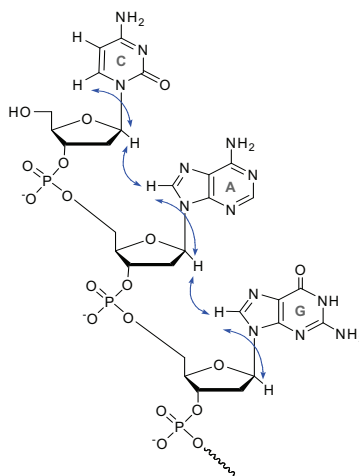
A. Widmo 1D ^1H NMR duplexu referencyjnegoB. Widmo 1D ^1H NMR duplexu modyfikowanego

Rys 23. Widma 1D ^1H NMR obu duplexów (A i B) wykonane w temperaturze 25 °C w D_2O (600 MHz). Nad widmami zaznaczono charakterystyczne zakresy występowania sygnałów rezonansowych pochodzących od protonów H2, H6 i H8; protonów H5 i H1'; pozostałych protonów pierścieni deoksyrybozy, grup metylowych reszt tymidyny oraz łańcucha alifatycznego sperminy.

Istotnym elementem w analizie strukturalnej cząsteczek kwasów nukleinowych metodami spektroskopii NMR jest wysoka czystość badanej próbki. Analiza widm ^1H NMR wykazała, że próbka duplexu referencyjnego nie zawiera zanieczyszczeń, które mogłyby utrudniać interpretację widm NMR. W widmie ^1H NMR modyfikowanego duplexu widoczne są pasma absorpcyjne (w zakresie 3,0 – 3,3 i 1,0 – 1,2 ppm) pochodzące od zanieczyszczeń, których nie udało się całkowicie usunąć w procesie oczyszczania próbki. W trakcie procedury przypisywania należało wziąć pod uwagę występowanie tych dodatkowych sygnałów, które mogły dawać sygnały korelacyjne w widmach dwuwymiarowych, nie należące ani do cząsteczki duplexu ani nie będące częścią oddziaływań pomiędzy protonami reszty sperminy a oktamerem.

Na podstawie analizy widm jednowymiarowych nie jest możliwa pełna identyfikacja i jednoznaczne przypisanie sygnałów nawet, jeżeli widma ^1H NMR zawierają dobrze rozdzielone linie rezonansowe. Dalszą analizę przeprowadziłam w oparciu o serie dwuwymiarowych eksperymentów homojądrowych (^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^1H E.COSY, ^1H - ^1H TOCSY) i

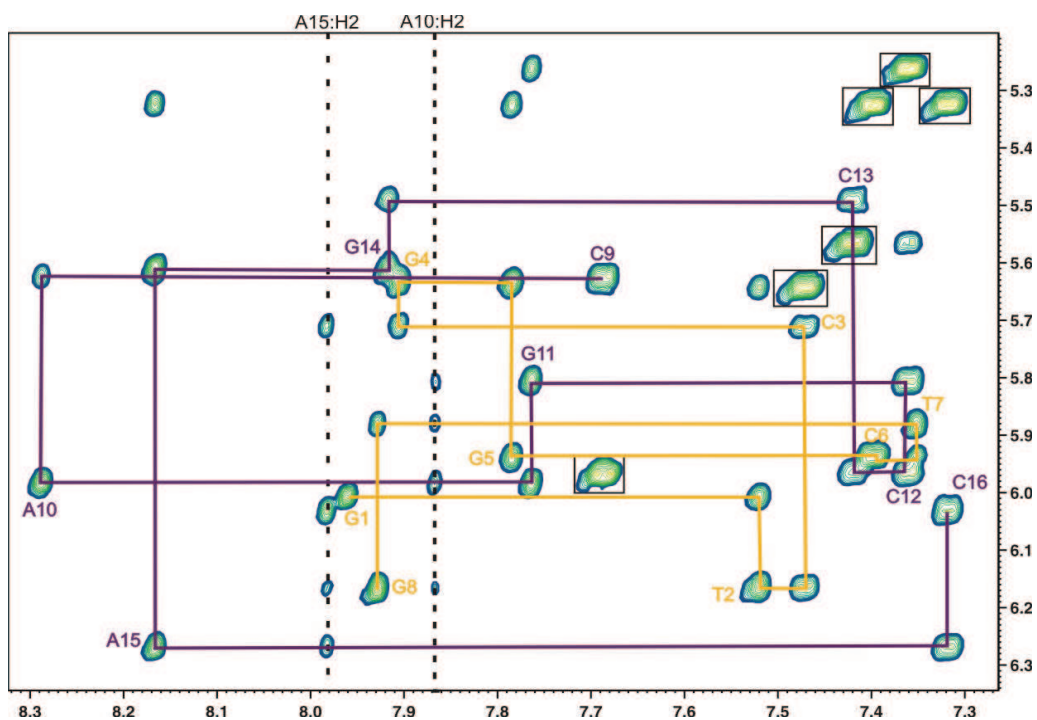
heterojądrowych (^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{31}P HSQC), wykorzystując do przypisań sygnałów standardowe procedury¹⁰³



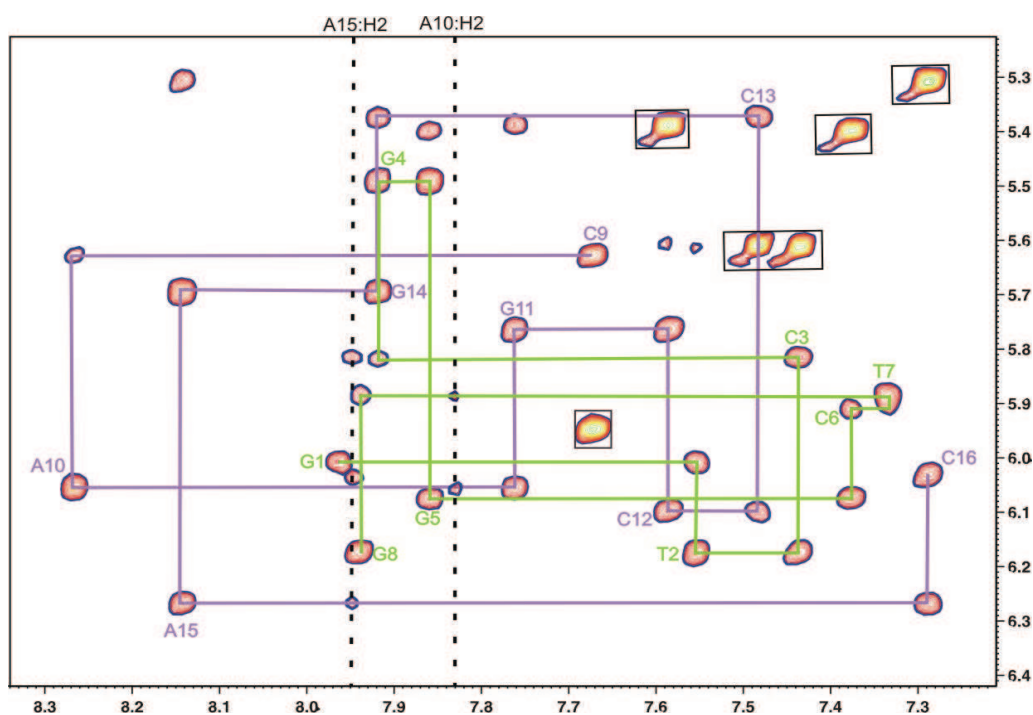
Rys. 24. Schemat wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań dipolowych $\text{H6/H8}_{(i)}\text{-H1}'_{(i)}\text{-H6/H8}_{(i+1)}$ tworzących tzw. ścieżkę NOE w prawoskrętnych regularnych strukturach B-DNA.

Przypisywanie przesunięć chemicznych poszczególnym protonom w obu dupleksach DNA rozpoczęłam od analizy widm 2D NOESY (rys. 25). Pierwszy z analizowanych regionów to, tak zwany, region anomeryczno-aromatyczny. W regionie tym obserwuje się dwa rodzaje sygnałów. Pierwsze z nich są wynikiem oddziaływań dipolowych pomiędzy protonami H5-H6 pochodzącymi od reszt deoksycydydyny. Protony te, oddalone od siebie o 2,43 Å, dają charakterystyczne, silne sygnały korelacyjne ułatwiające ich przypisanie w widmach 2D NOESY. Poprawność przypisania protonów H5 i H6 reszt deoksycydydyny mogłam potwierdzić za pomocą widm typu COSY (np. E.COSY), gdzie obserwowane są sygnały korelacyjne pochodzące od sprzężeń skalarnych pomiędzy protonami oddalonymi od siebie najwyżej o trzy wiązania chemiczne.

Druga grupa sygnałów to sygnały o mniejszej intensywności, będące wynikiem intranukleotydocowych $\text{H6/H8}_{(i)}\text{-H1}'_{(i)}$ oraz internukleotydocowych $\text{H6/H8}_{(i)}\text{-H1}'_{(i+1)}$ oddziaływań. Korzystając z wiedzy na temat właściwości prawoskrętnych, regularnych struktur B-DNA oraz analizując obserwowane sygnały NOE mogłam wyznaczyć ścieżkę przenoszenia magnetyzacji pomiędzy protonami $\text{H6/H8}_{(i)}\text{-H1}'_{(i)}\text{-H6/H8}_{(i+1)}$. Wyznaczenie tzw. "ścieżki NOE" (ang. *pathways*) jest możliwe dzięki niewielkim odległościom protonów $\text{H6/H8}_{(i)}$ a protonami $\text{H1}'_{(i)}$ tej samej reszty (ok. 3,8 Å) oraz pomiędzy protonem $\text{H1}'_{(i)}$ a protonami $\text{H6/H8}_{(i+1)}$ następnej jednostki nukleotydocowej (ok. 2,7 Å) (rys. 24). Nieprzerwana ścieżka sygnałów pozwala, na jednoznaczne przypisanie sygnałów $\text{H5/H6/H8/H1}'$ i świadczy o dużej stabilności struktury helikalnej obu dupleksów. W analizowanym fragmencie widm 2D NOESY obserwuje się dodatkowo słabe internukleotydocowe sygnały NOE pochodzące od oddziaływań pomiędzy protonami $\text{H6}_{(i)}\text{-H5}_{(i+1)}$, $\text{H8}_{(i)}\text{-H5}_{(i+1)}$. Obecność tych sygnałów ułatwiła wyznaczenie prawidłowej ścieżki NOE.



A. Dupleks referencyjny

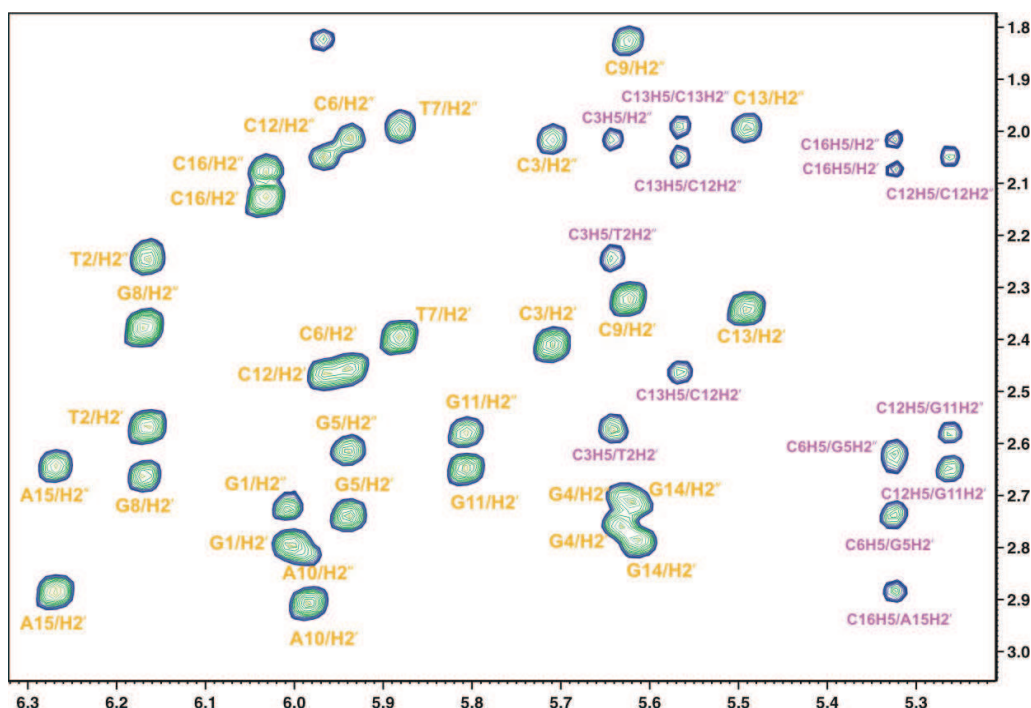


B. Dupleks modyfikowany

Rys. 25. Region H2/H6/H8-H5/H1' widma 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupleksów A i B w D_2O (600 MHz, 25 °C). W widmie zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki H6/H8_(i)-H1'_(i)-H6/H8_(i+1) obu nici dupleksu. Szarymi prostokątami wyróżnione zostały intranukleotydowe sygnały H5-H6 reszt deoksycytdyny, a przerywane linie wskazują położenie sygnałów H2 reszt deoksyadenozyny.

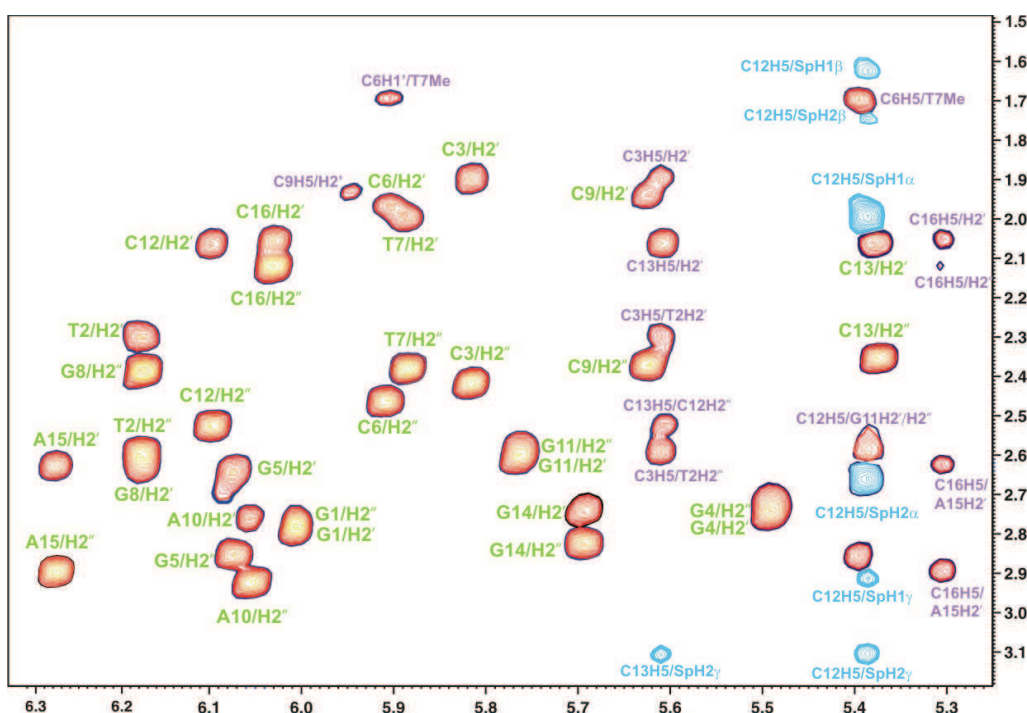
Jednoznaczne przypisanie sygnałów protonów H2 odpowiednim resztom adenozynej było możliwe dzięki obecności sygnałów korelacyjnych do własnego protonu H1' oraz do protonu anomerycznego reszty sąsiadującej od strony 3'. W widmach 2D NOESY wykonanych w ciężkiej

wodzie obserwowałam również sygnały pochodzące od oddziaływań pomiędzy protonami H2 reszt A10 i A15 z atomami wodoru H1'-G8 i H1'-C3 należącymi do nici komplementarnych, które w tych warunkach jako jedyne potwierdzały zawiązywanie struktury dupleksu (rys. 25).



Rys. 26. Region H5/H1'-H2'/H2'' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupleksu A w D₂O (600 MHz, 25 °C) z wyróżnionymi sygnałami korelacyjnymi pomiędzy protonami H1'-H2'/H2'' (kolor żółty). Fioletowym kolorem opisane są sygnały korelacyjne intra- i internukleotydowe pomiędzy protonami H5 reszty deoksycytyny a H2'/H2'' rybozy.

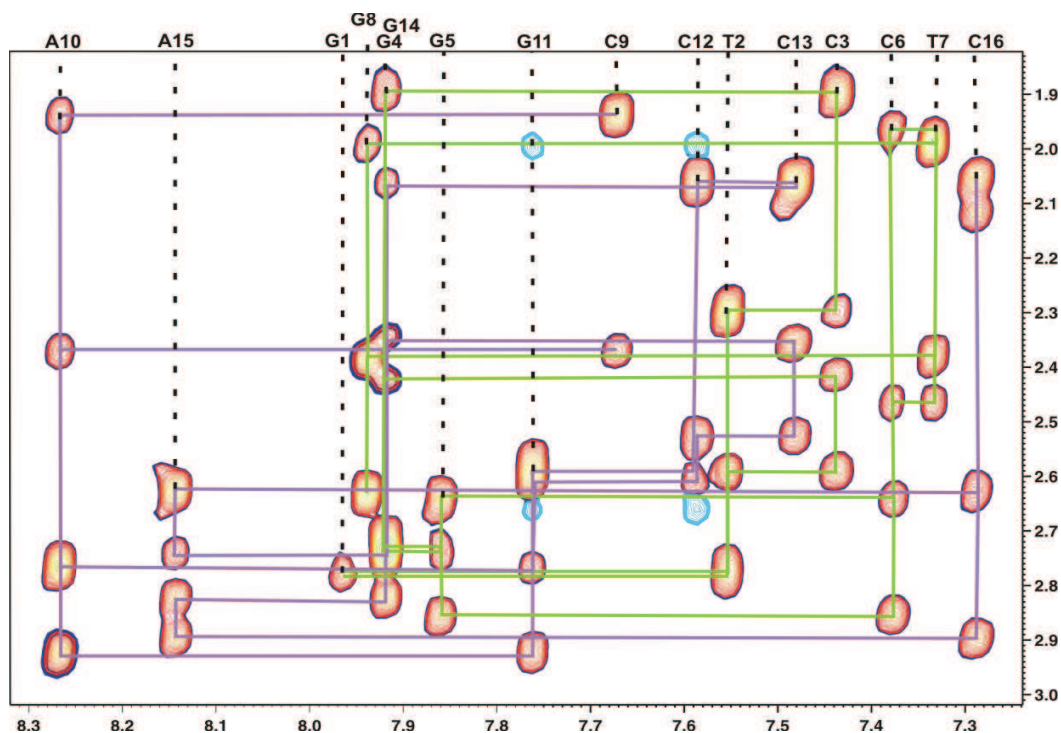
Sygnały pochodzące od protonów H2'/H2'' obu dupleksów przypisałam na podstawie analizy widm 2D NOESY z krótkim czasem mieszania (rys. 26). Na widmach tych, niezależnie od konformacji deoksyrybozy, ze względu na mniejszą odległość protonów H1'-H2'' (ok. 1,2 Å) obserwuje się bardziej intensywne sygnały korelacyjne, niż sygnały korelacyjne pochodzące od oddziaływań pomiędzy protonami H1'-H2' (ok. 2,2 Å). Dla dupleksu B w rejonie H5/H1'-H2'/H2'' widoczne są również silne sygnały korelacyjne wynikające z efektu NOE pomiędzy protonem H5 modyfikowanej reszty dC^{Sp} i obu protonów SpCH₂(1) łańcucha sperminy oraz mniej intensywne sygnały pochodzące od oddziaływań z protonami SpCH₂(2) i SpCH₂(3) (rys. 27). Ponadto w regionie tym pojawiają się sygnały NOE pomiędzy jednym z protonów SpCH₂(3) reszty sperminy i protonem H5 reszty C13, leżącej po stronie 3' od miejsca modyfikacji.



Rys. 27. Region H5/H1'-H2'/H2'' widma 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu B w D₂O (600 MHz, 25 °C) z wyróżnionymi sygnałami korelacyjnymi pomiędzy protonami H1'-H2'/H2'' (kolor zielony). Fioletowym kolorem opisane są sygnały korelacyjne intra- i internukleotydowe pomiędzy protonami H5 reszt deoksycytyny a H2'/H2'' deoksyrybozy. Niebieskim kolorem zaznaczono korelacje pochodzące od protonów sperminy.

Poprawność przypisań sygnałów pochodzących od protonów H2' mogłam potwierdzić analizując region oddziaływań H8/H6-H2'/H2''. Obecność silnych intranukleotydowych oddziaływań dipolowych jest wynikiem małej odległości pomiędzy tymi protonami (rys. 28). W strukturach DNA typu B możliwe jest wyznaczenie sekwencyjnych ścieżek H2'_(i)-H6/H8_(i+1) i H2''_(i)-H6/H8_(i+1), ponieważ odległość pomiędzy protonami H2'/H2'' i H6 lub H8 następnej reszty jest mniejsza niż 4 Å. Na widmach obu badanych przez mnie dupletów pojawienie się dodatkowych sygnałów NOE pomiędzy protonami H5-H2'/H2'' i H5_(i)-H2'/H2''_(i-1) potwierdza poprawność przypisań sygnałów H2'/H2''.

W regionie występowania sygnałów korelacyjnych H6/H8-H2'/H2'' i H5/H1'-H2'/H2'' w widmie 2D NOESY dupletu zawierającego resztę dC^{Sp} widoczne są dodatkowo sygnały korelacyjne (rys. 28) pochodzące od oddziaływań NOE, w które zaangażowane są protony reszty sperminy. Na rysunku 28 widoczne są oddziaływania pomiędzy protonami SpCH₂(1) oraz protonem H6 reszty dC^{Sp}. Widoczne są również sygnały będące wynikiem oddziaływań pomiędzy protonem H8 deoksyguanozyny leżącej po stronie 5' miejsca modyfikacji a protonami SpCH₂(1). Wszystkie sygnały pochodzące od oddziaływań pomiędzy protonami sperminy a protonami reszty cząsteczki zebrałam w tabeli 10.



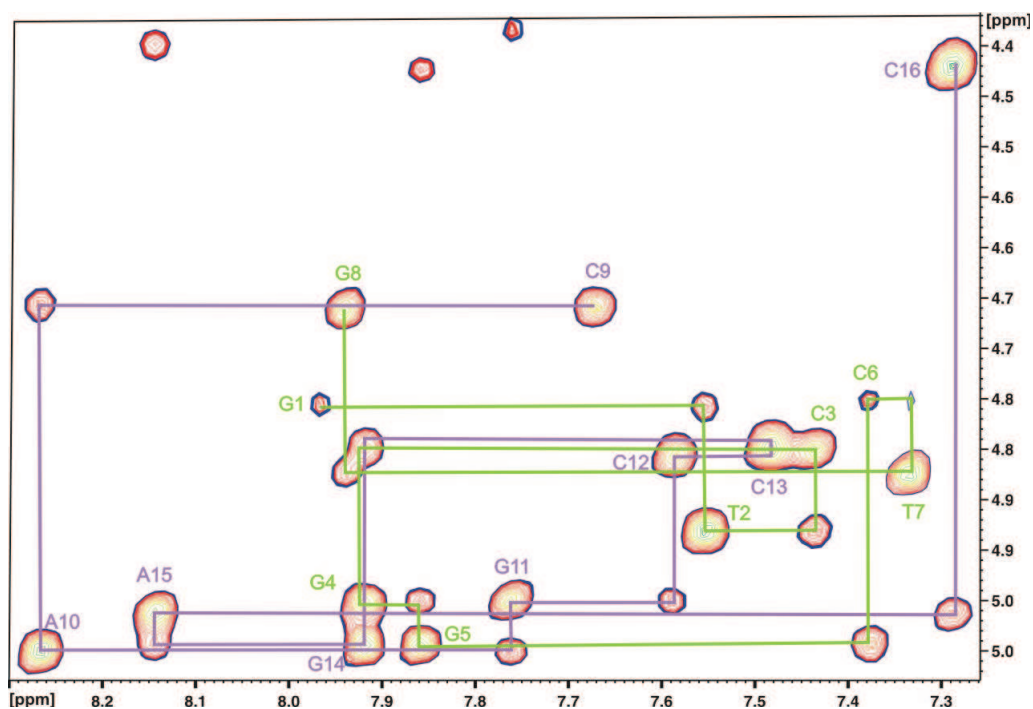
Rys. 28. Region sygnałów H6/H8-H2'/H2'' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupleksu B w D₂O (600 MHz, 25 °C). W widmie zaznaczone zostały sekwencyjne ścieżki H6/H8_(i)-H2'_(i)-H6/H8_(i+1) i H6/H8_(i)-H2''_(i)-H6/H8_(i+1) – kolorem zielonym dla górnej nici, natomiast fioletowym – dla dolnej nici. Przerywane linie wskazują położenie sygnałów H6/H8 zasad heterocyklicznych. Niebieskim kolorem zaznaczono sygnały korelacyjne pochodzące od oddziaływań, w które zaangażowane są protony reszty sperminy.

Identyfikacja sygnałów rezonansowych protonów H3' była możliwa na podstawie analizy widm 2D NOESY wykonanych z czasem mieszania 400 ms, na których widoczne są intensywne sygnały korelacyjne pomiędzy protonami H2'-H3' (ok. 1,1 Å) oraz H2''-H3' (ok. 1,75 Å) (rys. 29). Pomocne w identyfikacji przesunięć chemicznych protonów okazały się widma typu COSY. W widmach tych zaobserwowałam silne sygnały korelacyjne pochodzące od sprzężeń skalarnych pomiędzy protonami H2'-H3'. Dla konformacji C2'-endo deoksyrybozy sprzężenia te charakteryzują się dużymi wartościami $^3J(\text{H2}'\text{-H3}')$ (ok. 6 Hz). Dodatkowe informacje uzyskałam analizując widma ^1H - ^{31}P HSQC, w których obserwowałam silne sygnały korelacyjne H3'_(i)-P_(i-1) (rys. 36). Wykonane widmo TOCSY potwierdziło istnienie silnych, charakterystycznych dla regularnych struktur B-DNA, oddziaływań skalarnych pomiędzy protonami H1'-H3' i dostarczyło informacji o przesunięciach chemicznych protonów H3'.

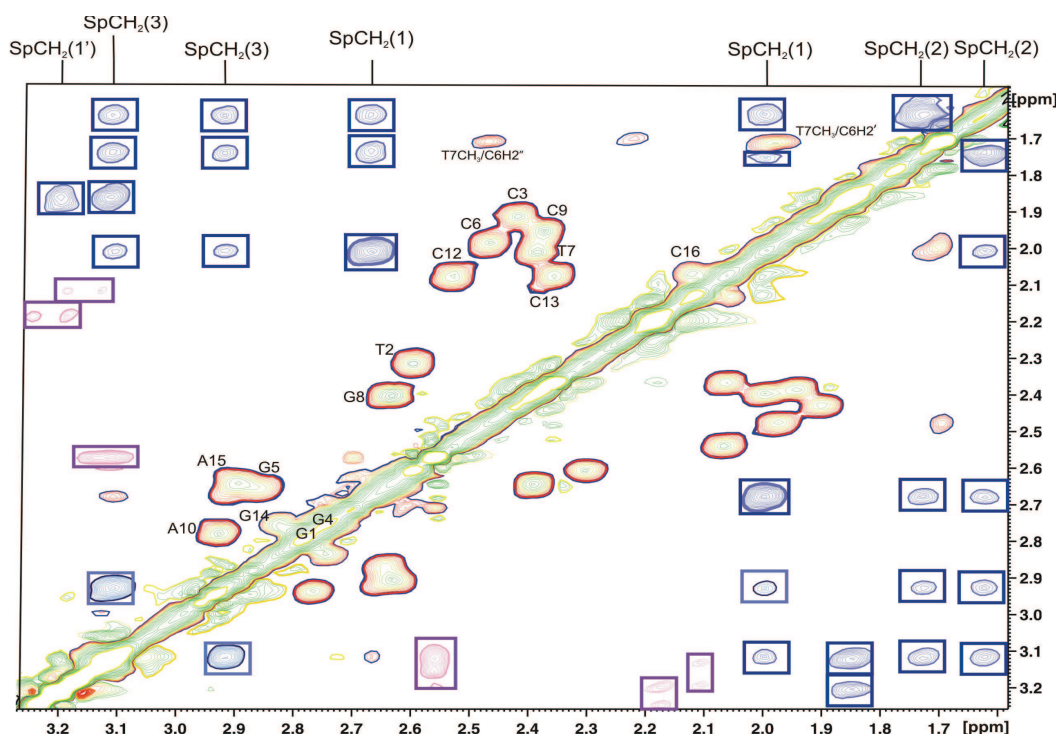
Uzyskane informacje pozwoliły mi potwierdzić poprawność przypisań protonów H3' przez i wyznaczyć nieprzerwane sekwencyjne ścieżki NOE H6/H8_(i)-H3'_(i)-H6/H8_(i+1) w widmie 2D NOESY.

Dla obu badanych dupleksów, A i B, na podstawie analizy widm homo- i heterojądrowych przypisałam również sygnały pochodzące od protonów H4' i H5'/H5''.

Wartości przesunięć chemicznych obu badanych dupleksów zamieściłam w tabelach 11 i 12.

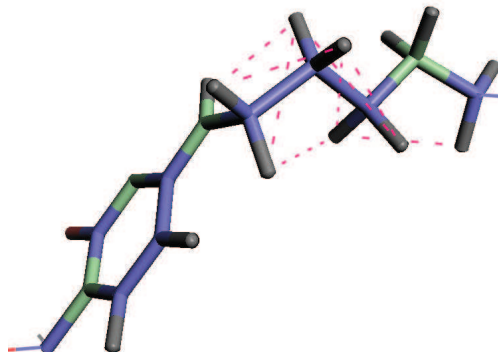


Rys. 29. Region H2/H6/H8-/H3'/H4'/H5'/H5'' w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu B w D₂O (600 MHz, 25 °C). W widmie zaznaczona została sekwencyjna ścieżka H6/H8(i)-H3'(i)-H6/H8(i+1) – kolorem zielonym dla jednej nici, natomiast fioletowym – dla drugiej nici.



Rys. 30. Region H2'/H2''/Sp-H2'/H2''/Sp w widmie 2D NOESY ($\tau_m = 400$ ms) dupletu B w D₂O (600 MHz, 25 °C) z wyróżnionymi sygnałami korelacyjnymi pomiędzy protonami H2'/H2''-H2'/H2'' (kolor żółtoczerwony). Niebieskimi prostokątami zaznaczono protony sperminy które zostały przypisane; fioletowymi prostokątami protony sperminy, których nie udało się przypisać.

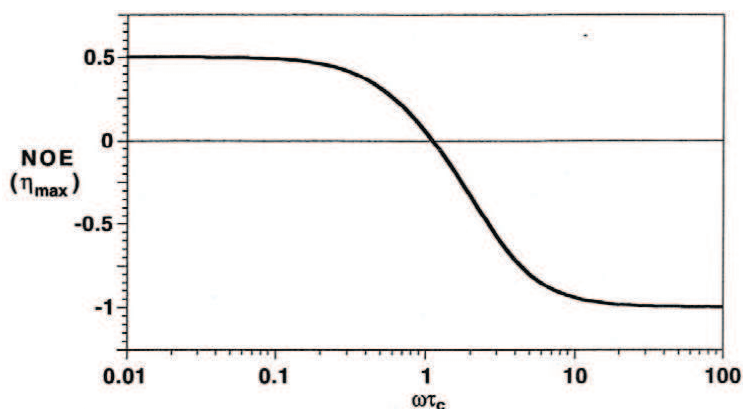
W przydiagonalnym rejonie H2'/H2'' widma 2D NOESY dupleksu B (rys. 30) obserwowałam dodatkowo sygnały pochodzące od protonów reszty sperminy. W widmie obserwowałam zarówno sygnały pochodzące od oddziaływań pomiędzy protonami reszty sperminy (rys. 31) jak i te pomiędzy protonami sperminy a resztą cząsteczki DNA (rys. 27 i 28).



Rys. 31. Schemat obserwowanych w widmie 2D NOESY sygnałów pochodzących od oddziaływań pomiędzy protonami łańcucha sperminy.

Na rysunku 31 przedstawiłam obserwowane oddziaływania pomiędzy protonami łańcucha aminopropylenowego reszty sperminy i protonami H5 i H6 reszty dC^{Sp}. Dla czytelności rysunku nie zaznaczyłam oddziaływań pomiędzy geminalnymi protonami grup metylenowych łańcucha sperminy.

Na rysunku 30, niebieskimi prostokątami zaznaczyłam te sygnały pochodzące od protonów sperminy, które udało się jednoznacznie przypisać (tabela 8). Sygnałów od pozostałych protonów łańcucha, nie udało się przypisać z uwagi na ich silne nakładanie. Sygnały te zostały zaznaczone na rysunku 30 fioletowymi prostokątami. Należy zwrócić uwagę, że sygnały pochodzące od protonów sperminy mają różną fazę. Przeciwna faza sygnałów, zaznaczonych na fioletowo, sugerowała, że część łańcucha sperminy wykazuje większą ruchliwość konformacyjną niż fragment łańcucha sperminy związany bezpośrednio z resztą deoksycytydyny.



Rys. 32. Wykres zależności współczynnika wzmocnienia (η) NOE od czasu korelacji (τ_c) i częstości rezonansowej (ω).

Wynika to bezpośrednio z zależności współczynnika wzmocnienia (η) NOE od czasu korelacji (τ_c) i częstości rezonansowej (ω). Czas korelacji τ_c określa czas w jakim cząsteczka lub jej fragment wykonuje obrót o kąt równy 1 radianowi ($360^\circ/2\pi$).

Jak widać na rysunku 40 przedstawiającym zależność maksymalnego wzmocnienia NOE od $\omega\tau_c$ efekt ten jest ujemny dla dużych cząsteczek, czyli takich, dla których jest spełniony warunek:

$$\omega\tau_c \gg 1$$

natomiast dla małych cząsteczek, gdzie spełniony jest tzw. warunek granicznego zwężenia:

$$\omega\tau_c \ll 1,$$

efekt ten jest dodatni.

W tabeli 9 przedstawione są sygnały pochodzące od protonów sperminy, które udało się jednoznacznie przypisać, natomiast w tabeli 10 zebrane są sygnały pochodzące od oddziaływań NOE pomiędzy protonami sperminy a resztą cząsteczki.

Tabela 9. Wartości przesunięć chemicznych δ (^1H) sygnałów sperminy.

Atomy wodoru sperminy	Wartość przesunięcia δ (ppm)
SpCH ₂ (1)	2,67
	1,99
SpCH ₂ (2)	1,72
	1,62
SpCH ₂ (3)	3,10
	2,91
SpCH ₂ (1')	1,85

Tabela 10. Efekt NOE obserwowany dla atomów wodoru łańcucha sperminy w widmach 2D NOESY.

Reszta sperminy	Obserwowane sygnały korelacyjne	Intensywność sygnału korelacyjnego*
SpCH ₂ (1)	C ^{Sp} -H5	s
	C ^{Sp} -H6	m
	G11-H8	w
	SpCH ₂ (2) SpCH ₂ (3)	s s
SpCH ₂ (2)	C ^{Sp} -H5	m
	SpCH ₂ (1) SpCH ₂ (3)	s s
	SpCH ₂ (3)	C ^{Sp} -H5
C13-H5		w
SpCH ₂ (1) SpCH ₂ (2)		s s
SpCH ₂ (1')		G4-H8 SpCH ₂ (3)

*s-silny; m-średni; w-słaby

Tabela 11. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) ^1H sygnałów dupleksu A.

Reszta	H6/H8	H2/H5/CH ₃	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	amino	imino
G1	7,96	—	6,00	2,77/2,77	4,8	4,22	3,86/3,8	* / *	*
T2	7,55	1,32	6,17	2,30/2,59	4,92	4,33	4,17/4,17	—	14,0
C3	7,44	5,61	5,81	1,90/2,41	4,84	4,14	4,19/ *	6,97/8,63	—
G4	7,92	—	5,49	2,74/2,72	4,99	4,35	4,06/4,12	* / *	13,15
G5	7,86	—	6,07	2,64/2,85	5,03	4,46	4,2/4,15	* / *	13,03
C6	7,37	5,39	5,9	1,97/2,46	4,79	4,16	4,15/4,3	6,78/8,26	—
T7	7,33	1,69	5,88	1,99/2,38	4,86	4,14	4,11/4,05	—	14,13
G8	7,94	5,94	6,17	2,63/2,39	4,70	4,18	4,09/4,11	* / *	*
C9	7,67	7,83	5,62	1,94/2,37	4,69	4,04	3,72/3,73	7,06/8,18	—
A10	8,27	—	6,05	2,76/2,92	5,04	4,40	4,00/4,13	* / *	—
G11	7,76	5,38	5,76	2,59/2,60	4,99	4,42	4,21/4,21	* / *	12,85
C12	7,58	5,6	6,09	2,06/2,52	4,84	4,16	4,27/4,06	- /8,47	—
C13	7,48	—	5,37	2,06/2,35	4,84	4,07	4,28/ *	6,97/8,67	—
G14	7,92	—	5,69	2,74/2,82	5,03	4,39	4,03/4,12	* / *	12,85
A15	8,14	7,95	6,26	2,62/2,89	5,00	4,44	4,24/4,24	* / *	—
C16	7,29	5,3	6,03	2,05/2,11	4,46	4,27	4,06/3,99	6,79/8,19	—

* Sygnały nie przypisane

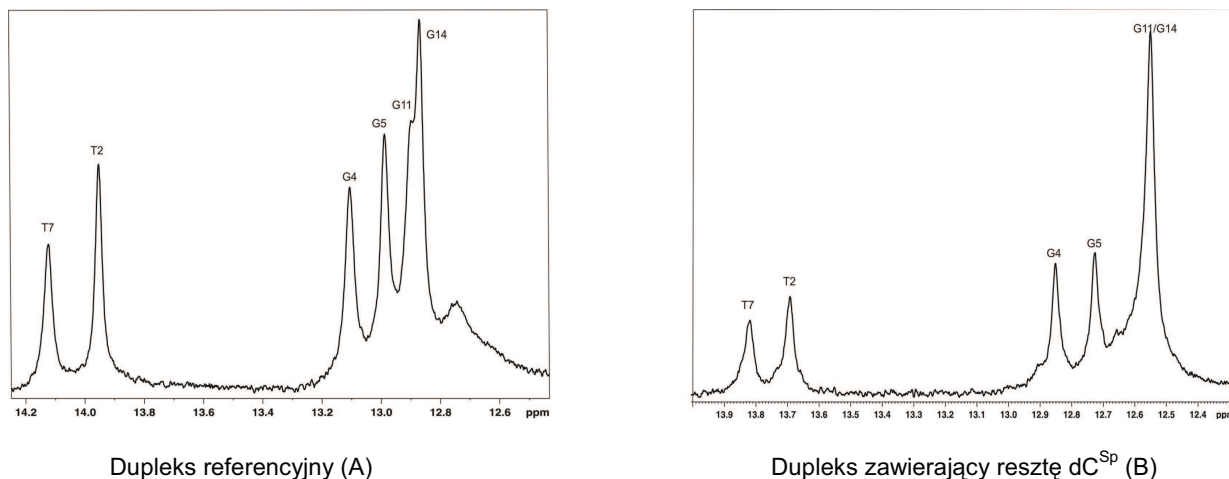
Tabela 12. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) ^1H sygnałów dupleksu B.

Reszta	H6/H8	H2/H5/CH ₃	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	amino	imino
G1	7,95	—	6,0	2,72/2,79	4,81	4,23	3,88/3,79	* / *	*
T2	7,51	1,35	6,16	2,24/2,56	4,92	4,31	4,15/4,15	—	13,99
C3	7,46	5,64	5,7	2,0/2,41	4,86	4,13	4,01	7,06/8,63	—
G4	7,9	—	5,63	2,7/2,75	5,01	4,35	4,11/4,01	* / *	13,14
G5	7,77	—	5,94	2,62/1,73	4,98	4,42	4,2/4,18	* / *	13,02
C6	7,39	5,32	5,93	2,01/2,47	4,77	4,18	4,23/4,11	6,69/8,25	—
T7	7,34	1,68	5,88	1,99/2,39	4,85	4,13	4,07/4,02	—	14,19
G8	7,92	—	6,17	2,66/2,37	4,7	4,17	4,08	* / *	*
C9	7,68	5,96	5,62	1,82/2,32	4,68	4,04	3,71/3,69	7,5/8,5	—
A10	8,28	7,86	5,98	2,8/2,9	5,04	4,38	3,97/4,11	* / *	—
G11	7,76	—	5,8	2,58/2,64	4,98	4,41	4,21/4,21	* / *	12,90
C12	7,35	5,26	5,96	2,04/2,45	4,8	4,22	4,05/4,16	6,42/8,16	—
C13	7,41	5,56	5,49	1,99/2,33	4,82	4,07	4,17	6,92/8,59	—
G14	7,91	—	5,61	2,71/2,77	5,00	4,35	4,02	* / *	12,93
A15	8,16	7,98	6,27	2,64/2,88	5,00	4,44	4,24/4,22	* / *	—
C16	7,31	5,32	6,03	2,07/2,13	4,46	4,00	4,27/4,05	6,43/8,17	—

* Sygnały nie przypisane

Analiza widm ^1H NMR w H_2O .

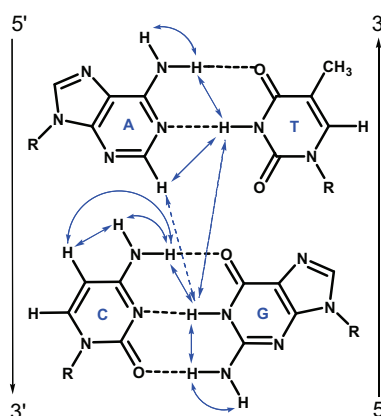
Informacje o typie tworzących się par zasad uzyskuje się dzięki analizie efektów NOE pochodzących od wymienialnych protonów zasad heterocyklicznych (rys. 34). W kwasach nukleinowych wymiana protonów aminowych i iminowych z otaczającą je wodą zachodzi bardzo szybko, nie można więc ich obserwować w widmach wykonanych w ciężkiej wodzie. Widma wykonuje się, dlatego w wodzie zwykłej z niewielkim dodatkiem wody ciężkiej (6-10%).



Rys 33. Fragment widma 1D ^1H NMR (600 MHz, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O) obejmujący zakres sygnałów pochodzących od protonów iminowych dupleksów A i B.

Dla obu badanych dupleksów sygnały pochodzące od protonów iminowych występują w zakresie 12,4 – 14,2 ppm. Jest to rejon charakterystyczny dla parowania zasad typu Watsona-Cricka (rys. 33 i 34).

Sygnały protonów iminowych pochodzących od par CG leżą w rejonie 12 ppm i są oddzielone od regionu protonów iminowych par zasad AT (ok. 13 ppm) (rys. 33 i 35).



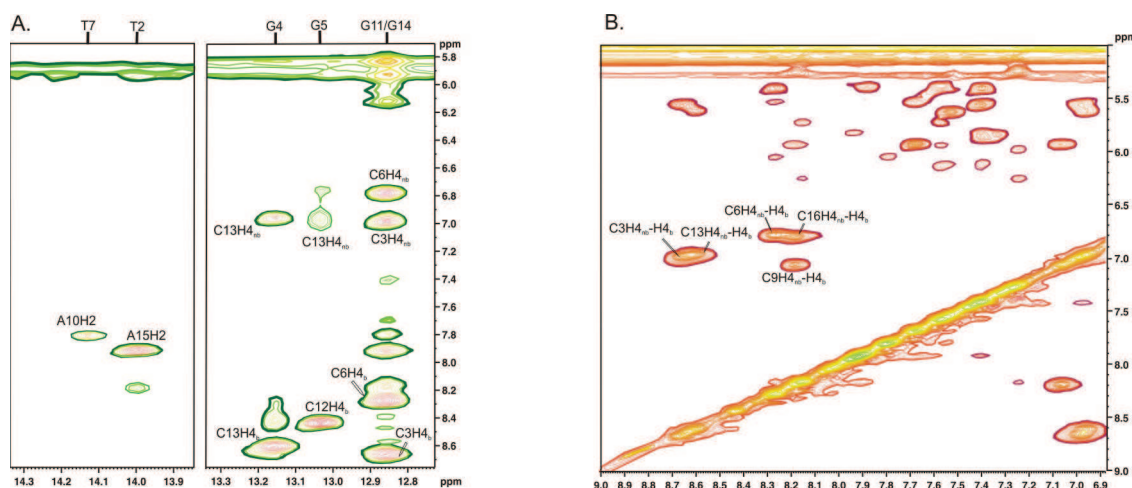
Rys 34. Schemat przedstawiający korelacje pochodzące od oddziaływań NOE dla protonów wymienialnych w kanonicznych parach Watsona-Cricka. Liniami przerywanymi zaznaczono oddziaływania internukleotydowe pomiędzy komplementarnymi parami zasad, linią ciągłą oddziaływania w obrębie par zasad.

Obserwacja w widmie 2D NOESY korelacji pomiędzy protonami iminowymi reszt deoksyguanozyny a protonami aminowymi reszt deoksycytydyny pomogła mi w ich identyfikacji,

gdyż protony aminowe leżą w tzw. odległości NOE do protonów H5, których przypisanie znalazłam z widm wykonanych w D₂O.

Sygnaly pochodzące od protonów iminowych par C6-G11 i C3-G14 w modyfikowanym dupleksie nakładaly się, natomiast w dupleksie referencyjnym sygnaly te są częściowo rozdzielone (rys. 33). Reszta dC^{Sp} posiada tylko jeden atom wodoru (N4H) zdolny do utworzenia wiązania wodorowego. W widmie 2D NOESY dla sygnału przy 8,45 ppm obserwowałam korelacje do protonów SpCH₂(1) i SpCH₂(2) reszty sperminy oraz do protonu iminowego przy 13,3 ppm i przypisałam go do protonu N4H (dC^{Sp}). Obecność oddziaływania N4H (dC^{Sp}) z protonem iminowym reszty G5 (13,3 ppm) świadczyła o istnieniu w strukturze dupleksu modyfikowanego pary dC^{Sp}-G5, w której wiązania wodorowe tworzą się na sposób Watsona-Cricka.

W widmie 2D NOESY modyfikowanego dupleksu widoczny jest sygnał od oddziaływań pomiędzy jednym z protonów grupy aminowej reszty C13, a protonem H1 reszty G5.



Rys 35. A. Zakres iminowo – aminowy widma 2D NOESY dupleksu B w H₂O/D₂O (600 MHz, 10 °C); B. region sygnałów korelacyjnych pochodzących od protonów aminowych.

Identyfikacja sygnałów grup aminowych reszt deoksycytydyny jest stosunkowo łatwa, ponieważ można je rozróżnić dzięki silnemu efektowi NOE pomiędzy geminalnymi protonami grupy aminowej. Wszystkie sygnały grup aminowych w dupleksach A i B zidentyfikowałam dzięki obserwacji wewnątrzcząsteczkowych korelacji z protonami H5 oraz międzycząsteczkowych oddziaływań NOE z komplementarną zasadą heterocykliczną. Protony uczestniczące w tworzeniu wiązań wodorowych leżą w zakresie 8,0-8,8 ppm, natomiast sygnały niezaangażowanych w wiązania wodorowe protonów aminowych reszt deoksycytydyny są mniej ekranowane i leżą w regionie 7 ppm. Brak w widmie NOESY sygnałów pochodzących od grup aminowych reszt deoksyguanozyny jest związany z pośrednią szybkością rotacji tych grup w skali czasu NMR, która powoduje poszerzenie sygnałów i utrudnia ich obserwacje.

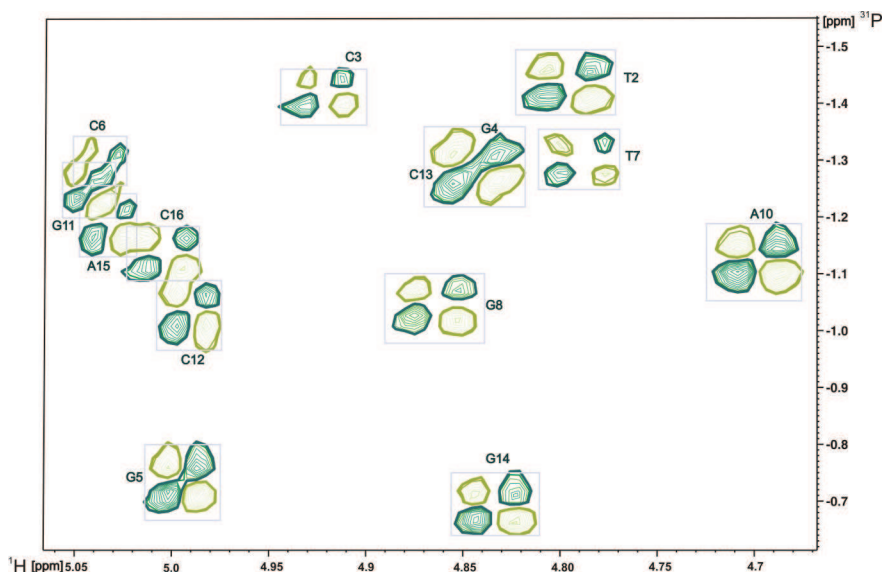
Sygnaly iminowe pochodzące od par T2-A15 i T7-A10 przypisałam na podstawie obserwowanych korelacji pomiędzy protonami iminowymi reszt T2 i T7 a protonami H2

komplementarnych reszt deoksyadenozyny. Obecność tych sygnałów w widmach NOESY również świadczy o zawiązywaniu się typowych par Watsona–Cricka. Sygnałów pochodzących od protonów iminowych reszt terminalnych nie można było przypisać, gdyż wymiana tych protonów z wodą jest bardzo szybka. Przesunięcia chemiczne poszczególnych protonów iminowych i aminowych mają zbliżone wartości (tabela 11 i 12) w obu badanych dupleksach. Wskazuje to, że przyjmują one podobne struktury. W widmie 2D NOESY modyfikowanego dupleksu widoczny jest sygnał od oddziaływań pomiędzy jednym z protonów grupy aminowej reszty C13, a protonem H1 reszty G5 z pary zasad C^{Sp}-G5.

Wartości przesunięć chemicznych protonów iminowych i aminowych dwóch badanych dupleksów umieściłam w tabelach 11 i 12.

Analiza widm ³¹P NMR

Eksperyment ¹H-³¹P HSQC posłużył mi nie tylko do przypisania sygnałów rezonansowych ³¹P, ale także pomógł wyznaczyć i potwierdzić słuszność przypisań protonów H3' w obu dupleksach (rys. 36). Ponadto analiza widm ¹H-³¹P HSQC pozwoliła na oszacowanie wartości stałych sprzężenia ¹H-³¹P.



Rys. 36. Widmo korelacyjne ¹H-³¹P NMR dupleksu B w D₂O (25°C) z zaznaczonymi sygnałami H3'_(i)-P_(i+1).

Najsilniejsze sygnały występujące w widmie ¹H-³¹P HSQC pochodzą od sprzężeń skalarnych H3'_(i)-P_(i+1). Dodatkowo obserwowałam dość silne, dobrze rozdzielone intranukleotydowe sygnały korelacyjne pomiędzy jądrami ³¹P a protonami H4' oraz, znacznie słabsze, od sprzężenia z protonami H5' i H5''.

Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ³¹P NMR analizowanych cząsteczek zamieszczone zostały w tabeli 13.

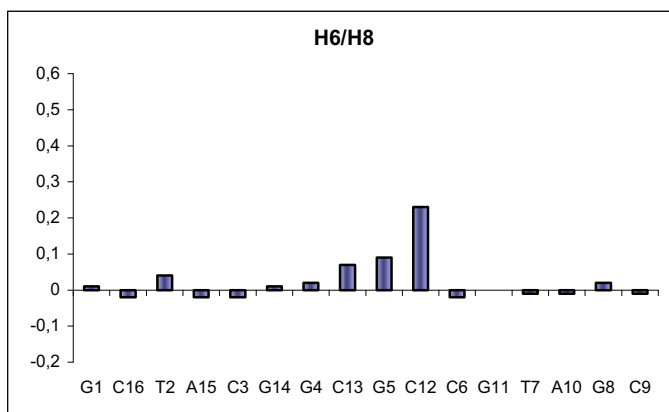
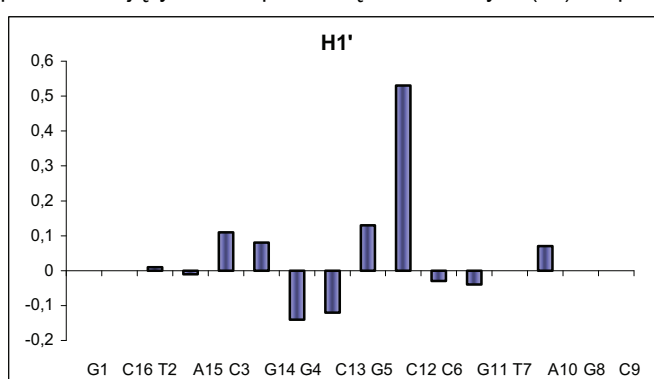
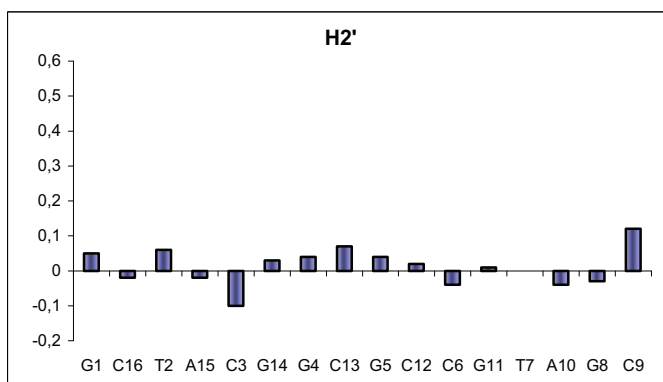
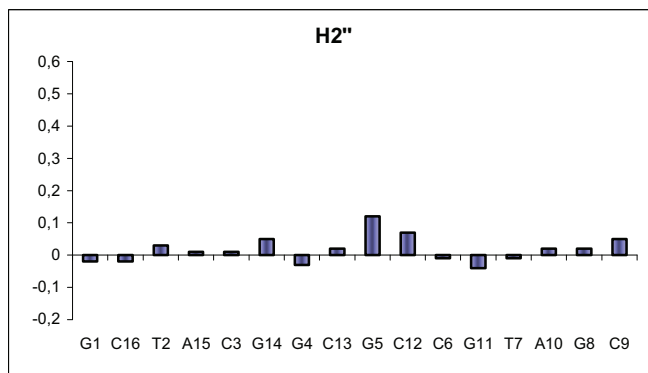
Tabela 13. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) sygnałów ^{31}P NMR (D_2O , 25 °C).

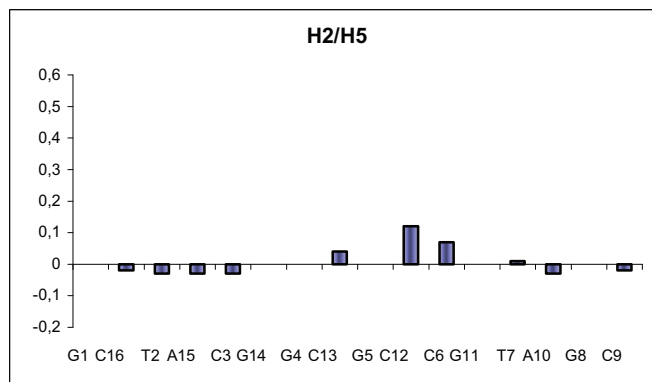
Reszta	^{31}P dupleks A	^{31}P dupleks B
G1	—	—
T2	-1,39	-1,43
C3	-1,28	-1,41
G4	-0,97	-1,3
G5	-1,03	-0,73
C6	-1,15	-1,29
T7	-1,31	-1,3
G8	-1,04	-1,04
C9	—	—
A10	-1,03	-1,13
G11	-1,16	-1,25
C12	-1,08	-1,04
C13	-1,19	-1,29
G14	-0,91	-0,69
A15	-1,11	-1,19
C16	-1,12	-1,13

3.2.2. Porównanie przesunięć chemicznych $\Delta\delta$ (^1H) i $\Delta\delta$ (^{31}P) dupleksu referencyjnego i zawierającego resztę dC^{SP}

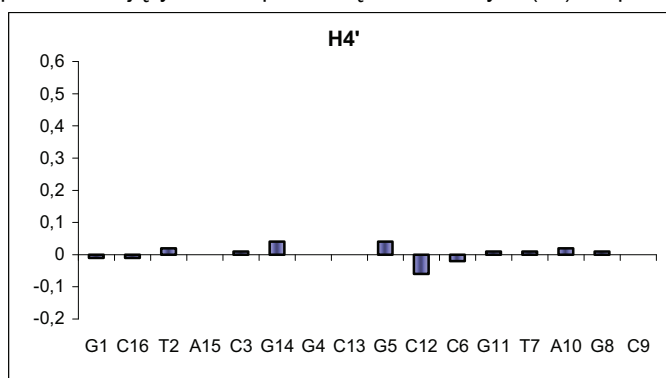
Wykresy 4 A-F przedstawiają różnice przesunięć chemicznych sygnałów ^1H dla dupleksu referencyjnego i modyfikowanego. Największe różnice przesunięć chemicznych obserwowałam dla protonów reszt w pozycji 12 oraz tych znajdujących się w sąsiedztwie. Największe bezwzględne wartości różnicy przesunięć chemicznych widoczne są dla protonów anomerycznych (wykres 4 B). Ponadto najsilniejszy efekt wywołany obecnością modyfikacji zaobserwowałam dla reszt G5, G4, C3 znajdujących się w nici komplementarnej do nici modyfikowanej. Dla pozostałych protonów (wykres 4 C, D, E, F) widoczne są tylko niewielkie zmiany w położeniu sygnałów obu dupleksów.

Obserwowane zmiany sugerowały, że łańcuch sperminy oddziałuje raczej z resztami znajdującymi się po stronie 3' od miejsca modyfikacji, niż po stronie 5'. Co dodatkowo potwierdziła analiza przesunięć chemicznych atomów fosforu (wykres 4 G).

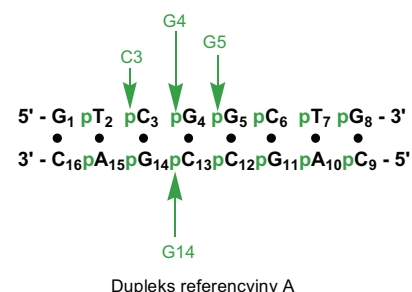
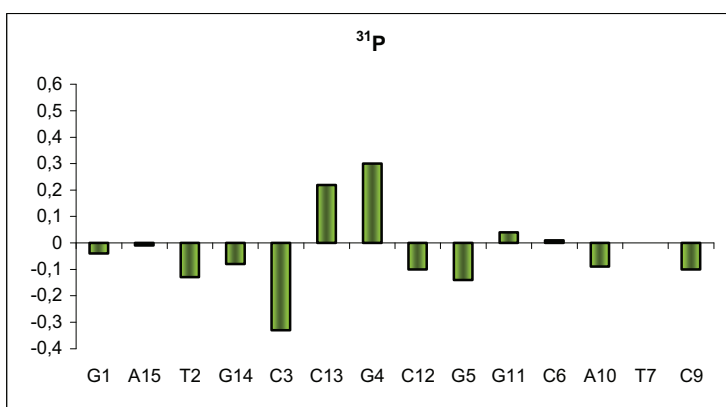
A) Wykres przedstawiający różnice przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) dla protonów H6/H8B) Wykres przedstawiający różnice przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) dla protonów H1'C) Wykres przedstawiający różnice przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) dla protonów H2'D) Wykres przedstawiający różnice przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) dla protonów H2''



E) Wykres przedstawiający różnice przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) dla protonów H2 i H5



F) Wykres przedstawiający różnice przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) dla protonów H4'



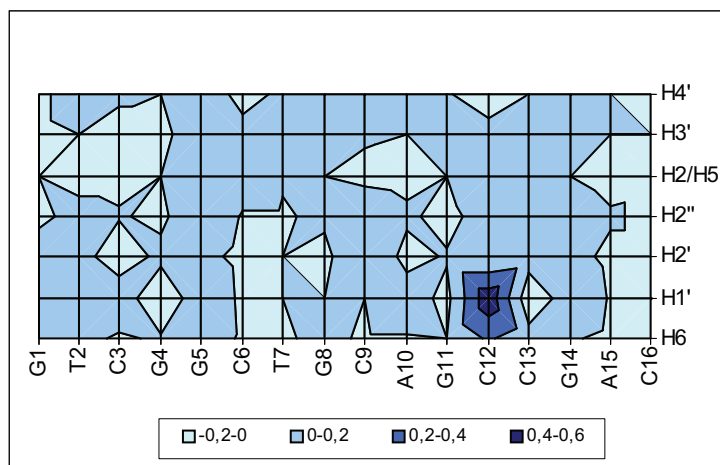
G) Wykres przedstawiający różnice przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) atomów fosforu

Wykres 4. Wykresy przedstawiające różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta$ (^1H) i $\Delta\delta$ (^{31}P) obu dupleksów.

Wykres 4 G przedstawia różnice przesunięć chemicznych obserwowanych dla atomów fosforu obu dupleksów. Jak widać, największe zmiany dotyczą atomów fosforu G4, G5 i G14 oraz w mniejszym stopniu reszt C3 i C13. Wszystkie te reszty znajdują się po stronie 3' modyfikacji i po stronie 5' łańcucha komplementarnego. Duże zmiany położenia sygnałów atomów fosforu mogą świadczyć o oddziaływaniu grup aminowych łańcucha sperminy ze szkieletem fosforanocukrowym DNA. Analiza wyżej przedstawionych wykresów sugeruje, że obserwowane

zmiany przesunięć chemicznych atomów fosforu mogą być związane z neutralizacją obdarzonych ujemnym ładunkiem grup fosforanowych modyfikowanego dupleksu.

Na wykresie 8 przedstawiłam rozkład statystyczny różnic przesunięć chemicznych wszystkich analizowanych protonów. Widać jednoznacznie, że największe różnice dotyczą tylko modyfikowanej reszty i jej najbliższego sąsiedztwa.



Wykres 5. Wykres przedstawiający rozkład statystyczny przesunięć chemicznych protonów w zależności od jednostki nukleotydowej w obu badanych dupleksach (kolor ciemnoniebieski oznacza miejsce największych zmian w położeniu sygnałów protonów).

3.2.3. Analiza konformacyjna. Więzy strukturalne

Odległości międzyprotonowe

Oddziaływania międzyjądrowe, które są czułe na małe zmiany struktury i konformacji cząsteczki, wpływają na położenie, kształt i intensywności sygnałów w widmie NMR. Jednym z istotnych etapów procesu ustalania struktury przestrzennej kwasów nukleinowych metodą NMR jest wyznaczenie więzów strukturalnych. Dokładność oraz liczba otrzymanych eksperymentalnie więzów istotnie wpływają na poprawność i jakość uzyskiwanych struktur. W metodzie NMR powszechnie wykorzystuje się dwa rodzaje więzów eksperymentalnych. Są to więzy odległościowe proton-proton, które otrzymujemy z pomiaru jądrowego efektu Overhausera (NOE, ang. *Nuclear Overhauser Effect*) i więzy na kąty torsyjne, które można ustalić na podstawie analizy wicynalnych stałych sprzężenia spinowo-skalarne. Do więzów drugiego rodzaju należą np. więzy na planarność zasad, czy więzy na wiązania wodorowe. Jeżeli z danych eksperymentalnych możemy odczytać typowe cechy struktur kanonicznych B czy A-DNA, wówczas możemy narzucić *a priori* dla danego fragmentu kwasu nukleinowego więzy charakterystyczne dla danej formy.

Efekt NOE nazywamy zjawisko zmiany natężenia sygnału NMR pochodzącego do spinów jądrowych I_0 w wyniku wyprowadzenia ze stanu równowagi termodynamicznej oddziałujących z nim dipolowo spinów X.

Wielkość tego oddziaływania określa współczynnik wzmocnienia NOE – η :

$$\eta_A(X) = \Delta I/I_0$$

gdzie: ΔI jest zmianą intensywności sygnału NMR spinów A spowodowana zakłóceniem równowagi spinów X; I_0 oznacza intensywność sygnału spinów A w układzie niezaburzonym. Wielkość współczynnika wzmocnienia η związana jest odległością międzyjądrową r zależnością:

$$\eta \sim f(\tau_c)/r^6$$

gdzie $f(\tau_c)$ jest funkcją czasu korelacji τ_c . Efekt NOE może być obserwowany tylko wtedy, gdy badane jądra znajdują się w odległości nie większej niż 5–6 Å.

Jedną z metod wyznaczania odległości międzyprotonowych polega na pomiarze objętości sygnałów korelacyjnych widma 2D NOESY i porównaniu ich z wartościami objętości sygnałów wzorca. Jako sygnały wzorcowe przyjmuje się takie, które pochodzą od oddziaływań pomiędzy protonami o znanej odległości, niezależnej od konformacji cząsteczki, np. H5-H6 pirymidyn ($d_{H5H6} = 2,45$ Å).

Odległości między dwoma protonami można wyznaczyć korzystając z zależności

$$d_{ij} = \left(\frac{A_{wz}}{A_{ij}} \right)^{\frac{1}{6}} d_{wz}$$

gdzie A_{wz} i A_{ij} są odpowiednio objętościami sygnałów wzorca i sygnału NOE dla pary protonów $i-j$, a d_{wz} jest odległością między protonami pary odniesienia.

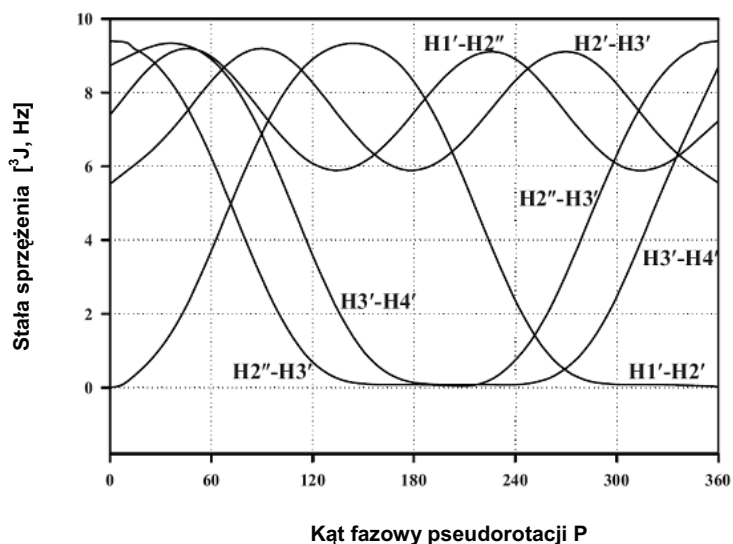
Do wyznaczenia odległości międzyprotonowych wykorzystałam widmo 2D NOESY z czasem mieszania 150 ms. Korzystając z programu FELIX przeprowadziłam optymalizację sygnałów korelacyjnych dopasowując kształty opisane funkcją Lorentza do kształtów wyznaczonych eksperymentalnie. Wielkość wzmocnienia NOE można wyznaczyć porównując otrzymane objętości do tzw. objętości sygnału referencyjnego. Dla cząsteczek DNA jako sygnały wzorcowe możemy wykorzystać sygnały korelacyjne pochodzące od par protonów H5-H6 (2,46 Å) pirymidyn lub H2'-H2'' (1,8 Å) deoksyrybozy. W swoich badaniach jako sygnały wzorca wykorzystałam oddziaływania pomiędzy protonami H2'-H2'' ponieważ były one dobrze rozdzielone i posiadały niezaburzone kształty. W widmach 2D NOESY wykonywanych z krótkim czasem mieszania (≤ 150 ms) niektóre sygnały korelacyjne protonów H5-H6 były zniekształcone. Nie mogły więc zostać użyte jako sygnały wzorca. Ponieważ sygnały korelacyjne występują po obu stronach diagonalnej a rozdzielczość widm eksperymentalnych jest różna w kierunkach F1 i F2, wszystkie sygnały H2'-H2'', które użyłam jako sygnały wzorca, uśredniłam. Na podstawie integracji przydiagonalnych sygnałów NOE otrzymałam więzy na odległości międzyprotonowe. Dolne i górne granice więzów otrzymałam przyjmując odpowiednio -15% i +30% mierzonej odległości. Atomy wodoru grup metylowych reszt tymidyny, protony H5' i H5'' reszty cukrowej oraz protony metylenowe w łańcuchu sperminy zdefiniowałam jako pseudoatomy. Dla

pseudoatomów górny zakres więzów wewnątrzcząsteczkowych zwiększyłam o 0,6 Å, a więzów międzycząsteczkowych o 1 Å.

Na podstawie widm 2D NOESY wykonanych w mieszaninie 90% H₂O/10% D₂O stwierdziłam, że wszystkie zasady uczestniczą w zawiązywaniu typowych par Watsona-Cricka. Obserwacja ta pozwoliła mi na wyprowadzenie więzów na wiązania wodorowe oraz planarność par zasad. Pomiędzy atomami parujących się par zasad zadałam więzy z granicą błędu ±0,2 Å.

Analiza konformacji pierścieni cukrowych

W kwasach nukleinowych pierścien cukrowy przyjmuje różne konformacje. Typową dla regularnych struktur A-RNA jest konformacja C3'-*endo*, natomiast charakterystyczną konformacją dla struktur B-DNA jest konformacja C2'-*endo*. Konformacja pierścienia cukrowego może być wyznaczona z analizy homojądrowych sprzężeń skalarnych 3J .¹⁰³ Wykorzystując zróżnicowane wielkości $^3J(H1', H2')$, $^3J(H2'', H3')$ oraz $^3J(H3', H4')$ możemy stwierdzić jaką formę DNA lub RNA przyjmuje fragment kwasu nukleinowego.



Rys. 37 Wykres zależności pięciu wicynalnych stałych sprzężenia $^1H-^1H$ w pierścieniu deoksyrybozy od kąta pseudorotacji P.¹⁰³

Na rysunku 37 pokazana jest zależność wicynalnych stałych sprzężenia od kąta fazowego pseudorotacji P. Jak widać na wykresie, w charakterystycznej dla formy B-DNA konformacji typu S ($160 \pm 20^\circ$), wartości stałej sprzężenia $^3J(H1', H2')$ są zawsze większe niż sprzężenia $^3J(H1', H2'')$. Ponadto dla tej konformacji obserwuje się małe wartości sprzężeń $^3J(H2'', H3')$.

Konformację deoksyrybozy reszt nukleotydowych wyznaczyłam w oparciu o analizę widm E.COSY. W widmie E.COSY dupletu referencyjnego dla reszt T2, C3, G5, T7, C9, C12, C13, A15 obserwowałam dobrze rozdzielone sygnały korelacyjne pomiędzy protonami H1'-H2'' i H1'-H2'. Zmierzone dla tych reszt wartości stałych sprzężenia $^3J(H1', H2')$ były większe niż $^3J(H1', H2'')$ i wyniosły odpowiednio ok. 9 Hz i ok. 6 Hz. Stąd mogłam założyć, że pierścienie

deoksyrybozy przyjmują typową konformację S, i w związku z tym wprowadziłam więzy na kąty torsyjne ($v_0 = -34,9 \pm 15^\circ$, $v_1 = 33,2 \pm 15^\circ$, $v_2 = -18 \pm 15^\circ$, $v_3 = -4,2 \pm 15^\circ$, $v_4 = 24,9 \pm 15^\circ$).

Dla reszt G1, C6, G8, A10, C16 różnica wartości stałych sprzężenia pomiędzy protonami H1'-H2'' i H1'-H2' była bardzo mała, co wskazywało, że znajdują się one w równowadze konformacyjnej S \leftrightarrow N a dla reszt G4, G11, G14 z uwagi na nakładanie się sygnałów nie mogłam wyznaczyć wartości $^3J(\text{H1}', \text{H2}')$ i $^3J(\text{H1}', \text{H2}'')$. Dla żadnej z tych reszt nie nałożyłam więzów na kąty torsyjne pierścienia deoksyrybozy. W duplesie modyfikowanym obserwowałam dobrze rozdzielone sygnały H1'-H2'' i H1'-H2' reszt T2, C3, G8, C9, A10, C12, C13, A15. Umożliwiło mi to wprowadzenie stałych sprzężenia $^3J(\text{H1}', \text{H2}')$ ok. 9 Hz i $^3J(\text{H1}', \text{H2}'')$ ok. 6 Hz oraz wprowadzenie więzów torsyjnych na konformację S. Na reszty G1, G4, G11, G14, C16, dla których nie udało się wyznaczyć stałej sprzężenia, nie nałożyłam żadnych więzów.

Wiązanie N-glikozydowe – analiza kątów torsyjnych

Kąt wokół wiązania glikozydowego (χ) określa orientację zasady heterocyklicznej w stosunku do pierścienia deoksyrybozy. W większości struktur kwasów nukleinowych zasada heterocykliczna przyjmuje orientację *anti* w stosunku do pierścienia cukrowego, a wartość kąta χ zawiera się w przedziale -180° do $+90^\circ$. Konformacja *anti* jest typowa dla formy B-DNA, A-DNA i A-RNA.

Orientacje zasad heterocyklicznych wokół wiązania glikozydowego dla badanych dupleksów ustaliłam na podstawie analizy widm 2D NOESY. Wielkość efektu NOE pomiędzy protonami H6/H8 a protonem anomerycznym różni się znacznie dla konformacji *syn* i *anti*. Zmierzone objętości sygnałów H6/H8-H1' odpowiadały odległością 3,4-3,8 Å. W przypadku konformacji *syn* odległość ta mieściłaby się w granicach 2-2,5 Å, a objętość sygnałów korelacyjnych między protonami H6/H8-H1' oraz protonami H5-H6 byłaby porównywalna. Dla dwóch H6/H8-H1' terminalnych reszt, obserwowałam silniejsze sygnały NOE, co mogło wynikać z większej swobody konformacyjnej końców dupleksu. Obecność sygnałów korelacyjnych H6/H8-H2' i H6/H8-H3' oraz możliwość wyznaczenia dla nich nieprzerwanych ścieżek NOE były kolejnym potwierdzeniem konformacji *anti*.

Na podstawie wyżej opisanych obserwacji mogłam wprowadzić więzy na kąty χ w zakresie $-119 \pm 90^\circ$.

Więzy na kąty torsyjne szkieletu fosforanocukrowego

Kąt α , zdefiniowany przez wiązania pomiędzy atomami O3'_(i-1)-P_i-O5'_i-C3'_i, oraz kąt ξ pomiędzy atomami C3'_i-O3'_i-P_{i+1}-O5'_{i+1} nie mogą być bezpośrednio wyznaczone na podstawie analizy wartości sprzężeń skalarnych, ponieważ w przyrodzie nie występuje izotop tlenu o spinie 1/2. Jedynym źródłem informacji o tych kątach są przesunięcia chemiczne jąder fosforu ^{31}P . W widmach heterojądrowych ^1H - ^{31}P HSQC dupleksu referencyjnego i dupleksu zawierającego resztę dC^{Sp}, wszystkie sygnały ^{31}P znajdują się w przedziale od -0,5 do -1,5 ppm, charakterystycznym dla konformacji B-DNA. Na tej podstawie możliwe było nałożenie luźnych

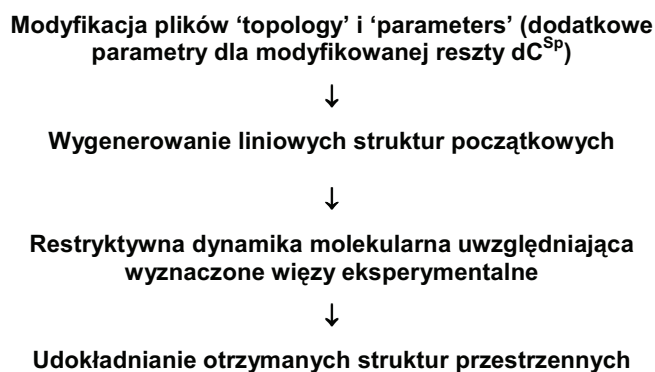
więzów na kąt α w zakresie $-58 \pm 90^\circ$ wykluczając konformację *trans* oraz luźnych więzów dla kąta ξ w zakresie $-91 \pm 120^\circ$. W modyfikowanym dupleksie nie nakładałam żadnych więzów na kąty α i ξ reszty dC^{Sp}.

Kąt β wyznaczony przez atomy P_i-O5'_i-C5'_i-C4'_i i kąt torsyjny ε (C4'_i-C3'_i-O3'_i-P_{i+1}) można określić analizując heterojądrowe sprzężenia skalarne pomiędzy atomem fosforu P_i, a atomami wodoru H3'_{i-1}, H4'_i, H5'_i oraz H5''_i. Dla wszystkich reszt obu analizowanych dupleksów w widmach ¹H-³¹P HSQC obserwowałam intensywne sygnały korelacyjne pochodzące od oddziaływań H3'_{i-1}-P_i, które wskazywały na duże wartości stałych sprzężeń ³J (H3'_{i-1}-P_i).

Wartość stałej sprzężenia ⁴J(P_n-H4'_n) zależy od konformacji fragmentu cząsteczki wyznaczonego przez atomy P_i-O_i-C5'_i-C4'_i-H4'_i. Kiedy fragment ten przyjmuje konformację planarną zbliżoną kształtem do litery 'W', wówczas sprzężenia te są największe (ok. 3 Hz). Takie ułożenie atomów w kształcie litery 'W' jest możliwe tylko wtedy, gdy atomy tworzące kąt β przyjmują konformację *trans*, a atomy tworzące kąt γ znajdują się w konformacji *gauche*⁺. Na widmach ¹H-³¹P HSQC obserwowałam sygnały korelacyjne P_n-H4'_n, co pozwoliło mi wprowadzić odpowiednie więzy dla kąta β w zakresie $180 \pm 90^\circ$. Swobodne więzy w zakresie $180 \pm 120^\circ$ zadałam dla kąta ε . Z uwagi na brak silnych sygnałów pochodzących od sprzężeń H4'-H5'/H5'' wartości kąta γ ograniczyłam do zakresu $41 \pm 60^\circ$. Dla reszty dC^{Sp} nie nałożyłam żadnych więzów na kąt β i ε .

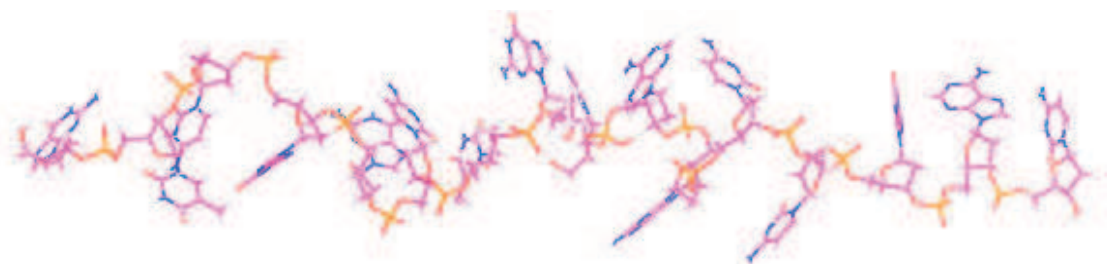
3.2.4. Restryktywna dynamika molekularna

Więzy odległościowe i kątowe otrzymane z analizy widm NMR wykorzystałam do ustalenia struktur przestrzennych analizowanych dupleksów. Do obliczeń stosowałam algorytm dynamiki molekularnej w przestrzeni kątów torsyjnych TAMD (ang. *Torsion Angle Molecular Dynamics*)¹⁰⁴ zaimplementowany w programie Xplor-NIH.¹⁰⁴ Algorytm ten jest używany w celu skrócenia czasu obliczeń, ponieważ pozwala na zmniejszenie liczby stopni swobody badanego układu poprzez zastąpienie współrzędnych kartezjańskich odpowiednimi wartościami kątów torsyjnych. Proces ustalania struktury odbywał się według przedstawionego poniżej schematu:



Aby możliwe było wygenerowanie odpowiednich struktur dla cząsteczki zawierającej modyfikowaną resztą dC^{Sp} należało uprzednio zmodyfikować pole siłowe CHARM,¹⁰⁵ które jest wykorzystywane w pakiecie Xplor-NIH. Dla modyfikowanej reszty deoksycytydyny należało wprowadzić odpowiednie parametry opisujące atomy wchodzące w skład cząsteczki sperminy oraz typ tych atomów, uwzględnić wiązania kowalencyjne i ich długość, wartości kątów i ładunków cząstkowych, wyznaczonych za pomocą programu MOPAC.¹⁰⁶ Odpowiednio zmodyfikowane pole siłowe (nucleic-2.0_CSp.par) przygotował na potrzeby moich obliczeń dr Łukasz Popenda modyfikując standardowo używane pole siłowe CHARM.

Pierwszy etap modelowania polegał na wygenerowaniu 100 przypadkowych, liniowych struktur charakteryzujących się prawidłową geometrią wiązań kowalencyjnych i chiralnością atomów węgla (rys. 39).



Rys. 39. Początkowa struktura liniowa dupleksu referencyjnego.

Dla każdej z uzyskanych struktur przeprowadziłam obliczenia zgodnie z protokołem TAMD, którego poszczególne etapy umieściłam w tabeli 13.

Tabela 13. Protokół dynamiki symulowanego wyżarzania w przestrzeni kątów torsyjnych.

	Etap 1	Etap2	Etap3	Etap4
	Dynamika wysokotemperaturowa	Powolne schładzanie w przestrzeni kątów torsyjnych	Powolne schładzanie w układzie kartezyjskim	Minimalizacja metodą gradientów sprzężonych
Temperatura	20 000 °K	20 000 °K ⇒ 300 °K	3000 °K ⇒ 300 °K	–
Liczba iteracji	8000	10000	6000	1200
Krok całkowania	0,008 ps	0,007 ps	0,003 ps	–
Δt	64 ps	70 ps	18 ps	–
W_{NOE}	2 ⇒ 75	100	125	200
W_{dihedral}	100	100	200	200
W_{vdW}	5 ⇒ 0,3	0,3 ⇒ 1,0	1,0	1,0

Δt – czas trwania poszczególnych etapów dynamiki;
 W_{NOE} – stałe siłowe na więzy NOE;
 W_{dihedral} – stałe siłowe na kąty torsyjne;
 W_{vdW} – stałe siłowe na oddziaływania van der Waalsa.

Końcowe struktury otrzymałam po przeprowadzeniu tzw. procesu udokładniania, w trakcie, którego wprowadziłam dodatkowe więzy na planarność (*ORIE*) i więzy RAMA, które ograniczały odpowiednio wzajemne odległości reszt zasad oraz zakresy kątów torsyjnych.¹⁰⁷

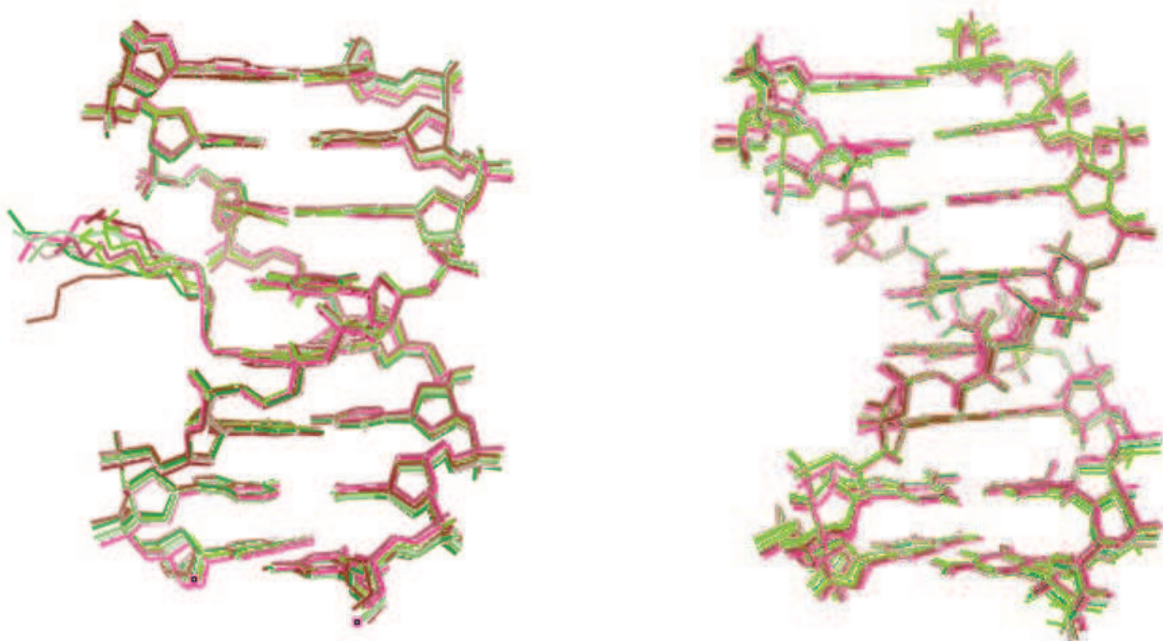
Obliczenia prowadziłam z wykorzystaniem 350 więzów odległościowych wyznaczonych dla dupleksu referencyjnego (tabela 14 A) i 331 więzów dla dupleksu modyfikowanego (tabela 14 B). Statystyka wszystkich więzów eksperymentalnych wziętych do obliczeń struktur obu dupleksów zawarta jest w tabeli 14. Podczas procesu udokładniania z wyjściowych 100 struktur otrzymałam 81 struktur dupleksu referencyjnego i 69 struktur dupleksu modyfikowanego, które nie miały pogwałconych żadnych więzów odległościowych ($\leq 0,3 \text{ \AA}$) ani kątowych ($\leq 5^\circ$).

Dalszą analizę prowadziłam dla wybranych 10 struktur o najniższej energii. Struktury dupleksu referencyjnego jak i modyfikowanego wykazują znaczne podobieństwo i należą do jednej rodziny. Rysunek 40 przedstawia nałożenie 10 struktur o najniższej energii dla dupleksu modyfikowanego i referencyjnego.

Dla rodziny 10 struktur dupleksu referencyjnego obliczyłam wartości RMSD (średnie wartości odchylenia standardowego; ang. *root mean square deviation*). Średnia wartość RMSD obliczona dla wszystkich atomów wynosi $0,33 \pm 0,09 \text{ \AA}$, natomiast RMSD obliczona dla wszystkich atomów niebędących protonami wynosi $0,26 \pm 0,1 \text{ \AA}$. Podobne obliczenia przeprowadziłam dla 10 struktur dupleksu zawierającego resztę dC^{Sp}. Wartość parametru RMSD dla wszystkich atomów (z uwzględnieniem atomów łańcucha sperminy) wynosi $2,63 \pm 1,6 \text{ \AA}$ a dla atomów niebędących protonami $0,36 \pm 0,1 \text{ \AA}$. Wartości RMSD wyznaczona dla rodziny 10 struktur dupleksu modyfikowanego (bez uwzględniania atomów łańcucha sperminy) wynosi $0,42 \pm 0,11$ z uwzględnieniem atomów wodoru, natomiast bez uwzględniania atomów wodoru wynosi $0,37 \pm 0,12$.

Tabela 14. Statystyka więzów wziętych do obliczeń.

Dupleks modyfikowany	Rodzaj więzów	Dupleks referencyjny
331	Całkowita liczba więzów NOE:	350
246	Intranukleotydowe	265
86	Internukleotydowe	85
48	Więzy na wiązania wodorowe:	48
16	Więzy na planarność:	16
155	Więzy na kąty torsyjne:	159
84	szkieletu fosfodiestrowego	88
55	deoksyrybozy	55
16	wiązania glikozydowego	16
20,6	Średnia liczba więzów NOE przypadająca na resztę nukleotydową:	21,85
30,37	Średnia liczba więzów NOE oraz więzów na kąty torsyjne przypadająca na resztę nukleotydową:	31,81



Rys. 40. Superpozycja rodziny 10 struktur o najniższej energii dupleku modyfikowanego (po lewej) oraz dupleku referencyjnego (po prawej). Widok od strony małej bruzdy.

3.2.5. Analiza struktury dupleku zawierającego resztę dC^{Sp}; Porównanie ze strukturą dupleku referencyjnego

Porównanie przesunięć chemicznych badanych dupleków, wskazywało na ich duże podobieństwo strukturalne (rozdział 3.2.2). Zarówno dupleks referencyjny jak i modyfikowany tworzą prawoskrętne, podwójne helisy, w których zasady heterocykliczne przyjmują orientację *anti* w stosunku do reszty cukrowej, a pary zasad są typu Watsona–Cricka. Analiza kątów torsyjnych przeprowadzona dla rodziny 10 struktur o najniższej energii pokazała, że wartości te nie różnią się od wartości typowych dla form B-DNA. Analizę tę wykonałam w oparciu program CURVES.¹⁰⁸ Średnie wartości kątów α , β , γ , δ , ϵ , ζ i χ oraz kątów fazowych pseudorotacji P i pofałdowania pierścieni cukrowych ψ , wraz z odchyleniami standardowymi, zebrałam w tabeli 15.

Tabela 15. Średnie wartości kątów torsyjnych łańcuchów fosfodiesterowych (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), kąta glikozydowego (χ) oraz parametru opisującego konformację pierścieni cukrowych (P) obliczonych dla obu dupleksów. W nawiasach podane zostały wartości odchylenia standardowego.

Dupleks referencyjny

Reszta	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ	P
G1	—	—	59.6 (1.5)	114.5 (1.8)	—	—	-136,6 (1,6)	114,1 (2,9)
T2	-52,1 (1,1)	-162,1 (0,6)	32,9 (1,4)	137,9 (0,3)	-182,3 (1,4)	-86,8 (0,7)	-106,5 (0,8)	164,0 (0,4)
C3	-68,4 (1,2)	-164,4 (0,7)	49,7 (0,7)	135,9 (0,4)	-187,6 (0,8)	-97,2 (1,3)	-106,6 (0,9)	166,6 (1,2)
G4	-63,2 (1,1)	-187,1 (2,2)	58,3 (1,6)	131,3 (0,9)	-168,4 (1,8)	-102,5 (2,5)	-104,4 (1,6)	142,1 (1,4)
G5	-62,1 (1,1)	-177,0 (1,8)	58,3 (1,4)	140,1 (0,5)	-186,7 (0,5)	-108,1 (1,3)	-105,5 (1,1)	165,5 (0,4)
C6	-71,5 (1,6)	-172,6 (1,4)	60,3 (1,2)	145,5 (0,5)	-188,9 (0,7)	-101,7 (1,2)	-108,7 (1,2)	168,3 (1,0)
T7	-75,6 (1,4)	-157,4 (1,9)	53,3 (0,5)	137,8 (0,2)	-184,1 (1,4)	-103,8 (1,1)	-101,5 (1,2)	166,6 (0,3)
G8	-67,5 (1,5)	-178,4 (0,8)	54,5 (0,9)	141,7 (0,8)	-176,3 (1,3)	-106,5 (1,1)	-94,8 (0,6)	171,2 (1,7)
C9	—	—	55,7 (1,6)	142,2 (1,4)	—	—	-124,5 (2,0)	186,3 (4,4)
A10	-70,4 (1,2)	-178,7 (1,0)	54,0 (0,9)	138,3 (0,3)	-168,4 (1,0)	-96,4 (1,3)	-95,3 (0,7)	164,5 (0,3)
G11	-66,9 (1,4)	-180,7 (0,9)	56,1 (1,1)	129,8 (0,5)	-185,0 (0,9)	-93,9 (1,1)	-113,8 (1,0)	140,2 (1,0)
C12	-60,0 (0,8)	-178,5 (1,8)	58,9 (0,7)	143,4 (1,3)	-182,8 (1,2)	-113,3 (1,5)	-114,8 (1,6)	168,8 (1,2)
C13	-73,4 (2,5)	-157,9 (1,8)	53,0 (1,0)	136,7 (0,3)	-186,7 (1,8)	-100,8 (0,6)	-102,7 (0,8)	173,4 (2,4)
G14	-62,5 (0,8)	-189,6 (2,0)	58,4 (1,3)	124,3 (0,4)	-173,8 (1,9)	-97,7 (0,8)	-112,0 (0,7)	133,3 (0,8)
A15	-63,7 (0,6)	-173,7 (1,2)	55,7 (1,0)	142,1 (0,4)	-188,2 (0,6)	-98,2 (0,9)	-107,5 (0,4)	165,0 (0,3)
C16	-81,5 (2,1)	-183,5 (2,3)	55,1 (1,6)	88,4 (1,0)	-177,1 (1,2)	-97,0 (1,3)	-135,3 (1,2)	60,7 (4,1)
Średnia:	-67,0 (1,2)	-174,4 (1,4)	54,6 (1,15)	133,12 (0,7)	-181,2 (1,2)	-100,3 (1,2)	-110,6 (1,0)	153,1 (1,5)

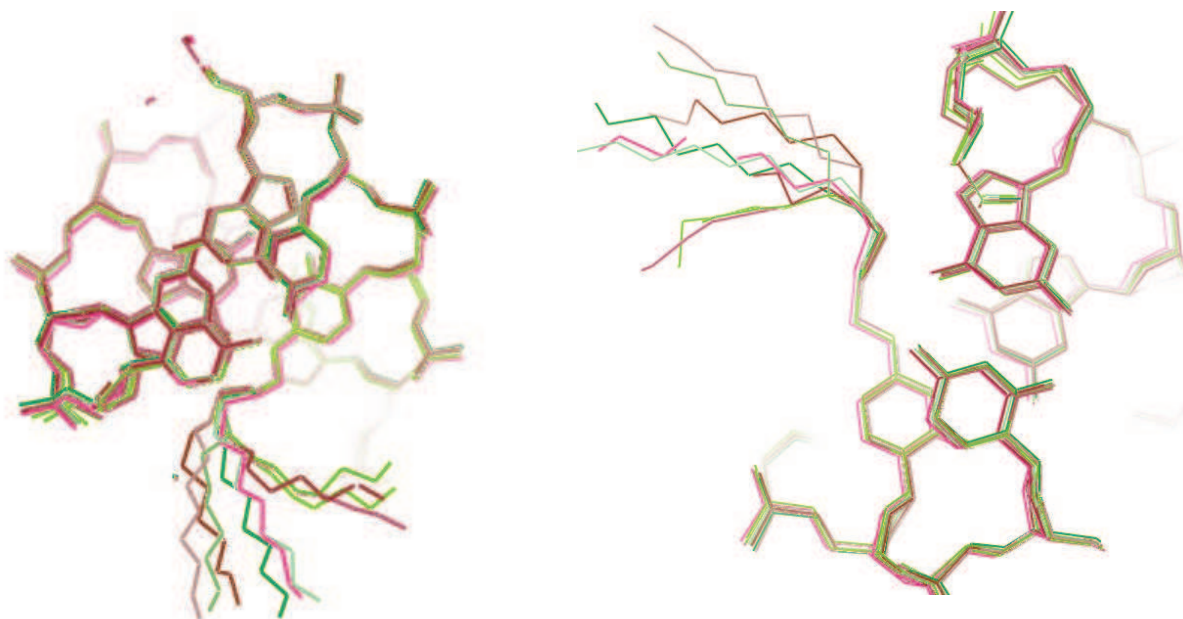
Dupleks zawierający resztę dC^{Sp}

Reszta	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ	P
G1	—	—	57,5 (2,1)	141,7 (0,5)	—	—	-111,9 (1,8)	165,0 (0,9)
T2	-64,2 (1,7)	-163,2 (1,4)	50,0 (1,4)	139,1 (1,4)	-191,3 (1,6)	-100,5 (1,2)	-110,4 (1,4)	163,6 (0,6)
C3	-71,1 (3,3)	-161,1 (5,3)	51,6 (1,4)	140,6 (1,9)	-187,4 (4,1)	-100,2 (2,0)	-114,9 (1,7)	172,6 (5,5)
G4	-62,6 (5,1)	-196,8 (2,2)	64,4 (2,6)	142,6 (2,3)	-168,2 (4,0)	-121,5 (6,1)	-106,4 (1,8)	168,2 (6,2)
G5	-62,6 (3,2)	-173,9 (2,6)	57,8 (1,7)	141,7 (1,2)	-188,0 (1,9)	-107,7 (4,9)	-110,2 (1,7)	167,1 (1,8)
C6	-73,3 (2,5)	-168,9 (2,3)	55,8 (0,5)	138,6 (0,6)	-183,4 (1,4)	-98,8 (1,1)	-114,9 (2,2)	165,7 (1,2)
T7	-55,2 (1,4)	-159,1 (3,5)	42,6 (1,3)	142,8 (1,6)	-194,3 (1,6)	-90,1 (0,8)	-103,0 (1,3)	169,8 (4,2)
G8	-77,3 (2,5)	-176,4 (2,6)	56,6 (0,9)	140,9 (1,1)	-170,5 (2,7)	-106,9 (1,1)	-92,0 (1,9)	170,6 (2,6)
C9	—	—	61,9 (2,1)	139,2 (1,2)	—	—	-115,7 (2,8)	171,6 (4,8)
A10	-74,5 (3,0)	-185,1 (2,0)	53,7 (0,7)	138,0 (0,5)	-167,1 (2,5)	-105,6 (1,9)	-97,5 (0,8)	165,0 (0,4)
G11	-63,8 (1,9)	-171,6 (1,7)	63,0 (1,4)	134,0 (0,6)	-192,6 (0,9)	-98,8 (1,2)	-109,2 (1,3)	165,2 (0,5)
C12	-71,5 (1,9)	-171,5 (2,9)	50,4 (2,0)	145,6 (1,1)	-186,8 (1,9)	-105,3 (1,7)	-109,7 (2,2)	171,6 (2,2)
C13	-69,3 (1,4)	-151,3 (3,5)	58,5 (2,0)	136,9 (0,6)	-197,0 (1,7)	-90,0 (1,5)	-114,1 (2,4)	166,9 (0,9)
G14	-64,7 (1,4)	-188,0 (2,6)	53,4 (1,6)	140,6 (0,7)	-172,6 (2,0)	-107,0 (3,2)	-101,7 (3,3)	164,0 (0,6)
A15	-66,4 (2,3)	-177,0 (2,9)	58,0 (0,6)	137,2 (0,5)	-178,9 (2,3)	-114,2 (2,4)	-111,2 (1,5)	166,8 (1,0)
C16	-62,8 (1,9)	-181,4 (3,6)	57,7 (2,8)	131,6 (1,7)	-187,2 (2,2)	-96,7 (1,4)	-117,6 (1,4)	146,8 (3,0)
Średnia:	-67,1 (2,4)	-173,2 (2,8)	55,8 (1,5)	132,1 (1,1)	-183,2 (2,2)	-103,1 (2,2)	-108,8 (1,8)	166,3 (2,3)

W obu dupleksach wartości większości kątów torsyjnych są zbliżone do standardowych kątów kanonicznych struktur B-DNA¹⁰³ (tabela 15). Jedynym wyjątkiem jest konformacja pierścienia cukrowego terminalnej reszty C16. W duplesie referencyjnym w większości obliczonych struktur przyjmuje ona konformację O4'-egzo. Na pierścień cukrowy reszty C16 nie nakładałam żadnych więzów, więc konformacja O4'-egzo może być wynikiem wpływu pola siłowego.

Główne różnice pomiędzy dwiema podstawowymi formami A-RNA i B-DNA polegają na odmiennej konformacji pierścienia cukrowego oraz innych przesunięciach zasad względem siebie (ang. *x-displacement*) i ich orientacji względem osi duplesu (ang. *Inclination*). Różna jest również odległość pomiędzy sąsiednimi parami zasad (ang. *rise*). W badanych dupleksach wszystkie reszty deoksyrybozy przyjmują konformację typu S, a średnie wartości parametrów $x\text{-disp} = -0,59 \text{ \AA}$, $rise = 3,37 \text{ \AA}$ i $ln = -0,58^\circ$ są charakterystyczne dla struktur B-DNA.

W wyniku utworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy atomem węgla C4 deoksycytydyny a poliaminą, łańcuch sperminy umiejscowiony jest w dużej bruzdzie (rys. 40). Rysunek 41 przedstawia widok wzdłuż osi duplesu dla rodziny 10 struktur. Można na nim wyraźnie zaobserwować, że konformacja łańcucha aminopropylenowego sperminy związanego bezpośrednio z deoksycytydyną jest bardzo podobna we wszystkich strukturach. Natomiast pozostała część łańcucha sperminy jest konformacyjnie dużo bardziej zróżnicowana.



Rys. 41. Konformacja łańcucha sperminy dla rodziny 10 struktur o najniższej energii. Widok wzdłuż osi helisy.

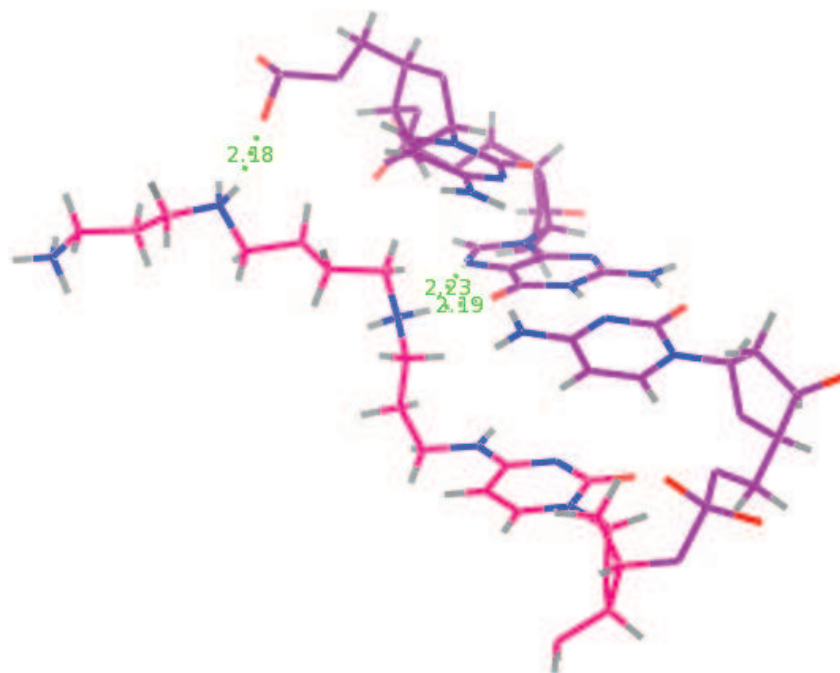
Zróżnicowanie konformacyjne może być wynikiem niedostatecznej liczby więzów strukturalnych dostępnych z widm NMR lub odzwierciedlać dynamiczny charakter tego fragmentu cząsteczki. Brak więzów eksperymentalnych może być także spowodowany taką orientacją tej części sperminy, że żaden należący do niej atom wodoru nie znajduje się wystarczająco blisko atomów wodoru cząsteczki DNA, aby można było zaobserwować efekt NOE. Jak już wcześniej

wspominałam, w widmach 2D NOESY zauważyłam, że niektóre sygnały korelacyjne pochodzące od łańcucha sperminy miały fazę przeciwną do sygnałów diagonalnych. Sugerowało to, że niektóre jego fragmenty reorientują się dużo szybciej niż cała cząsteczka. Obserwacje te są zgodne z otrzymanymi z obliczeń strukturami, co dodatkowo potwierdza konformacyjnie dynamiczną naturę łańcucha sperminy.



Rys. 42. Położenie łańcucha sperminy wobec szkieletu cukrowo-fosforanowego w modyfikowanym duplesie. Widok od strony dużej bruzdy.

Chociaż część łańcucha sperminy charakteryzuje stosunkowo duża swoboda konformacyjna, jednak analiza otrzymanych struktur wyraźnie uwidacznia pewne jego tendencje. We wszystkich strukturach łańcuch sperminy podąża w kierunku 5' nici nie zawierającej modyfikacji układając się wzdłuż jej krawędzi fosforanocukrowej (rys. 42). Pomiędzy jednym z atomów wodoru grupy $\text{SpNH}_2(\alpha)$ i atomami tlenu O6 i azotu N7 reszty G4 zawiązuje się prawdopodobnie wiązanie wodorowe (rys. 43), które w znacznym stopniu przyczynia się do stabilizacji struktury. W widmach NMR, nie udało się niestety zaobserwować sygnałów grup aminowych łańcucha sperminy. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów nie było możliwe wnioskowanie o istnieniu tego typu oddziaływań. Chciałabym jednak podkreślić, że podczas obliczeń nie narzucałam żadnych więzów na te wiązania wodorowe. Potwierdzeniem zawiązywania się wiązania wodorowego może być analiza przesunięć chemicznych atomów fosforu δ (^{31}P) (rozdział 5.1.2). Największe zmiany przesunięć chemicznych atomów fosforu obserwowałam właśnie dla reszty G4, która w otrzymanej strukturze jest zaangażowana w tworzenie wiązania wodorowego z $\text{SpNH}_2(\alpha)$.



Rys. 43. Wiązania wodorowe pomiędzy grupą $\text{SpNH}_2(\alpha)$ a atomami tlenu O6 i azotu N7 reszty G4, sugerowane na podstawie obliczeń dynamiki molekularnej i ^{31}P NMR.

Dodatkowym czynnikiem stabilizującym taką konformację reszty sperminy mogą być oddziaływania pomiędzy grupą aminową $\text{SpNH}_2(\beta)$ a atomem tlenu reszty fosforanowej C3. Wniosek ten potwierdzają również obserwacje uzyskane z analizy widm NMR, gdzie widoczne były różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta$ (^{31}P) dla reszty C3.

Uśredniona z pomiarów w roztworze dynamiczna struktura sperminy, wskazuje na elektrostatyczny model oddziaływań pomiędzy resztą sperminy a cząsteczką DNA.

Należy podkreślić, że zarówno dane eksperymentalne jak i wyniki pochodzące z obliczeń dynamiki molekularnej jednoznacznie wskazują na określony model oddziaływań pomiędzy łańcuchem sperminy a resztą cząsteczki. Zarówno tendencja do układania się łańcucha sperminy jak i tworzenie wiązania wodorowego są konsekwencją charakteru obdarzonej dodatnimi ładunkami poliaminy i nie zostały wymuszone przez parametry użyte w obliczeniach.

3.3. Synteza amidofosforynów analogów poliaminodeoksyrybonukleozydów

Odkrycia biologii molekularnej i zrozumienie procesów biologicznych na poziomie molekularnym wywiera istotny wpływ na rozwój medycyny. Jedną z dróg prowadzących do lepszego poznania tych mechanizmów, jest wykorzystanie modyfikowanych makrocząsteczek. Jak wspomniałam w części literaturowej badania modyfikowanych kwasów nukleinowych dostarczają narzędzi do badania procesów zachodzących w żywych organizmach jak również do opracowania nowych leków i czynników terapeutycznych. Poliaminy odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu komórek eukariotycznych i prokariotycznych. Nie można również nie wspomnieć o ich roli jako czynników diagnostycznych czy użyteczności w wielu doświadczalnych podejściach terapeutycznych, zwłaszcza jako czynniki stabilizujące zarówno struktury dwuniciowe jak i trójniciowe kwasów nukleinowych.

Badania prowadzone w Pracowni Chemii Biokoniugatów IChB PAN pozwoliły otrzymać nową klasę związków, są to poliaminooligonukleotydy. Przebadaliśmy zarówno ich właściwości termodynamiczne jak i strukturalne. Nowym wyzwaniem było zaprojektowanie i opracowanie wydajnej i prostej metody syntezy analogów poliaminonukleotydy oraz przebadanie ich użyteczności w aspekcie biologicznym. Celem badań był nie tylko wybór odpowiednich substytutów pierścienia rybozy, ale i zaprojektowanie szlaku syntetycznego o pewnych cechach uniwersalności. Postanowiłam tak zaprojektować warunki syntezy, aby część szlaku mogła być wykorzystana do wszystkich pochodnych poliamin.

Zmiany struktury nukleotydu, takie jak brak zasady heterocyklicznej i części pierścienia cukrowego prowadzą do szkieletu, który odznacza się dużą swobodą konformacyjną. Nie wyklucza to możliwości przyjmowania przez tak zmieniony związek konformacji typowych dla reszt β -D-2'-deoksyfuranozydów. Z drugiej jednak strony taki analog nie może uczestniczyć w parowaniu zasad i oddziaływaniach warstwowych, czyli jest pozbawiony dwóch podstawowych czynników, które wpływają na trwałość dupleksów/tripleksów DNA/RNA. Struktura łącznika zastępująca nukleozyd pomiędzy dwoma wiązaniami internukleotydy, ma zasadnicze znaczenie dla jego właściwości. Może mieć duży wpływ na trwałość struktury drugorzędowej kwasów nukleinowych zawierających tak zmodyfikowane jednostki, obniżając ją lub zwiększając we współdziałaniu z pozostałymi składowymi analogu. Ponadto, należy rozważyć jak zminimalizować niekorzystny efekt braku parowania zasad i czy można to osiągnąć przez wprowadzenie cząsteczki funkcyjnej np. sperminy. Kolejnym istotnym czynnikiem był wybór takich reagentów, aby synteza była prowadzona bez nakładu dużych środków.

Projektowanie nowych modyfikowanych oligonukleotydy jest przedsięwzięciem trudnym, w którym należy uwzględnić zarówno chemiczne, elektronowe jak i steryczne właściwości używanych substratów i otrzymywanych półproduktów. Powinny one także umożliwiać wydajną syntezę zaplanowanego produktu końcowego.

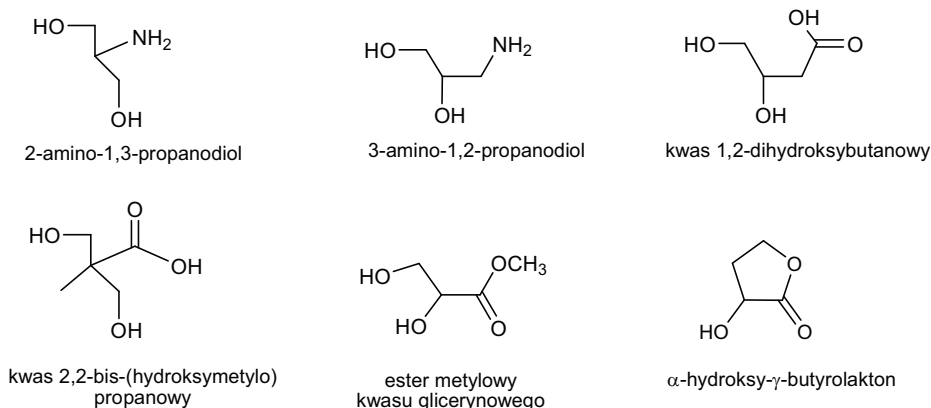
3.3.1. Projektowanie łączników

Potrzeba projektowania nowych nienukleozydowych analogów wynika z szerokiego wachlarza zastosowań w biologii molekularnej czy diagnostyce medycznej. Pamiętać jednak należy o wielu ograniczeniach, związanych z wprowadzeniem modyfikowanych jednostek.



Schemat 17. Struktura rybozy oraz jej wybranego analogu.

Wiele struktur acyklicznych analogów nukleozydów otrzymuje się w wyniku formalnej utraty niektórych atomów pierścienia cukrowego. Tak modyfikowane oligonukleotydy wykazują często zwiększoną odporność na hydrolizę enzymatyczną, ale również niższą stabilność termiczną.¹⁰⁹ Z przeglądu badań opisanych w literaturze,^{55-57,59-63,69} wynika, że najlepiej sprawdzają się dwu- lub trójwęglowe łańcuchy będące substytutem naturalnie występującej rybozy (schemat 17). Taki układ przestrzenny łącznika pozwala zminimalizować powstałe po włączeniu modyfikacji, ewentualne zaburzenia oddziaływań wodorowych i warstwowych w komplementarnych niciach DNA. Wśród najbardziej popularnych reagentów zawierających szkielet 1,2- i 1,3-diolowy są pochodne przedstawione na schemacie 18.



Schemat 18. Struktura kilku wybranych łączników.

Dodatkowo, należy zwrócić na uwagę na takie czynniki jak rzędowość grupy hydroksylowej, która będzie poddawana reakcji fosfitylacji, czy liczba potencjalnych miejsc stereogenicznych. Achiralny łącznik wpływa istotnie na czystość syntezy i izolację produktów. Wybierając strukturę analogu zwracałam uwagę zarówno na długość łańcucha metylenowego pomiędzy grupami hydroksylowymi, za pomocą, których miały być włączony do oligonukleotydu jak również czystość otrzymywanych pochodnych. Projektując drogi syntezy brałam pod uwagę

wpływ różnych czynników strukturalnych i właściwości chemiczne związków, które miałam otrzymać w kolejnych etapach syntezy. Wybrałam łączniki różniące się długością łańcucha metylenowego pomiędzy grupami hydroksylowymi będącymi substytutem pozycji 5' i 3' rybozy. Wzięłam pod uwagę zarówno układ 1,2-diolowy (pochodne kwasu glicerynowego) jak i układ 1,3-diolowy (kwas Bis-MPA oraz α -hydrokso- γ -lakton). Wykorzystałam oba enancjomery estru metylenowego kwasu glicerynowego (Schemat 18), żeby się przekonać jak konfiguracja łącznika wpływa na zdolność wiązania się nienukleozydowego analogu, do nici oligomeru. Kwas 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowy był interesujący ze względu na występujące w nim ugrupowanie metylowe w pozycji α do grupy karboksylowej, które miało wprowadzać dodatkowy efekt steryczny do koniugatu DNA i być substytutem protonu H4' rybozy (schemat 18). Zamierzałam również zbadać właściwości fizykochemiczne otrzymanych analogów poliaminonukleotydów i ich wpływ na trwałość dupleksów DNA.

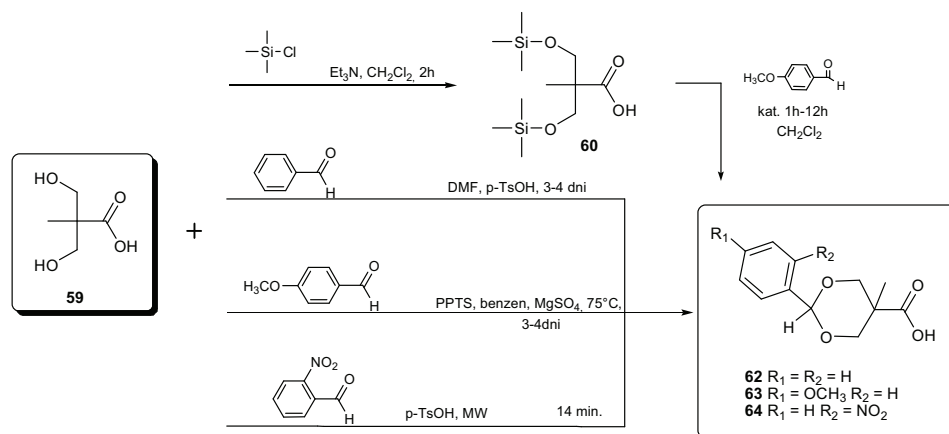
3.3.2. Synteza poliaminowych pochodnych kwasu 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowego (Bis-MPA)

3.3.2.1. Grupy ochronne funkcji hydroksylowych

Poszukując w literaturze odpowiedniego łącznika, zainteresowałam się możliwościami wynikającymi ze struktury kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propanowego (**59**), który dość szeroko wykorzystywany jest w syntezie dendrymerów¹⁰⁶ oraz analogów nukleozydów^{58,59}. W cząsteczce Bis-MPA występują wolne grupy hydroksylowe i grupa karboksylowa. Planowanie syntezy należało rozpocząć od znalezienia odwracalnej grupy ochronnej funkcji hydroksylowych, by selektywnie przeprowadzić reakcję grupy karboksylowej z poliaminą. Odpowiednia grupa ochronna powinna spełniać następujące warunki: dać się wprowadzić i usunąć z możliwie wysoką wydajnością, być stabilna w warunkach przeprowadzanych reakcji, a w tym przypadku, co okazało się kluczową sprawą, powinna także umożliwiać detekcję otrzymywanych pochodnych poliaminowych podczas analizy za pomocą chromatografii cienkowarstwowej.

Jako pierwszą postanowiłam przetestować blokadę trimetylosililową (TMS), która jest dobrze poznana i powszechnie wykorzystywana do czasowej ochrony funkcji hydroksylowych i aminowych w syntezie nukleozydów i nukleotydów. W tym celu posłużyłam się procedurą,¹¹⁰ w której roztwór kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propanowego, poddaje się reakcji z dwukrotnym nadmiarem chlorku trimetylosililu w obecności trójetyloaminy (schemat 19). Po dwugodzinnej reakcji otrzymałam kwas 2,2-bis(trimetylosililometylo)propanowy (**60**). Strukturę produktu **60** potwierdziłam za pomocą spektroskopii ¹H NMR. Otrzymany związek zdecydowałam się wykorzystać do otrzymania putrescynowej pochodnej kwasu hydroksypropionowego (patrz rozdział 6.1.2.2). Jednak utrudniona kontrola przebiegu reakcji za pomocą TLC wynikająca z braku grupy chromoforowej, niska trwałość blokad trimetylosililowych w warunkach wodnych oraz niska wydajność reakcji z aminą, skłoniły mnie do poszukiwania innych grup ochronnych funkcji hydroksylowych.

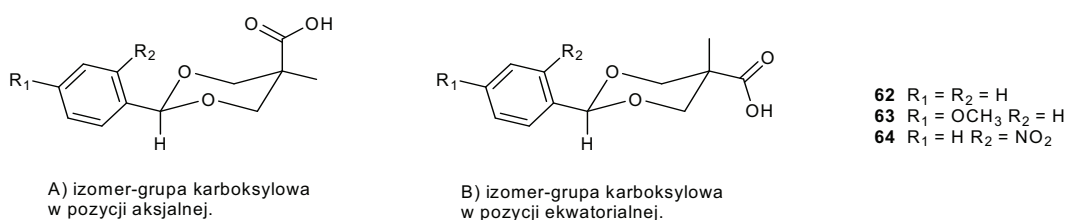
Wśród wielu metod wprowadzania grup ochronnych funkcji hydroksylowych, dość popularna, w przypadku 1,3-dioli, jest reakcja cyklizacji z utworzeniem 2-podstawionego 1,3-dioksanu.



Schemat 19. Poszukiwania grupy ochronnej funkcji hydroksylowych.

Wybór aldehydów benzoesowych wydawał się trafny, przede wszystkim ze względu na potencjalną łatwość wprowadzania, możliwość detekcji w świetle UV i trwałość w różnych warunkach stosowanych w syntezie organicznej. Należało dodatkowo rozpatrzyć mechanizm usunięcia tak, by nie doszło do rozkładu otrzymanej pochodnej poliaminowej. Grupy benzylidenowe można usuwać zarówno w warunkach kwasowych, jak i w hydrogenolitycznych. Obie metody są tanie i nie są skomplikowane. Pierwszą reakcję przeprowadziłam z aldehydem benzoesowym chcąc otrzymać związek (62) (schemat 19). Substraty razem z katalityczną ilością kwasu^{111,112} p-toluenosulfonowego rozpuściłam w bezwodnym DMF i pozostawiłam na 3 dni w temperaturze pokojowej (schemat 19). Reakcję zakończyłam przez neutralizację za pomocą NH₄OH/EtOH. Otrzymałam acetal 62 z wydajnością 77%. Zablokowanie funkcji hydroksylowych grupą benzylidenową prowadzi do utworzenia układu cyklicznego – 2,5-dipodstawionego 1,3-dioksanu. Związki cykliczne, aby osiągnąć wolne od naprężeń rozmieszczenie atomów w przestrzeni przyjmują określoną konformację. Najkorzystniejszą energetycznie konformacją cyklicznego układu sześciopięciowego jest konformacja krzesłowa, co powoduje, że podstawniki w pierścieniu zajmują dwa rodzaje położeń: położenia aksjalne i położenia ekwatorialne. Dla dwupodstawionych 1,3-dioksanów położenie podstawników w pierścieniu zależy od ich wzajemnych oddziaływań sterycznych i dipolowych.¹¹³ W wyniku reakcji kwasu 2,2-bis-(hydroksymetylo)propionowego z aldehydem benzoesowym otrzymałam mieszaninę izomerów (w stosunku 2:1), które różnią się położeniem grupy karboksylowej i metylowej przy atomie węgla, znajdującego się w pozycji α do grupy karbonylowej (schemat 20). W izomerze, który występuje w przewodzie (schemat 20, izomer B) grupa benzylidenowa i karboksylowa znajdują się w pozycjach ekwatorialnych. Grupa metylowa zajmuje pozycję aksjalną. W izomerze, który powstał

w mniejszej ilości niekorzystną pozycję aksjalną zajmuje grupa karbonylowa, natomiast grupa metylowa znajduje się w pozycji ekwatorialnej. Mieszaninę izomerów rozdzieliłam i strukturę obu izomerów potwierdziłam za pomocą spektroskopii NMR i MS.



Schemat 20. Izomery pochodnych benzylidenowych.

Zablokowanie funkcji hydroksylowych miało być pomocne w selektywnym wprowadzeniu poliaminy do cząsteczki kwasu. Mając na uwadze, że utworzenie układu cyklicznego zmienia właściwości grupy karbonylowej funkcji karboksylowej musiałam sprawdzić czy grupa karbonylowa będzie łatwo dostępna w reakcji substytucji nukleofilowej. Analiza przestrzenna obu izomerów wskazywała, że dostępność grupy karbonylowej w reakcji tworzenia amidu powinna być podobna (schemat 20). Mogłam, więc założyć, że efektywność tworzenia wiązania amidowego będzie zależała od skutecznej aktywacji grupy karboksylowej. Pomimo niedogodności związanych z występowaniem mieszaniny izomerów postanowiłam nie rezygnować z pochodnych benzylidenowych. Umożliwiają one nie tylko detekcję w świetle UV otrzymywanych związków, ale ich znaczna lipofilowość ułatwia izolację i oczyszczanie produktów.

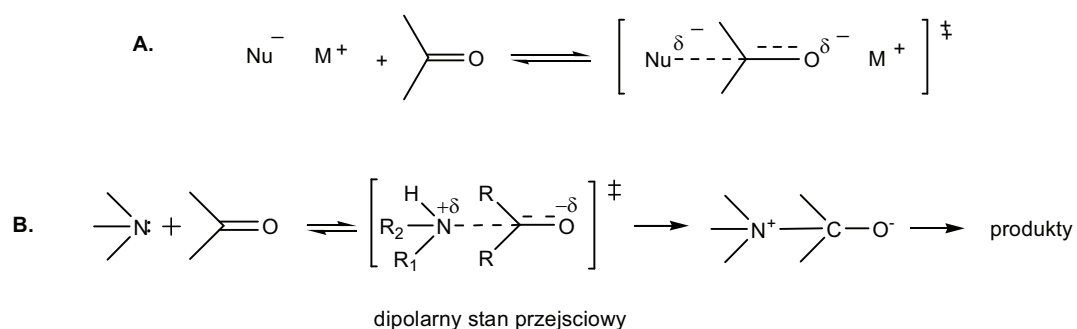
Głównym celem syntetycznym było otrzymanie odpowiednich amidofosforynów pochodnych sperminy i putrescyny, które mogłyby być włączone do oligonukleotydu. W związku z tym blokowanie grup hydroksylowych, za pomocą grupy benzylidenowej miało charakter czasowy. Należało, więc opracować procedurę odblokowania, która w prosty i wydajny sposób pozwoliłaby otrzymać związki z wolnymi grupami OH. Etap usunięcia grup ochronnych z funkcji hydroksylowych prowadziłam po zablokowaniu funkcji aminowych poliamin, co opisałam w rozdziale 3.3.5. Grupy benzylidenowe ulegają rozszczepieniu za pomocą bezpośredniej hydrogenolizy lub hydrolizy w środowisku kwasowym. Postanowiłam sprawdzić obie metody wykonując odpowiednie eksperymenty. Jako pierwszą testowałam metodę odblokowania w środowisku kwasowym,¹¹⁴ przygotowując 6 M roztwór kwasu solnego w etanolu, do którego dodałam pochodną putrescynową Bis-MPA (**67**). Reakcję prowadziłam w temperaturze pokojowej, jednak ze względu na zbyt powolny proces odblokowania postanowiłam podwyższyć temperaturę ogrzewając mieszaninę reakcyjną do temperatury wrzenia rozpuszczalnika, w którym była prowadzona reakcja. Po 4 dniach prowadzenia reakcji zakończyłam ją, mimo że kontrola TLC wskazywała na obecność substratu. Zdecydowałam się przeprowadzić reakcję z chlorkiem 4,4'-dimetoksytrytylu, aby móc określić całkowitą wydajność po dwóch etapach syntezy, a tym samym zbadać efektywność metody. Obliczona wydajność całkowita po etapie dimetoksytrytylowania (rozdział 6.1.6), nie była zadowalająca (48,4%) dlatego postanowiłam, że

jeżeli w syntezie pochodnych sperminowych nie uda mi się osiągnąć lepszych wydajności w reakcji usuwania blokady benzyliденowej, to zmienię procedurę jej odblokowania lub poszukam innych grup ochronnych.

Zbyt niska wydajność usuwania grupy benzyliденowej pochodnej putrescyny skłoniła mnie do przetestowania bardziej labilnej grupy – p-metoksybenzyliденowej.¹¹⁵ Wprowadzenie do pierścienia podstawnika dostarczającego elektrony mogłoby skrócić czas reakcji otrzymywania acetalu oraz kilkakrotnie przyspieszyć kwasową hydrolizę na etapie odblokowania. Reakcję z aldehydem 4-metoksybenzoesowym (schemat 19) przeprowadziłam w benzenie w temperaturze 75° C. Produktem ubocznym reakcji aldehydów z 1,3-diolami jest woda. Na wydajność tworzenia związku (**63**) ma wpływ efektywne usuwanie wody powstającej w czasie reakcji. W związku z tym przez cały czas trwania syntezy dodawałam porcjami siarczan magnezu, który jest dobrym środkiem odwadniającym. Produkt **63** otrzymałam w postaci białego osadu, który krystalizuje w trakcie ekstrakcji z chlorku metylenu. Analiza ¹H NMR potwierdziła obecność obu izomerów powstałego acetalu.

Grupa metoksylova w pozycji para pierścienia aromatycznego zwiększa labilność grupy ochronnej, wpływając na wydajność odblokowania funkcji hydroksylowej. Do usuwania grupy metoksybenzyliденowej zamierzałam wykorzystać reakcję hydrogenolizy. Ze względów praktycznych oraz wygodę prowadzenia reakcji, w której biorą udział jony wodorowe zrezygnowałam z gazowego wodoru. Zastosowałam alternatywne sposoby dostarczenia jonów wodorowych do mieszaniny reakcyjnej. Wykorzystałam w tym celu opisane w literaturze metody usuwania grup benzyliденowych w chemii cukrów. Źródłem wodoru był kwas mrówkowy¹¹⁶ lub mrówczan amonu¹¹⁷. Obie reakcje prowadziłam w roztworze metanolowym w obecności katalizatora (5% Pd/C). Niestety w prowadzonych przeze mnie eksperymentach nie udało się istotnie skrócić czasu usuwania grup ochronnych, ani zwiększyć wydajności powstawania produktu.

W tym samym czasie zainteresowała mnie inna pochodna benzyliденowa, grupa o-nitrobenzyliденowa. Zaletą tej grupy jest jej fotolabilność co mogłoby wyeliminować w trakcie odblokowania użycie silnie kwasowych warunków oraz skrócić czas reakcji. Co więcej o-nitrobenzaldehyd doskonale sprawdza się, jako substrat w reakcjach nazywanych 'zieloną chemią', czyli opartych na energii dostarczanej przez promieniowanie mikrofalowe. Z opublikowanych badań¹¹⁸ wynika, że wykorzystanie mikrofal pozwala na znaczne skrócenie czasu prowadzonej reakcji, minimalizację ilości powstających produktów ubocznych i często jest związane z wyższymi wydajnościami. Skrócenie czasu reakcji jest związane z tak zwanym 'efektem mikrofalowym'.¹¹⁹ Efekt ten jest obserwowany w reakcjach określonego typu, takich jak reakcje dwucząsteczkowe z udziałem anionów jako czynników nukleofilowych (S_N2, eliminacja, addycja do wiązania C=O) (schemat 21 A) czy reakcje dwucząsteczkowe reagentów obojętnych prowadzące do obdarzonych ładunkiem stanów przejściowych (np. alkilowanie amin, fosfin lub addycja do C=O) (schemat 21 B).



Schemat 21. Mechanizm addycji do grupy karbonylowej.¹¹⁹

Przyczyna ‘efektu mikrofalowego’ nie jest do końca wyjaśniona. Przypuszczalnie efekt ten jest związany z miejscowym gwałtownym wzrostem temperatury. Nie jest to jednak mechanizm wyjaśniający wszystkie procesy zachodzące pod wpływem promieniowania mikrofalowego. Część z nich w obecności mikrofal przebiega inaczej niż podczas zwykłego ogrzewania. Może to być wynikiem zmiany mechanizmu reakcji lub zmian strukturalnych reagujących cząsteczek. ‘Efekt mikrofalowy’ kojarzony jest z oddziaływaniami między dipolami, z tworzeniem jonów czy z przemieszczaniem elektronów w obrębie cząsteczki.¹¹⁹

Posiłkując się danymi literaturowymi¹¹⁸ opracowałam własną procedurę otrzymywania pochodnej o-nitrobenzylidenowej Bis-MPA (64). Zdecydowałam najpierw przetestować reakcję bez użycia rozpuszczalnika. Ponadto, dysponując kuchenką mikrofalową (2,4 GHz, moc 800 W), a nie laboratoryjnym reaktorem mikrofalowym musiałam sprawdzić potrzebną moc kuchenki, by reakcja zaszła czysto i wydajnie. Po kilku próbach udało mi się zsyntezować związek 64 z wydajnością 89%. W pierwszym etapie aldehyd o-nitrobenzoesowy zmieszałam w zlewce z substratem **59** i 0,05 równoważnika molowego kwasu p-toluenosulfonowego, który pełnił rolę katalizatora. Mieszaninę wstawiłam najpierw na 5 min i 30% mocy a następnie 10 min z 50% mocą kuchenki. Po tym czasie mieszaninę pozostawiłam do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie do mieszaniny dodałam wody i przeprowadziłam ekstrakcję a po odparowaniu warstwy organicznej otrzymałam czysty biały osad związku 64, którego strukturę potwierdziłam za pomocą widm NMR.

Obserwacje prowadzone w trakcie eksperymentów pozwoliły mi określić zasady prowadzenia reakcji za pomocą mikrofal i wykorzystać uzyskaną wiedzę podczas innych syntez (patrz rozdział 6.1.4). Okazało się, że jeżeli substratami w reakcji są związki w stanie stałym należy dobrze je wymieszać, aby zwiększyć powierzchnię ich wzajemnego oddziaływania. Należy jednak zachować ostrożność, gdyż intensywne rozcieranie zwłaszcza w przypadku aldehydu o-nitrobenzoesowego prowadzi potem do zwęglania się mieszaniny reakcyjnej, obniżając wydajność otrzymywanego produktu. Kontrola reakcji zachodzących w kuchence mikrofalowej jest utrudniona, dlatego ze względu na bezpieczeństwo, ograniczyłam skalę reakcji do 1 mmola. Właściwa powierzchnia oddziaływania pomiędzy substratami oraz ograniczenia skali prowadzonych reakcji mogą być związane absorpcją energii mikrofal przez „ogrzewane

cząsteczki". Jeżeli użyjemy zbyt dużej ilości materii na małej powierzchni w naczyniu reakcyjnym efektywność transferu będzie zakłócona, co może spowodować obniżenie wydajności reakcji lub doprowadzić do 'przegrzania' substratów, które obserwowałam w reakcjach z aldehydem o-nitrobenzoesowym.

Przeprowadziłam kilka eksperymentów, w trakcie, których próbowałam usunąć grupę o-nitrobenzylidenową za pomocą promieniowania UV w obecności kwasu trifluorooctowego. Prowadząc reakcję odblokowania związku **64** w skali 0,3 mmola udało mi się otrzymać produkt z wolnymi grupami hydroksylowymi. Bardzo niska wydajność reakcji odblokowania w dużej skali spowodowała, że zrezygnowałam z używania tej grupy ochronnej w syntezie poliaminowej pochodnej kwasu Bis-MPA.

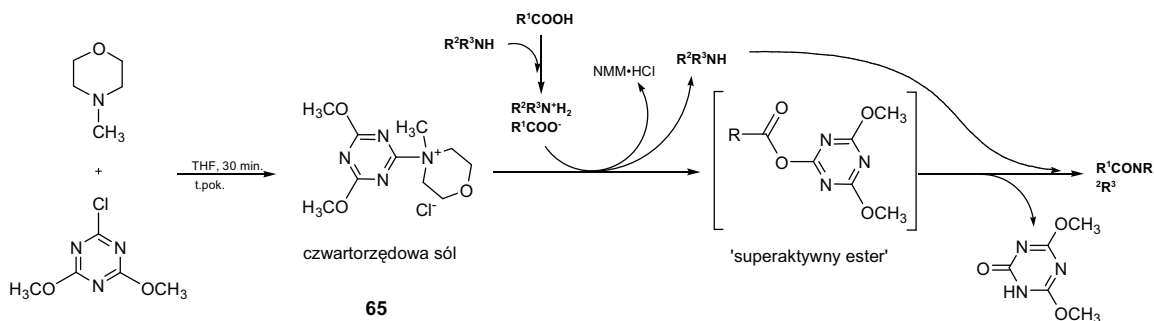
3.3.2.2. Aktywacja grupy karboksylowej

Kolejnym etapem na drodze do otrzymania zaprojektowanego analogu jest selektywne utworzenie wiązania amidowego w reakcji z poliaminą. Przekształcenie kwasu karboksylowego w amid na drodze bezpośredniej reakcji aminy z kwasem jest trudne. Aminy jako zasady, reagując z kwasami odrywają proton. Utworzony anion karboksylanowy nie jest dobrym elektrofilem i nie może być efektywnie atakowany przez cząsteczki nukleofila. Związki zawierające wolną grupę karboksylową, aby mogły być podatne na atak nukleofilowy, muszą być aktywowane za pomocą katalizatorów lub poprzez tworzenie reaktywnych pochodnych (chlorki, bezwodniki kwasowe). W celu zbadania właściwości analogów poliaminooligonukleotydów postanowiłam najpierw przeprowadzić reakcje związku **62** z najprostszą aminą biogenną – putrescyną (1,4-diaminobutan), która pełniła rolę modelowego analogu poliaminonukleotydu. Miałam nadzieję, że jeżeli uda mi się zoptymalizować warunki syntezy i wstępnie poznać właściwości takich pochodnych poliamin, to następnym krokiem będzie synteza prowadząca do otrzymywania nienukleozydowych analogów sperminy.

Synteza pochodnej putrescyny

Pierwsze próby otrzymania cząsteczki modelowej prowadziłam aktywując grupę karboksylową związku **62** za pomocą 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny (CDMT).¹²⁰ Związek ten został opisany w literaturze jako efektywny czynnik aktywujący, który w reakcji z kwasem karboksylowym generuje dobrą grupę opuszczającą (tzw. 'superaktywny ester') (schemat 22). Mechanizm aktywacji kwasu pochodną triazyny w pierwszej kolejności, zakłada utworzenie związku **65**, a następnie w wyniku ataku nukleofilowego jonu karboksylowego do atomu węgla triazyny wygenerowanie 'aktywnego estru'. Według danych literaturowych^{120a,121} istotnym czynnikiem, który pośredniczy w tworzeniu aktywnego związku pośredniego jest obecność w medium reakcji trzeciorzędowej aminy (np. tetrametylenoguanidyna, N-metylomorfolina i inne). Efektywność działania aminy jest zdeterminowana przez jej strukturę. Rozbudowane podstawniki w cząsteczce aminy obniżają wydajność powstawania czwartorzędowej soli **65**. Końcowy produkt

otrzymuje się poprzez substytucję nukleofilową grupy aminowej do centrum elektrofilowego związanego kowalencyjnie z grupą opuszczającą (schemat 22).

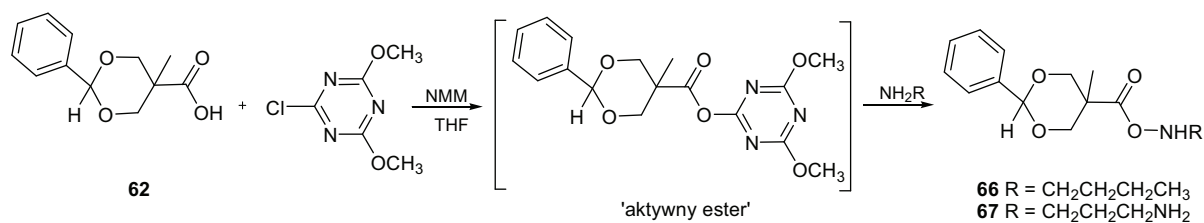


Schemat 22. Proponowany mechanizm aktywacji grupy karboksylowej 2-acyloksy-4,6-dipodstawioną-1,3,5-triazyną.

W celu sprawdzenia efektywności opisanej metody najpierw przeprowadziłam test z n-butyloaminą. Blokowany kwas Bis-MPA **62** poddałam reakcji z CDMT w obecności N-metylomorfoliny w bezwodnym tetrahydrofuranie. Reakcje prowadziłam przez 1 h, dzięki kontroli TLC mogłam zaobserwować tworzenie się 'aktywnego estru'. W kolejnym kroku dodałam n-butyloaminę i po 2,5 h zakończyłam reakcję. Produkt w postaci mieszaniny izomerów (schemat 20) otrzymałam z wydajnością powyżej 60%. Izomery rozdzieliłam a strukturę związku **66** potwierdziłam metodami spektroskopowymi.

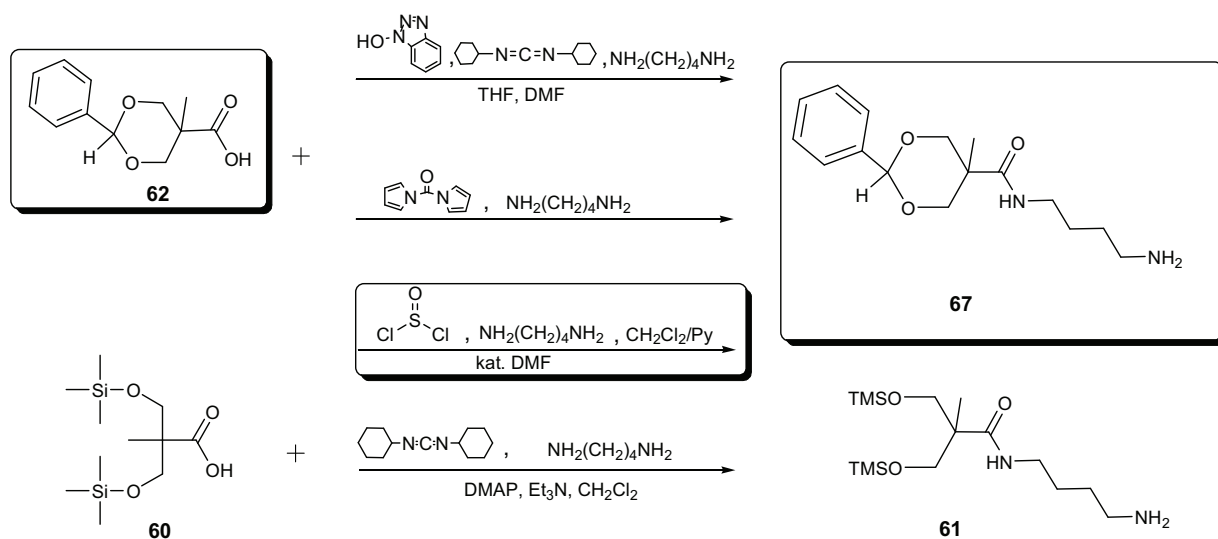
Dobry wynik otrzymywania pochodnej **66** skłonił mnie do przeprowadzenia kondensacji z 1,4-diaminobutanem w celu otrzymania produktu **67**. W trakcie eksperymentów pojawiły się dwa problemy. Pierwszy z nich dotyczył zbliżonej mobilności chromatograficznej substratu i produktu **67** co utrudniało kontrolowanie postępu reakcji z putrescyną. Podjęłam próby znalezienia alternatywnego eluentu. Ostatecznie udało mi się rozdzielić oba związki używając, zamiast CH₃OH/CH₂Cl₂, eluentu składającego się z benzenu i trójetyloaminy (9:1). Ze względu na właściwości kancerogenne benzenu nie było to najlepsze rozwiązanie, zwłaszcza na etapie oczyszczania. Kolejny problem stanowiła obecność obu izomerów co, w połączeniu z niską wydajnością produktu (> 30%), prowadziło to do skomplikowanej i trudnej do rozdzielania mieszaniny reakcyjnej.

Przeprowadziłam kilka eksperymentów zmieniając rozpuszczalnik, temperaturę, czas prowadzenia reakcji i kolejność dodawania substratów, jednak zmiany te ani nie zmniejszyły ilości produktów ubocznych, ani nie zwiększyły wydajności produktu. W tej sytuacji powzięłam decyzję o znalezieniu innego sposobu aktywacji grupy karboksylowej.



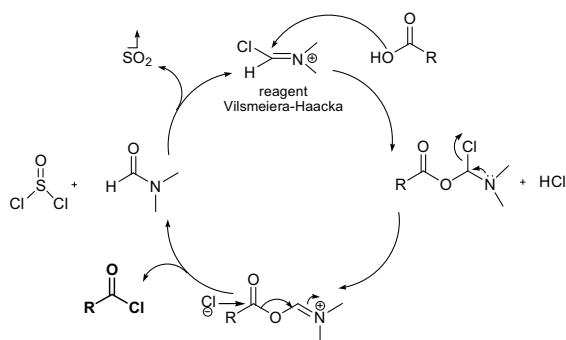
Schemat 23. Synteza wiązania amidowego.

Karbonyldiimidazol (CDI) to powszechnie stosowany czynnik kondensujący, który umożliwia efektywne tworzenie wiązania amidowego. Wytworzony in-situ aktywny acyloimidazol reaguje dość szybko z aminami (schemat 24).¹²²



Schemat 24. Różne czynniki aktywujące ugrupowanie karboksylowe.

Podobnie jest w przypadku użycia hydroksybenzotriazolu, który tworzy aktywny ester kwasu karboksylowego łatwo reagujący z różnymi nukleofilami (schemat 24). Zastosowane przeze mnie obu tych czynników nie pozwoliło jednak na osiągnięcie wyższych wydajności produktu **67**. Podobnie użycie dicykloheksylokarbodiimidu często wykorzystywanego w syntezie peptydów,¹²² nie poprawiło wydajności. Użycie wyżej wymienionych czynników kondensujących nie poprawiło wydajności reakcji, dlatego postanowiłam wykorzystać reaktywną pochodną kwasów organicznych – chlorek kwasowy. W pierwszym etapie związek **62** rozpuściłam w mieszaninie bezwodnego chlorku metylenu z 10% zawartością bezwodnej pirydyny dodając dwukrotny nadmiar chlorku tionylu i katalityczne ilości DMF^{109a,122} (schemat 24). Dodatek pirydyny zwiększał rozpuszczalność kwasu **62**, a DMF katalizował reakcję powstawania chlorku (rys. 44). W reakcji SOCl₂ i DMF zostaje wygenerowany czynnik Vilsmeiera-Haacka, który następnie ulega substytucji nukleofilowej z uwolnieniem jonu chlorkowego. Powstały produkt pośredni, N-metylowany mieszany bezwodnik kwasu karboksylowego i imidomrówkowego reaguje z uwolnionym jonem chlorkowym tworząc chlorek kwasowy i regenerując cząsteczkę DMF. Po około 2 godzinach reakcji pozbyłam się nadmiaru chlorku tionylu odparowując surową



Rys. 44. Cykl katalityczny - aktywacja za pomocą DMF¹²¹

mieszaninę z chlorkiem metylenu i toluenem. Następnie w celu uniknięcia powstawania symetrycznych bis-podstawionych pochodnych putrescyny dodałam pięciokrotny nadmiar 1,4-diaminobutanu. Po około 1 godzinie reakcję zakończyłam, otrzymując produkt **67** z 60% wydajnością. Strukturę związku **67** potwierdziłam za pomocą spektroskopii NMR.

Synteza pochodnej sperminy

Eksperymenty prowadzące do otrzymania cząsteczki modelowej z kwasu Bis-MPA, miały mi pomóc w poznaniu właściwości benzyldenowych pochodnych tego kwasu. Poznanie tych właściwości miało ułatwić otrzymanie sperminowej pochodnej. Próby aktywacji grupy karbonylowej kwasu utwierdziły mnie w przekonaniu, że powodem niskich wydajności reakcji z putrescyną nie jest przestrzenne ułożenie grupy karbonylowej w pierścieniu 1,3-dioksanu, ale słabe właściwości elektrofilowe grupy karbonylowej. Drogą do otrzymania wysokich wydajności w reakcji z aminą jest tworzenie reaktywnych pochodnych np. chlorków kwasowych.

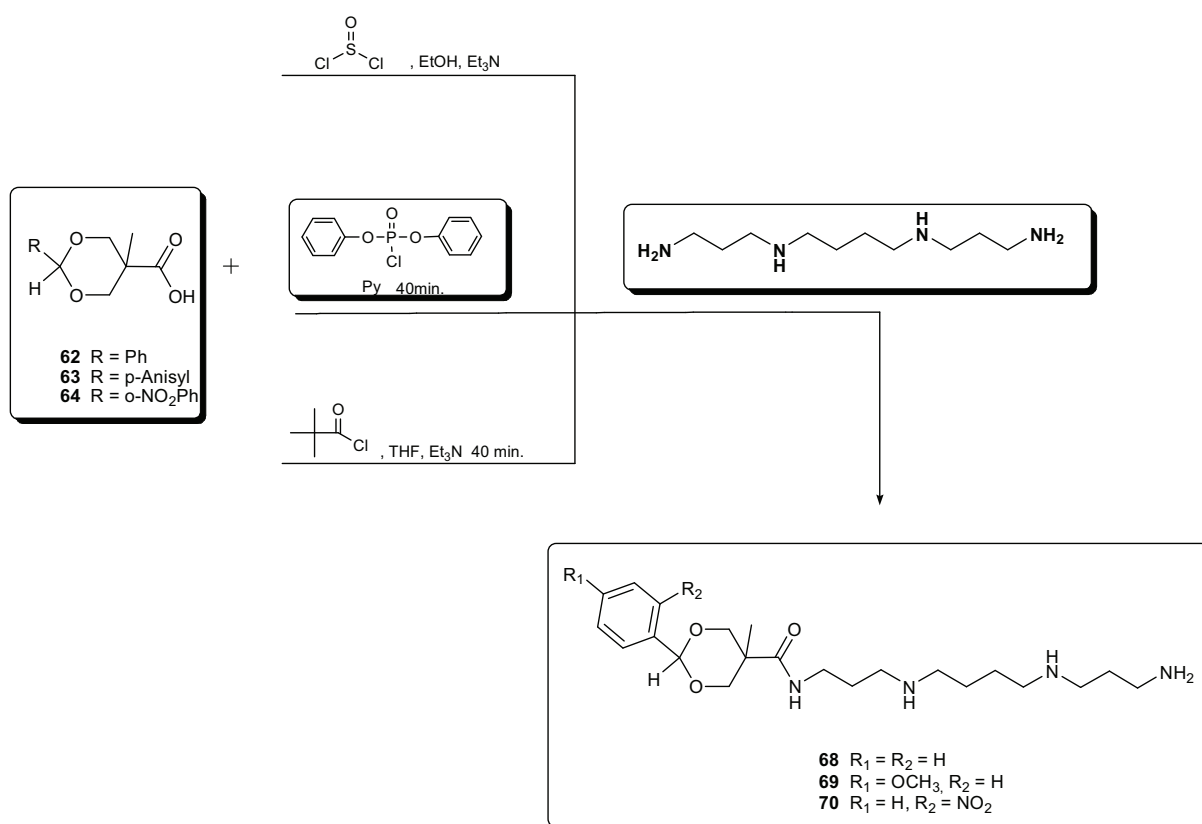
W przeciwieństwie do cząsteczki putrescyny, cząsteczka sperminy oprócz pierwszorzędowych i posiada również drugorzędowe grupy aminowe, które różnią się nukleofilowością. Powstały chlorek kwasowy mógłby reagować zarówno z terminalnymi jak wewnątrzcząsteczkowymi grupami aminowymi, prowadząc do powstawania produktów ubocznych i obniżając wydajność nienukleozydowego analogu poliaminy. Nie mogłam więc wykorzystać chlorku kwasowego do aktywacji grupy karboksylowej. Dodatkowym utrudnieniem reakcji ze sperminą mogłaby być niższa nukleofilowość pierwszorzędowych grup aminowych sperminy w porównaniu z terminalną grupą aminową putrescyny. Należało, więc znaleźć bardziej reaktywną pochodną, która pozwoliłaby na otrzymywanie mieszaniny reakcyjnej pozbawionej dużej ilości produktów ubocznych.

W pierwszym kroku zdecydowałam się sprawdzić przydatność pochodnej estrowej kwasu benzyldeno – 2,2-bis-(hydroksymetylo)propionowego (schemat 25). Mimo, że estry alkilowe nie należą do reaktywnych związków, chciałam się przekonać czy uda mi się otrzymać pochodną sperminy (**68**). Najpierw substrat **62** przekształciłam w chlorek, używając wcześniej opracowanej procedury, potem dodałam etanolu by utworzyć ester etylowy, który poddałam reakcji ze sperminą. Reakcje prowadziłam przez kilka dni, stopień przereagowania był jednak niewielki. Ostatecznie zrezygnowałam z wykorzystania estrów alkilowych w syntezie amidów poliaminowych. Eksperyment ten jeszcze raz potwierdził, że aby otrzymać zaprojektowaną pochodną poliaminową elektrofilowość karbonylowego atomu węgla należy zwiększyć przez wytworzenie bardzo reaktywnego produktu pośredniego.

Chlorek piwaloilu wykorzystywany jest do wprowadzania piwaloilowej grupy ochronnej funkcji hydroksylowej oraz jako czynnik kondensujący, promujący reakcję alkoholi z kwasem

fosfonowym lub monoestrami tego kwasu.¹²³ Jest najczęściej stosowanym czynnikiem kondensującym w chemicznej syntezie oligonukleotydów metodą *H*-fosfonianową. Ponadto reakcje amonolizy zachodzą dość selektywnie wskutek zawady przestrzennej tworzonej przez grupę tert-butyłową, która ogranicza nukleofilowy atak na karbonylowy atom węgla grupy piwaloilowej.

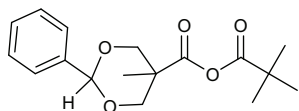
Blokowany kwas Bis-MPA (**62**, **63**, **64**) poddałam reakcji z chlorkiem piwaloilu przez 40 minut. Otrzymany mieszaną bezwodnik, obserwowany za pomocą TLC, potraktowałam 7-krotnym nadmiarem sperminy. Po upływie 1,5 h reakcję zakończyłam odparowując rozpuszczalnik, a nieprzereagowaną aminę ekstrahowałam wodą. Czysty związek **68** izolowałam z surowej mieszaniny, odmywając go niepolarnym rozpuszczalnikiem, korzystając z różnic we właściwościach fizycznych związków **62** i **68**.



Schemat 25. Szlaki otrzymywania pochodnej sperminy.

Pochodne **69** i **70** uzyskałam po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej stosując eluent opracowany przez dr Przemysława Godzinę¹⁰⁰ (eluent $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$). Struktury **68-70** potwierdziłam widmami NMR. Najlepsze wydajności uzyskiwałam używając jako związku wyjściowego, związku **62** (ok. 50%). Niska wydajność reakcji ze sperminą skłoniła mnie do przeanalizowania względnej podatności grup karbonylowych mieszanego bezwodnika na atak nukleofilowy. Zauważyłam, że otoczenie obu grup karbonylowych w bezwodniku jest bardzo podobne (rys. 45). Nieznaczna różnica wartości pK_a kwasu Bis-MPA (4,41) i piwalowego (5,01) nie pozwoliła mi jednoznacznie stwierdzić, który z nich będzie lepszą grupą opuszczającą. Zatem

o utworzeniu się właściwego produktu pochodnej sperminy **68** może decydować czynnik steryczny. Analizując strukturę otrzymanego bezwodnika doszłam do wniosku, że grupa tert-butylova kwasu piwalowego nie tworzy większej zawady przestrzennej. Wydajność otrzymywania pochodnych sperminy nadal była niezadowalająca, dlatego postanowiłam znaleźć lepszy czynnik aktywujący.



Rys. 45. Struktura mieszanego bezwodnika w reakcji z chlorkiem piwaloilu

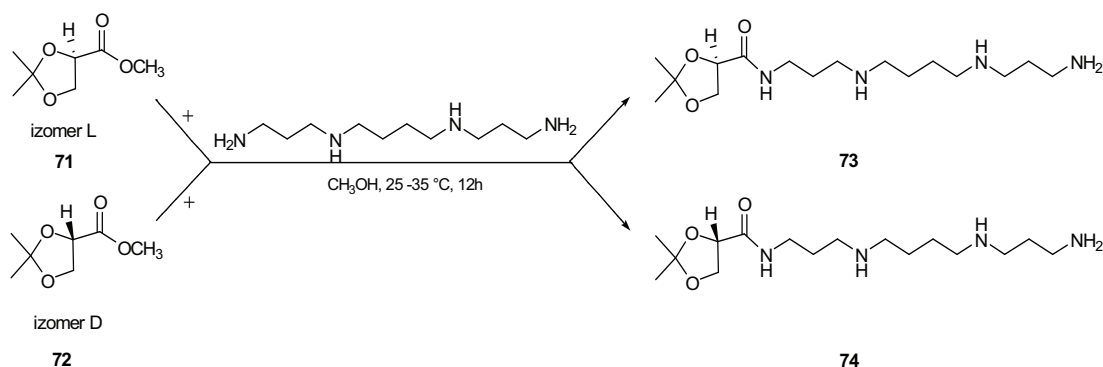
Podjęłam kolejną próbę, tym razem utworzenia mieszanego bezwodnika benzylidenowej pochodnej kwasu Bis-MPA z dichlorofosforanem difenyłu (DPCP).¹²⁴ Wybór czynnika kondensującego podyktowany był nie tylko jego efektywnością w aktywacji związków fosforu, co ważniejsze

zależało mi na wyeliminowaniu potencjalnego miejsca ataku nukleofilowego, jak to miało miejsce w przypadku bezwodnika utworzonego z chlorku piwaloilu. Spodziewałam się, że duża zawada przestrzenna w postaci grup fenoksylowych zminimalizuje powstawanie produktów ubocznych (schemat 25). Substrat **64** rozpuściłam w pirydynie i dodałam chlorofosforan difenyłu prowadząc reakcję przez 40 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną schłodziłam i dodałam sperminę. Po kolejnych 60 minutach reakcję zakończyłam. Surową mieszaninę poreakcyjną oczyściłam otrzymując czystą pochodną sperminy **70** z 75% wydajnością. W początkowych eksperymentach, w których jako czynnik aktywujący karbonylowy atom węgla związku **62**, stosowałam DPCP używając 7 równoważników molowych poliaminy. Brak powstawania dużej ilości innych, niż związek **70**, pochodnych sperminy pozwolił mi zredukować nadmiary używanej poliaminy do 3 równoważników molowych.

3.3.3. Synteza poliaminowych pochodnych kwasu α,β -izopropylideno-D-glicerynowego i α,β -izopropylideno-L-glicerynowego

Układy 1,2-diolowe są często wykorzystywane jako substytuty pierścienia deoksyrybozy w syntezie analogów oligonukleotydów.⁶⁶ Wybierając oba enancjomery estru glicerynowego chciałam sprawdzić jak efektywność tworzenia struktur dwuniciowych modyfikowanych pochodnymi glicerynowymi poliamin, jest związana z chiralnością używanych analogów poliamionukleotydów.

Reakcję każdego z enancjomerów (**71**) i (**72**) prowadziłam z 10-krotnym nadmiarem sperminy w zakresie temperatur od 25 °C do 35 °C. Istotną rolę odgrywała temperatura, która musiała osiągnąć poziom przynajmniej 25 °C. Stosowanie dużych nadmiarów poliaminy miało zapobiegać powstawaniu bis-podstawionych pochodnych sperminy oraz takich, które powstają w wyniku nukleofilowego ataku drugorzędowych grup aminowych poliaminy. W trakcie eksperymentów nie zaobserwowałam powstawania tego typu pochodnych sperminy, ani wyższych wydajności związku (**73**) lub (**74**) jeżeli stosowałam duże nadmiary poliaminy. Zrezygnowałam ze stosowania dużych nadmiarów, które zmniejszyłam do 4 równoważników molowych.



Schemat 26. Synteza pochodnej aminowej estrów izopropylidenoglicerynowych.

Brak chromoforu w pochodnej poliaminowej utrudniał obserwację postępu reakcji w świetle UV. Aby obserwować związek z wolnymi grupami aminowymi lub hydroksylowymi w świetle UV postanowiłam wykorzystać barwnik o właściwościach fluorescencyjnych. Wybrałam fluoresceinę, która posiada grupę karboksylową i może oddziaływać z wyżej wymienionymi grupami. Do wybarwiania płytek stosowałam roztwory fluoresceiny w acetonitrylu. Liczyłam, że forma kwasowa barwnika pozwoli na detekcję wolnych grup aminowych i alkoholowych w świetle UV. Otrzymywany produkt jest pochodną sperminy i jego właściwości wynikają przede wszystkim ze struktury sperminy, która wykazuje charakter bardziej hydrofilowy. Nieznaczące właściwości hydrofobowe związku **73** lub **74** są wynikiem wprowadzenia grupy izopropylideneowej, chroniącej grupy hydroksylowe. Izolację produktu prowadziłam przez kilkakrotną ekstrakcję i wytrząsanie z dużymi ilościami rozpuszczalnika organicznego. Bezpośrednio po izolacji i odparowaniu warstwy organicznej otrzymany produkt poddałam analizie NMR. Czystość otrzymanych związków **73** i **74** była wystarczająca, aby użyć ich w dalszych reakcjach.

Kolejnym etapem na drodze otrzymania analogu poliaminonukleotydu, który mógłby być włączony do oligomeru było odblokowanie grup izopropylideneowych z 1,2-dioksolanu i odblokowanie grup hydroksylowych. Do usunięcia grupy izopropylideneowej bardzo często stosuje się kwas octowy.¹²⁵ W zależności od struktury substratu reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej lub ogrzewa do temperatury wrzenia rozpuszczalnika stosowanego w reakcji. Związek **84** rozpuściłam w 50% wodnym roztworze kwasu octowego. Reakcję prowadziłam przez 40 minut w podwyższonej temperaturze. Kontrola TLC wykazywała całkowite przereagowanie substratu. Po zneutralizowaniu kwasu octowego i ekstrakcji, surowe mieszaniny poddałam reakcji dimetoksytrytylowania. Całkowita wydajność po dwóch etapach wyniosła ok. 60%.

Analizując widmo 4,4'-dimetoksytrytylowanej pochodnej poliaminowej kwasu glicerynowego zaobserwowałam obecność sygnałów, których przesunięcia chemiczne leżały w zakresie 1-1,5 ppm. Sygnały te świadczyły o obecności w cząsteczce 4,4'-dimetoksytrytylowanej pochodnej sperminy grup metylowych ugrupowania acetylowego.

Włączenie nienukleozydowego analogu do nici oligomeru wymaga zablokowania funkcji aminowych sperminy. Ważne jest, aby chronione funkcje aminowe można było uwolnić w

warunkach odblokowania oligonukleotydu. Wśród wielu grup ochronnych alkiloamin, jedną z najczęściej stosowanych jest zasadolabilna grupa trifluoroacetylowa. Zanim mogłam usunąć grupę izopropylidenową musiałam zablokować funkcje aminowe grupami trifluoroacetylowanymi (rozdział 3.3.5).

Obserwacja w widmie ^1H NMR 4,4'-dimetoksytrytylowanej pochodnej sperminy sygnałów pochodzących od grup acetylowych, świadczyła o obecności tych grup przy funkcjach aminowych sperminy. Mogłam przypuszczać, że nastąpiła wymiana grup trifluoroacetylowych na acetylowe podczas reakcji z kwasem octowym. Sprawdzeniem mojej interpretacji była analiza MALDI-TOF zsyntezowanego oligonukleotydu z włączonym nienukleozydowym analogiem sperminy. W widmie MALDI zamiast sygnału o masie 3959 kDa obserwowałam sygnał o masie 4085,16 kDa. Potwierdził on obecność grup acetylowych, których nie udało się usunąć na etapie odblokowania analogu poliaminooligonukleotydu. W związku z tym, że usunięcie grup acetylowych nie jest możliwe w warunkach odblokowania oligonukleotydu musiałam znaleźć inną metodę usuwania grup izopropylidenowych.

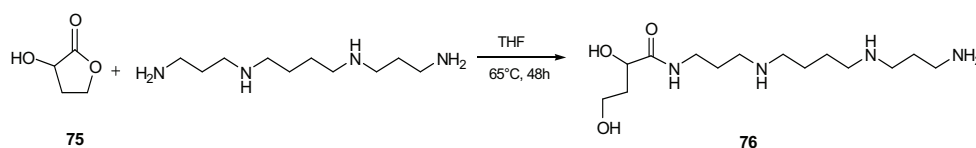
W tym celu przeprowadziłam reakcję odblokowania z kwasem p-toluenosulfonowym jako katalizatorem.¹²⁶ Związek ten wykazuje silne właściwości kwasowe, umożliwiające hydrolizę grupy izopropylidenowej, a jego anion jest słabym nukleofilem. Słabsza zdolność kwasu p-TSA do ataku nukleofilowego na funkcje aminowe w przeciwieństwie do kwasu octowego pozwoliła mi otrzymać produkt, w którym funkcje aminowe sperminy pozostały chronione grupami trifluoroacetylowymi.

3.3.4. Synteza poliaminowej pochodnej α -hydroksy- γ -butyrolaktonu

Handlowo dostępny prekursor, α -hydroksy- γ -butyrolakton, postanowiłam wykorzystać, jako związek wyjściowy, do otrzymania analogu poliaminonukleozydowego. Związek ten posiada wymagany trójwęglowy łańcuch metylenowy. Zawiera również prochiralny atom węgla związany z drugorzędową grupą hydroksylową reprezentującą grupę 3'-OH pierścienia cukrowego oraz posiada grupę karbonylową zastępującą pozycję 2'-C rybozy. Reakcje z poliaminą prowadzące do otwarcia pierścienia laktonu powodują powstanie mieszaniny enancjomerów. Mimo, że po włączeniu laktonowej pochodnej sperminy do oligonukleotydu otrzymałam mieszaninę diastereoizomerów zdecydowałam się na pracę z tym łącznikiem.

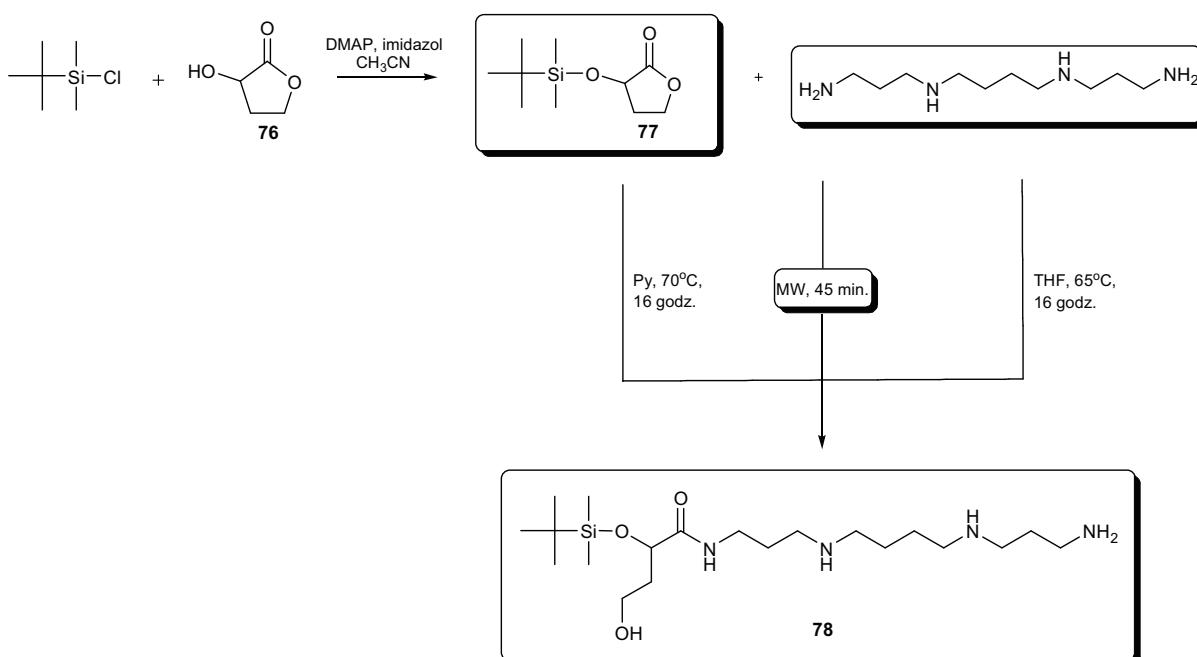
Początkowo reakcje α -hydroksy- γ -butyrolaktonu^{66,127}, ze sperminą prowadziłam w bezwodnym THF, który jako rozpuszczalnik aprotyczny sprzyja ujawnianiu się właściwości nukleofilowych pierwszorzędowych grup aminowych sperminy. Aby wyeliminować powstawanie bis-podstawionych pochodnych sperminy musiałam użyć dużych nadmiarów poliaminy. Otrzymany z dobrą wydajnością produkt **76** posiadał podobną hydrofilowość do użytej w reakcji poliaminy. Spowodowało to duże trudności w wyizolowaniu związku **76** z mieszaniny poreakcyjnej, w której była obecna użyta w nadmiarze spermina. W kolejnych etapach prowadzących do otrzymania analogu poliamionukleotydu, przeszkadzało znaczne podobieństwo właściwości produktu i substratu (schemat 27). Na etapie wprowadzania grup

trifluoroacetylowych musiałam używać bardzo dużych ilości bezwodnika trifluoroacetylowego, co powodowało powstawanie skomplikowanej mieszaniny reakcyjnej i dodatkowo było nieekonomiczne. Nie udało się również przeprowadzić reakcji dimetoksytrytylowania.



Schemat 27. Synteza *N*-(4,9,13-triazatridekano-1-yl)-2,4-dihydroksybutyroamidu.

Zablokowanie drugorzędowej grupy hydroksylowej laktonu **75** lipofilową grupą o dużej objętości pozwoliłoby wyeliminować problem izolacji produktu powstającego w reakcji ze sperminą (Schemat 28). Zależało mi dodatkowo, na tym aby grupa ochronna była usuwana w warunkach obojętnych. Spośród grup silylowych powszechnie wykorzystywanych do ochrony funkcji hydroksylowych w chemii nukleozydów zdecydowałam się wybrać grupę *t*-butyldimetylosilylową (TBDMS).¹²⁸ Dołączenie rozbudowanej przestrzennie grupy TBDMS do związku **75** mogło wpłynąć na zwiększenie lipofilowości produktu (**78**) otrzymywanego w reakcji z poliaminą.



Schemat 28. Szlak syntetyczny pochodnej sperminowej α -hydroksy- γ -butyrolaktonu.

Przeprowadziłam serię doświadczeń, w których sprawdziłam wpływ rozpuszczalnika, temperatury, zawartości wody oraz czasu trwania reakcji na wydajność otrzymywania związku **78** (tabela 16).

Tabela 16. Zestawienie warunków reakcji związku **77** ze sperminą (skala reakcji 0,075 mmola, 5 równoważników molowych sperminy). Wydajność wyizolowanego produktu po 5 dniach.

Lp.	Rozpuszczalnik	Warunki bezwodne*	Temperatura [°C]	Wydajność [%]
1	MeOH	nie	25	35
2	MeOH	tak **	25	37
3	MeOH	nie	55	30
4	MeOH	tak	55	42
5	pirydyna	nie	70	40
6	pirydyna	tak	70	50
7	pirydyna	tak	110-130	10

**w obecności sit molekularnych 3 Å;

*warunki bezwodne – stosowano rozpuszczalnik oczyszczony i osuszony na sitami 3 Å; tzw. warunki nie bezwodne – stosowano rozpuszczalnik handlowo dostępny cz.d.a, bez dodatkowego osuszania.

Postęp reakcji prowadzonych w warunkach zestawionych w tabeli 16 kontrolowałam za pomocą chromatografii TLC. Pierwszą kontrolę przeprowadziłam po 16 h (detekcja związków w świetle UV – wybarwienie z użyciem fluoresceiny, tak samo jak w rozdziale 6.1.3). Zaobserwowałam, że dla wszystkich prowadzonych prób stopień przereagowania substratu jest podobny. Kontrola reakcji po kolejnych 48 h, 72 h i nawet 5 dniach nadal wskazywała niezmienną ilość substratu w mieszaninie reakcyjnej. Po 5 dniach zakończyłam wszystkie próby i wyizolowałam produkt **78**. Najlepsze wyniki otrzymałam w próbie numer 6 – produkt otrzymałam z najwyższą jak dotąd 50% wydajnością. W warunkach numer 1-4, w których rozpuszczalnikiem był metanol stwierdziłam podobnie niską wydajność produktu. W warunkach numer 5 obserwowałam wytrącenie się kryształów sperminy. W warunkach numer 7 reakcję prowadziłam w wysokiej temperaturze (110-130 °C), co również nie poprawiło wydajności związku **78**. Jednocześnie podejmowałam próby zredukowania nadmiaru stosowanej poliaminy.

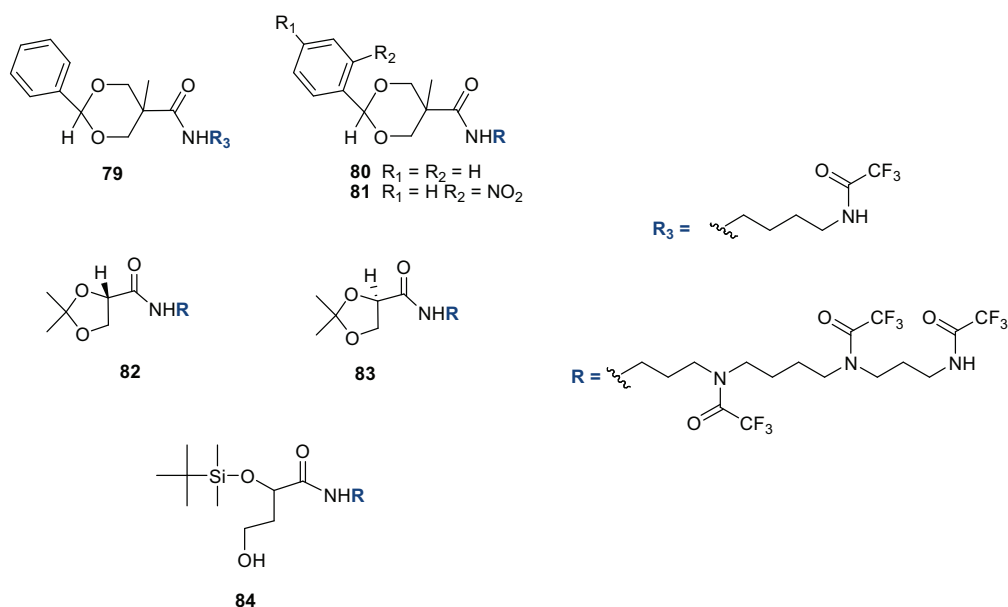
Ostatecznie rozwiązaniem problemu okazało się wykorzystanie promieniowania mikrofalowego w syntezie związku **78**. Udana eksperymenty pozwoliły mi uzyskać pożądany produkt **78** z 64% wydajnością. Dobrą wydajność produktu **78** uzyskałam przy zredukowanym do 45 minut czasie reakcji i obniżeniu nadmiaru poliaminy do minimum, prowadząc reakcje w stosunku molowym 1:1.

Przed reakcją 4,4'-dimetoksytrylowania grupę t-butyldimetylosiilową usunęłam za pomocą fluorku trietyloamoniowego.¹⁰⁰

3.3.5. Ochrona funkcji aminowych reszt poliaminowych

Jeżeli pochodne poliamin mają być włączone do DNA lub RNA na drodze chemicznej syntezy, to grupy aminowe reszt poliaminowych muszą być chronione. Przed reakcją fosfitylacji należało, więc zablokować pierwszo- i drugorzędowe funkcje aminowe sperminy. Jak

wspominałam w rozdziale 3.2.3 zdecydowałam się na wykorzystanie grup trifluoroacetylowych. Do ich wprowadzenia wykorzystałam procedurę z użyciem bezwodnika kwasu trifluorooctowego w pirydynie.¹⁰⁰



Schemat 29. Struktury trifluoroacetylowanych analogów poliaminonukleozydów.

W reakcjach^{41,100} blokowania funkcji aminowych poliaminonukleozydów stosowane są 3 równoważniki molowe bezwodnika trifluoroacetylowego w stosunku do jednej grupy aminowej w reakcji z pochodną putrescyny oraz 5 równoważników molowych w stosunku do jednej grupy aminowej w przypadku sperminy. Reakcje prowadzi się w temperaturze pokojowej przez około 5-10 minut. W reakcji bezwodnika trifluoroacetylowego z analogiem putrescyny (**67**) wykorzystałam preparatykę, która jest stosowana w chemii poliaminonukleozydów.^{41,100} W przeciwieństwie do wydajności otrzymywania trifluoroacetylowanych pochodnych poliaminonukleozydowych związek **79** otrzymałam z niższą 40% wydajnością, a po wyizolowaniu go z mieszaniny reakcyjnej odzyskałam ok. 50% substratu **67**. Zastosowanie krótkiego czasu reakcji nie pozwoliło otrzymać dobrych wydajności produktu **79**. Postanowiłam, więc wydłużyć czasu reakcji dodając kolejne porcje bezwodnika. Nie przyniosło to spodziewanej poprawy wydajności. Żeby zmienić stopień przereagowania substratu przeprowadziłam eksperyment stosując N-metyloimidazol, jako katalizator, który miał przesunąć równowagę reakcji w stronę tworzenia wiązania amidowego. Udało się zwiększyć wydajność produktu tylko do 52% w przypadku pochodnej putrescyny (**79**), a w przypadku pochodnej (**80**) wydajność reakcji pozostawała nadal granicach 40-50%.

W związku z napotkanymi trudnościami optymalizacji warunków reakcji trifluoroacetylowania zdecydowałam się sprawdzić czy niskie wydajności (**79-80**) mogą być związane z nietrwałością wiązania amidowego. Reakcję nie z bezwodnikiem trifluorooctowym, a z bezwodnikiem octowym prowadziłam z zachowaniem warunków bezwodnych. Przez cały czas trwania reakcji dodawałam bezwodnik porcjami. Kontrola reakcji za pomocą TLC po 1,5 h trwania

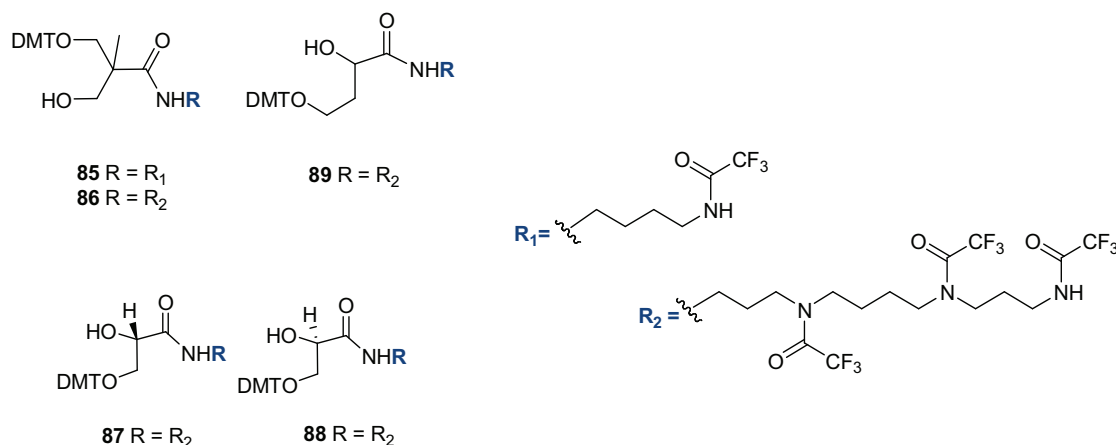
reakcji wykazała obecność substratu w ok. 50%. Po 2,5 h zauważyłam, że ilość substratu obecnego w reakcji zaczyna wzrastać. Pozostawienie mieszaniny na 24 h doprowadziło do odtworzenia się substratu w ponad 80%. Mogłam przypuszczać, że śladowe ilości wody w środowisku reakcji mogą prowadzić do hydrolizy wiązania amidowego. Wyniki eksperymentu potwierdziły, że optymalizacja warunków reakcji trifluoroacetylowania jest trudna, mimo stosowanych warunków bezwodnych i nadmiarów bezwodnika nie udało się przesunąć równowagi w kierunku tworzenia wiązania amidowego.

Poprawę wydajności uzyskałam stosując we wszystkich reakcjach związków (**79-84**) rozcieńczone mieszaniny reakcyjne. Reakcje z bezwodnikiem trifluoroacetylowym prowadziłam w temperaturze 0 °C w trakcie dodawania bezwodnika i ok. 20 minut w temperaturze pokojowej po wyjęciu z mieszaniny chłodzącej. Dla wszystkich pochodnych udało się uzyskać wydajności od 58% w przypadku związku (**83**) aż do 70% dla pochodnej (**82**) (schemat 29). Struktury związków potwierdziłam za pomocą NMR (^1H , ^{19}F).

3.3.6. Reakcje dimetoksytrylowania

Niezbędnym etapem na drodze do otrzymania amidofosforynów analogów poliaminonukleozydów i wykorzystania ich w automatycznej syntezie oligonukleotydów jest wprowadzenie grupy ochronnej pierwszorzędowej funkcji hydroksylowej, która w przypadku syntetyzowanych przeze mnie analogów odpowiada funkcji 5'-OH deoksyrybozy.

Wszystkie analogi nukleozydów miały zablokowane wcześniej grupy hydroksylowe, tak by można było przeprowadzić selektywną reakcję z poliaminą. Włączenie nienukleozydowych analogów poliamin do DNA lub RNA na drodze chemicznej syntezy wymaga zablokowania jednej z grup hydroksylowych grupą 4,4'-dimetoksytrylową. Przed etapem dimetoksytrylowania wszystkie grupy ochronne funkcji hydroksylowych zostały usunięte. Selektywna ochrona pierwszorzędowej grup hydroksylowej jest możliwa przy wykorzystaniu blokad 4,4'-dimetoksytrylowych. Po usunięciu grup ochronnych funkcji hydroksylowych analogi poliaminonukleozydów poddałam reakcji dimetoksytrylowania w pirydynie. Chlorek 4,4'-dimetoksytrylu dodawałam porcjami w ciągu 10 minut. Standardowy czas prowadzenia reakcji dimetoksytrylowania wynosi 2-3 h. W syntezie dimetoksytrylowanych analogów poliaminonukleozydów najwyższą wydajność związków (**85-89**) uzyskałam wydłużając czas reakcji do 16 godzin. Z najwyższą 72% wydajnością otrzymałam związek **89**. Struktury dimetoksytrylowanych produktów potwierdziłam za pomocą spektroskopii ^1H NMR oraz spektroskopii mas.

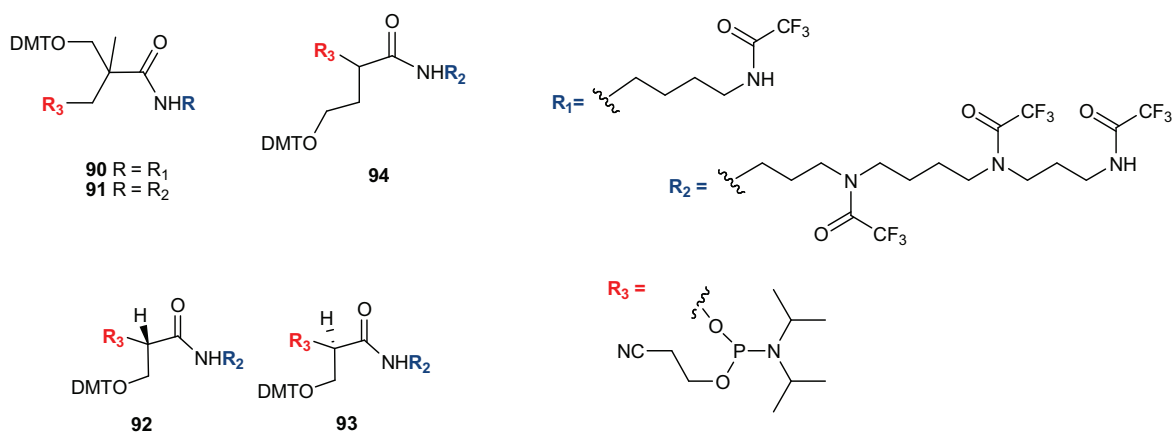


Schemat 30. Struktury 4,4'-dimetoksytrytylowanych analogów poliaminonukleozydów.

3.3.7. Reakcje fosfitylacji

Dimetoksytrytylowane pochodne analogów poliaminonukleozydów (**85-88**) poddałam reakcji fosfitylacji stosując bis-(N,N-diizopropylamino)(2-cyanoetoksy)fosfinę według standardowej procedury.¹²⁹ Otrzymałam amidofosforyny (**90-94**) (schemat 31) z wydajnością około 50-70%. W przypadku amidofosforynów nienukleozydowych analogów sperminy napotkałam trudności na etapie oczyszczania. Ponieważ wszystkie badane przeze mnie analogi są związkami niskocząsteczkowymi, to izolacja ich amidofosforynów z mieszaniny poreakcyjnej metodą chromatografii była utrudniona, ponieważ właściwości fizyczne produktu były zbliżone do właściwości fizycznych zanieczyszczeń. Rozwiązaniem okazała się metoda wytrącania z heksanu. Po otrzymaniu czystych produktów (**90-94**) zauważyłam, że wszystkie amidofosforyny są nietrwałe i stosunkowo łatwo hydrolizują do H-fosfonianów. Prawdopodobnie czynnikiem katalizującym reakcję hydrolizy są pozostałe po etapie oczyszczania zanieczyszczenia np. śladowe ilości etylotiotetrazolu. Otrzymałam odpowiednie 3'-amidofosforyny (schemat 31), których strukturę potwierdziła analiza ¹H NMR i ³¹P NMR. W widmach ³¹P NMR obserwowałam sygnały, które mogą świadczyć o występowaniu więcej niż jednego centrum chiralności.

Pochodne poliaminowe kwasu Bis-MPA (**85**, **86**) z włączoną grupą 4,4'-dimetoksytrytylową zawierają jedno centrum stereogeniczne i są mieszaniną enancjomerów. W wyniku reakcji fosfitylacji zostało wprowadzone dodatkowe centrum, powodując powstanie mieszaniny racemicznej (4 enancjomerów), co obserwowałam w widmie NMR. Z kolei trytylowane enancjomery D i L pochodnych poliaminowych kwasu glicerynowego (**87**, **88**) po włączeniu grupy amidofosforynowej zyskały dodatkowe centrum chiralne. W widmach ³¹P NMR obserwowałam związki **92** i **93** w postaci mieszaniny diastereoizomerów. W przypadku pochodnej poliaminowej laktonu (**78**) otwarcie pierścienia laktonowego doprowadziło do powstania mieszaniny enancjomerów. Po reakcji fosfitylacji związek **94** otrzymałam w postaci mieszaniny racemicznej.

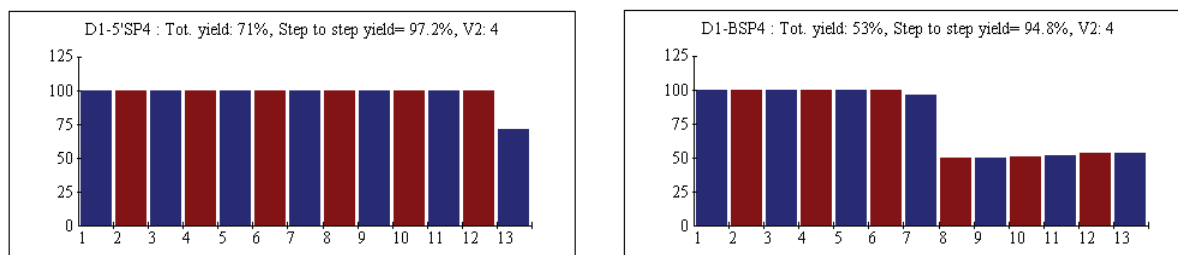


Schemat 31. Struktura 3'-amidofosforynów analogów poliaminonukleozydów.

3.4. Synteza chemiczna analogów poliaminooligonukleotydu

Uzyskane amidofosforyny użyłam do syntezy analogów poliaminooligonukleotydu używając jako sekwencji referencyjnej tzw. dodekamer Drew'a- Dickersona (tabela 17).

Amidofosforyny nukleozydów A, C, G, T zostały rozpuszczone w acetonitrylu i suszone nad sitami molekularnymi 3 Å minimum godzinę przed rozpoczęciem syntezy. Otrzymane w postaci liofilizatu analogi amidofosforynów nukleozydów (**90**, **92-94**) suszyłam pod próżnią przez 24-36 godzin. Wszystkie analogi amidofosforynów rozpuszczałam w bezwodnym acetonitrylu bezpośrednio przed etapem kondensacji analogu do wydłużanego łańcucha oligonukleotydu. Wcześniejsze rozpuszczenie modyfikowanych amidofosforynów prowadziło do szybszej hydrolizy do H-fosfonianu, co obserwowałam za pomocą widm ^{31}P NMR. Najmniej trwałymi okazały się sperminowe pochodne kwasu glicerynowego **93**, **94**. Prawdopodobnie czynnikiem katalizującym reakcję hydrolizy mogłyby być pozostałe w produkcie śladowe ilości etylotiotetrazolu. Wydajność etapu kondensacji analogów amidofosforynów poliaminonukleozydów zawierała się w granicach 70% jeżeli modyfikację wprowadzono na końcu 5'-oligomeru i 53% w przypadku włączenia analogu w środku sekwencji oligonukleotydu (rys. 46). W trakcie syntezy stosowałam dwukrotny nadmiar analogów amidofosforynów w stosunku do używanych standardowo nadmiarów amidofosforynów oraz wydłużyłam czas kondensacji na etapie przyłączania jednostki modyfikowanej do 10 minut.



Rys. 46. Po lewej – rejestracja usuniętej grupy dimetoksytrytylowej w syntezie oligonukleotydu modyfikowanego związkiem **94** na końcu 5'; po prawej – rejestracja usuniętej grupy dimetoksytrytylowej w syntezie oligonukleotydu modyfikowanego związkiem **94** w środku nici.

Wszystkie modyfikowane oligomery poddałam standardowej procedurze odblokowania z wykorzystaniem wodnego 32% roztworu amoniaku. Oczyszczanie otrzymanych mieszanin reakcyjnych prowadziłam wykorzystując aparat HPLC z kolumną wypełnioną złożem C-18 lub na płytkach TLC.

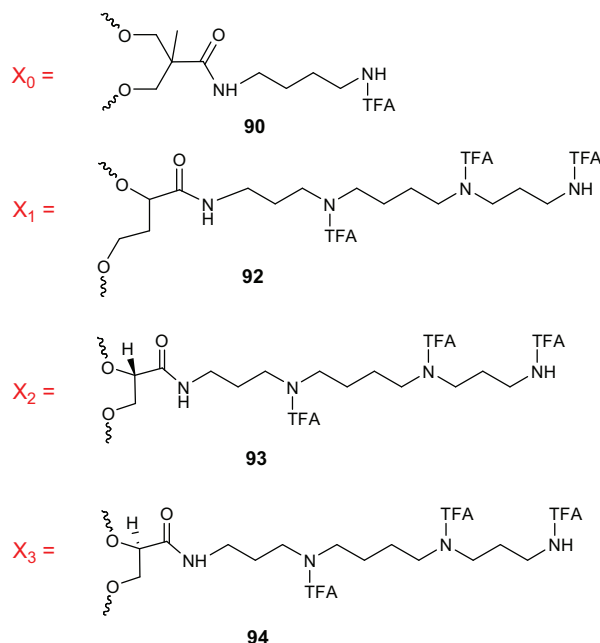
Masy cząsteczkowe otrzymanych oligonukleotydów potwierdziłam za pomocą analizy MALDI-TOF.

3.5. Wpływ analogu poliaminonukleozydu na trwałość struktury drugorzędowej DNA

Właściwości antysensowe i antygenowe kwasów nukleinowych można korzystnie zmodyfikować projektując ich analogi. Szczególną uwagę zwraca się na powinowactwo projektowanych analogów do komplementarnych nici DNA lub RNA. Jednocześnie ważne jest utrzymanie wierności parowania zasad w komplementarnej nici, wprowadzenie odporności na degradację enzymatyczną i zwiększenie wydajności pokonywania bariery błon komórkowych. Jedną z możliwych dróg zwiększenia trwałości struktur dwu- i trójniciowych jest redukcja całkowitego ładunku modyfikowanego oligonukleotydu. Zwiększenie poliaktyonowego charakteru modyfikowanej cząsteczki kwasu nukleinowego może pozwolić na efektywne przenikanie przez błony cytoplazmatyczne komórki.^{42,49,63}

Otrzymane analogi amidofosforynów nukleozydów (schemat 32) postanowiłam włączyć do nici oligomeru i poddać analizie ich właściwości hybrydizacyjne z komplementarnym niemodyfikowanym fragmentem DNA. Zdecydowałam, że dupleksem referencyjnym będzie, jak w przypadku badań właściwości poliaminooligonukleotydów (rozdział 4.1), modyfikowany dodekamer Drew'a-Dickersona. Analogi poliaminonukleotydów zostały włączone na końcu 5' (ang. *dangling end*), jako wydłużenie końca oligonukleotydu oraz jako wybrzuszenie (ang. *bulge*). Parametry termodynamiczne badanych analogów, wyznaczone na drodze pomiarów temperatur topnienia dupleksów, zebrałam w tabeli 17.

Modyfikacje w pozycji 5' oligonukleotydu (tabela 17 B) wskazują raczej na wzrost trwałości struktury drugorzędowej, jeżeli wprowadzimy analogi X₁ lub X₃ (schemat 32). Dla oligonukleotydu zawierającego analog putrescyny X₀ obserwowałam niewielkie obniżenie trwałości dupleksu podobnie jak w przypadku analogu X₂ (schemat 32; tabela 17 B wers 1 i 4).



Schemat 32. Struktura analogów poliaminooligonukleotydów po włączeniu do nici DNA.

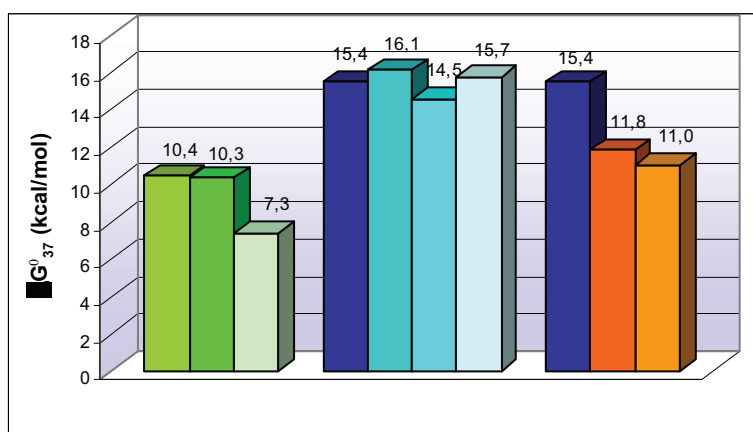
Włączenie na końcu 5' niesparowanego nukleotydu wpływa stabilizująco na trwałość termiczną dupleksu.¹³⁰ Mimo, że efekt stabilizujący końca 5' jest niższy niż niesparowanego końca 3', to jest niezależny od struktury i sekwencji zamykającej helisę. Niesparowany nukleotyd na końcu 5' nie oddziałuje warstwowo z przeciwległym łańcuchem dupleksu.¹³⁰ Postanowiłam sprawdzić jak włączenie na 5' końcu oligonukleotydu analogu poliaminy, pozbawionego zasady heterocyklicznej i fragmentu pierścienia cukrowego, będzie wpływać na trwałość struktury dwuniciowej.

Acykliczne łączniki charakteryzują się dużą ruchliwością konformacyjną. Może to powodować wzrost wartości entropii, dlatego oligonukleotydy zawierające acykliczne analogi najczęściej słabiej wiążą się do DNA. Wstępne badania właściwości analogów poliaminooligonukleotydów świadczą o tym, że nie zmniejszają one powinowactwa modyfikowanego oligomeru do nici komplementarnej. Ponadto zaobserwowałam wzrost składowej entropowej w przypadku analogów X_1 i X_3 umieszczonych na końcu 5', które zwiększały trwałość helisy (tabela 17 B, wers 2 i 4).

Wartość energii swobodnej ΔG dla dupleksów zakończonych 5' niesparowanym nukleotydem mieści się na ogół w zakresie od -0,1 do -0,5 kcal/mol w zależności od pary zasad kończącej dupleks.¹³⁰ W przypadku włączenia analogu poliaminonukleotydu na końcu 5' nici wartość ΔG wyniosła -0,74 kcal/mol dla X_1 i -0,3 kcal/mol dla analogu X_3 (wykres 5). Analiza danych termodynamicznych jednoznacznie wskazuje, że wydłużenie końca 5' za pomocą analogu X_3 wywołuje porównywalny efekt energetyczny do tego, jaki wnosi niesparowany nukleotyd na końcu 5'. Natomiast w przypadku analogu X_1 obserwowałam efekt większy niż po wprowadzeniu nukleozasady.

Jeżeli niesparowany koniec 5' nie ma możliwości oddziaływać warstwowych to w przypadku analogu poliaminonukleotydowego brak zasady heterocyklicznej nie wpłynął na obniżenie

trwałości termicznej badanych dupleksów. O podwyższeniu trwałości badanych dupleksów DNA decyduje, więc obecność reszty poliaminy i redukcja całosciowego ładunku kwasu nukleinowego. Efekt ten jest widoczny zwłaszcza, jeżeli porównamy modelową cząsteczkę zawierającą resztę putrescyny (X_0), która wprowadza do łańcucha tylko jeden ładunek dodatni, w przeciwieństwie do pochodnych sperminy (X_1 , X_2 , X_3) wprowadzających trzy ładunki. W przypadku pochodnej poliaminowej izomeru D-kwasu glicerynowego (X_2) obniżenie trwałości mogło być związane z określoną konfiguracją łącznika. Dowodzi to dużego znaczenia badań związków o różnej chiralności, skoro pojedyncza, tak mała zmiana konfiguracji może istotnie wpłynąć na właściwości fizyczne i chemiczne kwasu nukleinowego (tabela 17 B, wers 3).



- - dupleks referencyjny
- - X_0 na końcu 5' dupleksu
- - X_0 jako jednostronne wyrzuczenie w dupleksie
- - dupleks referencyjny
- - X_1 na końcu 5' dupleksu
- - X_2 na końcu 5' dupleksu
- - X_3 na końcu 5' dupleksu
- - X_1 jako jednostronne wyrzuczenie w dupleksie
- - X_2 jako jednostronne wyrzuczenie w dupleksie

Wykres 5. Energia swobodna modyfikowanych struktur dwuniciowych. Modyfikowane dupleksy zawierają analogi poliaminooligonukleotydu włączone na końcu 5' lub jako wyrzuczenie.

Wprowadzenie pojedynczego wyrzuczenia do jednej z nici przerywa oddziaływania warstwowe pomiędzy parami zasad oraz może zakłócić parowanie typu Watsona-Cricka dla par zasad otaczających wyrzuczenie. Parametry termodynamiczne pojedynczych wyrzuceń wskazują, że destabilizują one dupleks. Obserwuje się zależność pomiędzy rodzajem wyrzuczenia, jego wielkością, sekwencją par otaczających wyrzuczenie oraz jego ułożeniem względem helisy.¹³⁰ Zsyntezowałam trzy modyfikowane oligonukleotydy włączając analogi w środkowej części nici (tabela 17 C). Obniżenie energii swobodnej (ΔG) powstałych struktur nie wpływa znacząco na ogólną trwałość dupleksu. Mogłam przyjąć, że parowanie większości zasad zaszło prawidłowo. Jedynie dla dwóch par zasad po obu stronach wyrzuczenia mogło nastąpić osłabienie wiązań wodorowych. Należy zauważyć, że niższa trwałość dupleksu zarówno w przypadku analogu putrescyny jak i sperminy przyjmuje podobną wartość (tabela 17 C, wers 1, 2, 3). W przypadku dupleksu zawierającego X_0 parami zamykającymi są pary GC i CG, natomiast w przypadku analogów sperminy pary AT i TA (tabela 17 C, wers 2, 3). Jeżeli wielkość destabilizacji jest zależna od sekwencji par otaczających wyrzuczenie, to podobieństwo efektu destabilizacji

można tłumaczyć efektem elektrostatycznym dodatnich ładunków niesionych przez sperminę. Jest on jednak zbyt słaby, by wyrównać straty energetyczne spowodowane występowaniem wybrzuszenia. Dodatkowym niekorzystnym czynnikiem obniżającym trwałość dupleksu może być ruchliwość konformacyjna acyklicznego łącznika. Jednostronne jednonukleotydowe wybrzuszenia obniżają trwałość dupleksów RNA o wartość ΔG w zakresie od 2 do 6 kcal/mol.¹³⁰ Różnica efektów termodynamicznych jest związana zarówno z rodzajem wybrzuszenia jak i sąsiednimi parami zasad. Włączając do oligonukleotydu analogi X_0 , X_1 i X_2 zaobserwowałam niższą wartość ΔG wynoszącą 3-4,5 kcal/mol w zależności od analogu. Zmiany ΔG dupleksów analogów poliaminonukleotydów ($\Delta\Delta G$) przyjmują wartość (tabela 17 C, wers 1-3) podobną do wartości $\Delta\Delta G$ (2-6 kcal/mol) dupleksów z jednostronnym jednonukleotydowym wybrzuszeniem.

Tabela 17. Parametry termodynamiczne tworzenia dupleksów analogów poliaminooligomukleotydów (bufor zawiera 100 mM NaCl, 20 mM kakodylan sodu, 0.5 mM Na₂EDTA, pH 7)

Dupleksy		Średnia dopasowania krzywych topnienia				Wykres zależności T_M^{-1} od $\log C_T$				
DNA lub PA-DNA	DNA lub PA-DNA	$-\Delta H^\circ$ [kcal/mol]	$-\Delta S^\circ$ [eu]	$-\Delta G_{37}^\circ$ [kcal/mol]	T_M [°C]	$-\Delta H^\circ$ [kcal/mol]	$-\Delta S^\circ$ [eu]	$-\Delta G_{37}^\circ$ [kcal/mol]	T_M [°C]	ΔT_M^b [°C]
5'→3'	5'→3'									
A. Parametry termodynamiczne dupleksów referencyjnych DNA/DNA										
CTC AAG CAA GCT	AGC TTG CTT GAG	67,8±9,0	185,6±27,8	10,27±0,44	55,1	72,6±2,0	200,6±6,2	10,45±0,08	54,7	0
CTC ACA TGC GCG	CGC GCA TGT GAG	115,9±4,8	322,1±14,2	16,00±0,41	64,6	108,5±1,8	300,1±5,4	15,46±0,12	64,8	0
B. Parametry termodynamiczne dupleksów zawierających analog poliaminonukleotydu na końcu 5'										
X ₀ CTC AAG CAA GCT	AGC TTG CTT GAG	63,3±6,8	171,5±20,9	10,12±0,37	55,7	69,09±3,1	189,4±9,7	10,33±0,13	55,0	+0,3
X ₁ CTC ACA TGC GCG	CGC GCA TGT GAG	131,8±10,4	368,8±31,0	17,47±0,80	65,1	114,0±8,3	315,9±24,9	16,10±0,64	65,4	+0,7
X ₂ CTC ACA TGC GCG	CGC GCA TGT GAG	97,8±9,4	268,4±28,1	14,57±0,68	64,8	98,9±5,1	271,9±15,4	14,59±0,36	64,5	-0,3
X ₃ CTC ACA TGC GCG	CGC GCA TGT GAG	106,1±4,7	292,4±14,0	15,43±0,37	65,4	110,9±3,9	307,0±11,7	15,76±0,27	65,1	+0,3
C. Parametry termodynamiczne dupleksów zawierających analog poliaminonukleotydu jako wybrzuszenie										
CTC AAG X ₀ CAA GCT	AGC TTG CTT GAG	62,7±16,7	178,2±53,8	7,50±0,20	41,9	59,0±4,2	166,5±13,7	7,38±0,08	41,5	+3,07
CTC ACA X ₁ TGC GCG	CGC GCA TGT GAG	71,6±6,0	194,4±18,3	11,31±0,35	59,2	82,0±2,0	226,3±6,2	11,83±0,10	58,4	+3,63
CTC ACA X ₂ TGC GCG	CGC GCA TGT GAG	81,2±11,5	225,0±35,6	11,45±0,48	57,0	70±6,4	192,1±20,0	11,03±0,25	58,1	+4,43

4. Podsumowanie

W mojej pracy doktorskiej zrealizowałam trzy główne cele badawcze:

(A) Analiza właściwości fizykochemicznych poliaminooligonukleotydów

- Przeprowadziłam analizę termodynamiczną dupleksów DNA zawierających poliaminooligonukleotydy. Określiłam zależność efektu stabilizacyjnego modyfikowanych struktur w zależności od miejsca wprowadzenia jednostek poliaminowych, ich liczby oraz oddziaływań pomiędzy włączonymi łańcuchami aminoalkilowymi:
 - Otrzymałam trzy oktamery (5'-GTCGGCTG-3'; 5'-CAGCCGAC-3'; 5'-CAGCC^{Sp}GAC-3'), z których jeden zawierał jednostkę 2'-deoksycytydiny modyfikowaną sperminą (dC^{Sp}). Określiłam trwałość struktur dwuniciowych utworzonych z udziałem poliamino-2'-deoksyoligonukleotydu. Badając dupleks modyfikowany jedną resztą dC^{Sp} obserwowałam podwyższenie trwałości dupleksu.
 - Zsyntezowałam oligonukleotydy z włączonymi dwiema modyfikowanymi resztami deoksycytydiny (dC^{Sp}) w jednej z nici. Otrzymałam również poliaminooligonukleotydy zawierające jedną modyfikowaną resztę deoksycytydiny (dC^{Sp}) w komplementarnych niciach. Nie obserwowałam wzrostu trwałości dupleksów po wprowadzeniu do łańcucha dwóch modyfikacji poliaminowych, w przeciwieństwie do wzrostu trwałości w dupleksach modyfikowanych jedną resztą poliaminy.
- Niezależnie, od liczby i miejsca modyfikacji wszystkie modyfikowane dupleksy wykazywały podobną trwałość. Dla wszystkich dupleksów modyfikowanych dwiema resztami dC^{Sp} obserwowałam dwustanowy model topnienia struktury dwuniciowej.

(B) Porównanie struktur dupleksu referencyjnego i zawierającego resztę dC^{Sp} metodą spektroskopii NMR.

- Wcześniej otrzymane i przebadane oktamery, z których jeden zawierał modyfikowany nukleotyd – dC^{Sp} i powodował niewielki wzrost trwałości dupleksu zawierającego modyfikację, wykorzystałam do badań strukturalnych metodą NMR.
- Widma NMR dupleksu referencyjnego i zawierającego resztę dC^{Sp} różnią się nieznacznie. Różnice dotyczą przede wszystkim położenia sygnałów rezonansowych pochodzących od reszty sperminy oraz jej najbliższego sąsiedztwa.

- Znaczne różnice przesunięć chemicznych dotyczą protonów H1' modyfikowanej reszty deoksycytydyny i komplementarnej do niej reszty G5 oraz H1' reszt C3, G4, C13 i G14, czyli par nukleotydów leżących po stronie 3' od miejsca modyfikacji oraz 5' strony nici komplementarnej;
 - Różnice przesunięć chemicznych dotyczą również protonów H6 reszt C12 i C13 oraz protonu H8 reszty G4;
 - Największe różnice przesunięć chemicznych zanotowałam dla jąder fosforu reszt G4, G5, G14, oraz mniejsze dla reszt C3 i C13.
- Więzy odległościowe i kątowe otrzymane z analizy widm NMR wykorzystałam do ustalenia struktur przestrzennych analizowanych dupleksów za pomocą restryktywnej dynamiki molekularnej.
 - Obliczenia prowadziłam z wykorzystaniem standardowo dostępnego pola siłowego CHARM po wprowadzeniu odpowiednich parametrów związanych z włączoną modyfikacją.
 - Otrzymane struktury dwóch badanych dupleksów mają regularną strukturę B-DNA. Wszystkie kąty przyjmują wartości charakterystyczne dla typowych struktur B-DNA. W dupleksie modyfikowanym wszystkie reszty cukrowe przyjmują konformacje C2'-endo. Wstępna analiza parametrów helikalnych również potwierdza geometrię dupleksów B-DNA.

(C) Otrzymanie nowej klasy związków – analogów poliaminooligonukleotydów

- Zaprojektowałam szlak syntetyczny amidofosforynów analogów poliaminonukleotydów tak, by można je było wprowadzić do oligonukleotydów.
- Wybrałam cztery łączniki, jako substytuty pierścienia cukrowego, różniące się długością łańcucha metylenowego pomiędzy grupami hydroksylowymi. Wykorzystałam układ 1,2-diolowy kwasu glicerynowego oraz 1,3-diolowy kwasu 2,2-bis-(hydroksymetylo)propionowego oraz α -hydroksy- γ -laktonu. Wykorzystałam oba enancjomery estru metylowego kwasów glicerynowych (D i L), żeby ocenić wpływ konfiguracji na wiązanie się do nici oligomeru. W wyniku wprowadzenia modyfikacji do oligomeru, takie układy przestrzenne łączników pozwalają zminimalizować powstałe zaburzenia oddziaływań wodorowych i warstwowych w komplementarnych niciach DNA.
- W pierwszej kolejności otrzymałam analog poliaminonukleotydu z najprostszą aminą biogenną – putrescyną (1,4-diaminobutan), która pełniła w moich badaniach rolę cząsteczki modelowej. Docelowo otrzymałam analogi poliaminukleotydowe sperminy, która wśród amin biogennych charakteryzuje się największym powinowactwem strukturalnym względem DNA.
- Otrzymałam amidofosforyny nienukleozydowych analogów putrescyny (**90**) oraz sperminy (**91-94**):

- 3-Amidofosforyn *N*-(4-(*N*-trifluoroacetamido)butylo)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2-metylo-propanoamidu (**90**);
 - 3-Amidofosforyn *N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2-metylo-propanoamidu (**91**);
 - 2-Amidofosforyn (*S*)-*N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-propanoamidu (**92**);
 - 2-Amidofosforyn (*R*)-*N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-propanoamidu (**93**);
 - 2-Amidofosforyn *N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-4-(4,4'-dimetoksytrytylo)-butyroamidu (**94**).
- Otrzymane amidofosforyny analogów poliaminodeoksynukleozydów, okazały się związkami mało trwałymi, a w przypadku pochodnych glicerynowych bardzo wrażliwymi na śladowe ilości zanieczyszczeń. Pomimo braku wystarczającej trwałości amidofosforynów analogów poliaminonukleozydów udało mi się zsyntezować analogi poliaminooligonukleotydów:
 - Otrzymałam analogi poliaminooligonukleotydów z włączonymi związkami **90**, **92-94** na końcu 5' jednej z nici i przeprowadziłam badania ich wpływu na trwałość struktur dwuniciowych. Wprowadzenie analogu **92** i **94** na koniec 5' oligomeru powodowało podwyższenie trwałości modyfikowanych dupleksów. Dla pozostałych analogów nie obserwowałam wzrostu trwałości struktury dwuniciowej.
 - Otrzymałam również oligonukleotydy z włączonymi analogami **90**, **93**, **94** w środkowej części nici (jednostronne wybrzuszenie). W każdym z badanych dupleksów nie obserwowałam efektu stabilizacyjnego. Jednak wartości energii swobodnej świadczyły o dużej trwałości powstałych struktur dwuniciowych. Zmiana globalnego ładunku oligonukleotydu po wprowadzeniu modyfikacji nie wpłynęła na zdolność analogu poliaminooligonukleotydu do tworzenia dupleksu.
 - Fakt, że za każdym razem dochodziło do hybrydyzacji modyfikowanego oligonukleotydu z komplementarną nicią DNA świadczy o dużym powinowactwie poliaminowych analogów wobec DNA.
 - Zaobserwowałam różnice wpływu analogów na trwałość powstających dupleksów w zależności od konfiguracji chiralnego atomu węgla w analogach **92** i **93**.
 - Opracowując szlak syntetyczny wykorzystałam reakcje, które zachodzą pod wpływem fal mikrofalowych ('zielona chemia').

Reasumując, badania właściwości fizykochemicznych poliaminooligonukleotydów potwierdziły wcześniejsze ustalenia świadczące o dużym powinowactwie poliaminooligonukleotydów wobec kwasów nukleinowych. Na podstawie przeprowadzonych analiz można wyciągnąć wniosek, że miejsce modyfikacji i liczba wprowadzonych reszt poliaminy nie wpływa znacząco na trwałość

dupleksów DNA. Przeprowadzając badania mięknięcia dupleksów w roztworach o niskim stężeniu soli potwierdziłam, że o efekcie stabilizacyjnym decyduje polikationowy charakter poliaminy. Wyniki moich badań pozwoliły na postawienie tezy, że poliamina nie zakłóca parowania zasad typu Watsona-Cricka w modyfikowanych dupleksach. Jeżeli wprowadzenie modyfikacji do oligomeru wpływa znacząco na zmianę parametrów helikalnych pomiędzy zasadami sąsiadującymi z modyfikowaną jednostką nukleotydową, to włączenie poliaminy może niwelować ten efekt, stabilizując lub przynajmniej nie obniżając znacząco trwałości struktur dupleksowych.

Równocześnie badania prowadzące do określenia sposobu oddziaływań dupleksu zawierającego poliaminonukleotyd potwierdziły wcześniejsze modele oddziaływań poliamin z kwasami nukleinowymi. W otrzymanej strukturze modyfikowanego dupleksu obserwowałam parowanie zasad typu Watsona-Cricka pomiędzy resztą dC^{Sp} i komplementarną do niej resztą G14. Niewielki wzrost trwałości dupleksu jest spowodowany oddziaływaniami elektrostatycznymi i słabymi wiązaniami wodorowymi utworzonymi pomiędzy protonami grup aminowych reszty sperminy a grupami fosforanowymi szkieletu cukrowego lub atomem O6 i N7 reszty deoksyguanozyny leżącej w komplementarnej nici DNA. Potwierdziłam również tendencje do układania się łańcucha^{86,91-93,97} poliaminowego w dużej bruździe.

Porównałam trwałość dupleksów modyfikowanych analogiem poliaminonukleotydu na końcu 5' do efektu termodynamicznego, jakie niesie ze sobą włączenie niesparowanego nukleotydu na końcu 5'. Okazało się, że wartość energii swobodnej dupleksów zawierających analog poliaminonukleotydu na końcu 5' jest porównywalna lub wyższa od wartości energii swobodnej wynikającej z wprowadzenia nukleotydu.ref

Analiza porównawcza dupleksów posiadających analog poliaminonukleotydu w środkowej części nici i dupleksów zawierających nukleotyd jako jednostronne wybrzuszenie pokazała, że wartości energii swobodnej dupleksów z jednostronnym wybrzuszeniem w obu przypadkach są podobne.ref

Mimo, że poliaminooligonukleotydy i ich analogi nie podwyższają znacząco trwałości struktur dwuniciowych, a wprowadzenie do oligomeru reszty poliaminy bez obecności nukleotydu obniża trwałość dupleksów, to związki te mogą być wykorzystywane np. do ułatwienia transportu przez błony komórkowe. Fakt, że wprowadzenie więcej niż jednego łańcucha poliaminy, niezależnie od miejsca, nie dezorganizuje struktury dupleksu, jest obok wysokiego powinowactwa do DNA dodatkowym atutem tego typu cząsteczek.

W świetle powyższych stwierdzeń celowe wydaje się podjęcie prób wykorzystania koniugatów poliamin i oligonukleotydów (np. oligonukleotydów) w eksperymentalnych podejściach terapeutycznych. Układy poliaminowe mogą pełnić funkcję 'koniu trojańskiego' przenosząc przez błony komórkowe inne biologicznie czynne związki lub stanowić składnik mieszanin stosowanych do transfekcji.

5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

5.1. Odczynniki chemiczne

Rozpuszczalniki

Wymienione rozpuszczalniki, przed wykorzystaniem w pracach doświadczalnych, zostały przygotowane wg zamieszczonych opisów. Rozpuszczalniki przechowywano nad sitami molekularnymi 3 Å firmy Merck (Niemcy).

Nazwa rozpuszczalnika	Producent	Stopień czystości	Sposób oczyszczania
Acetonitryl	Lab-Scan, Romil	cz.d.a.	Użyto bezpośrednio.
Benzen	POCh Gliwice	cz.d.a.	Ogrzewano z wodorkiem wapnia (II)-CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Bezwodnik octowy	POCh Gliwice	cz.	Destylowano; przechowywano nad sitami.
Chlorek metylenu	POCh Gliwice	cz.	Sączony przez kolumnę wypełnioną tlenkiem glinu (III) – Al ₂ O ₃
Eter dietylowy	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano z nad CaH ₂ ; przechowywano nad sitami.
N,N-Dimetyloformamid (DMF)	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem; przechowywano nad sitami.
1,4-Dioksan	POCh Gliwice	cz.	Sączono przez kolumnę wypełnioną Al ₂ O ₃ , następnie ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
n-Heksan		cz.d.a.	Użyto bezpośrednio
Octan etylu	POCh Gliwice	cz.d.a.	Ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Pirydyna	Lobo Feinchemie	cz.d.a.	Destylowano z nad P ₂ O ₅ , po czym ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami; (średnia zawartość wody 10 ppm)
Pirydyna	POCh Gliwice	cz.	Kilka dni przechowywano nad wodorotlenkiem potasu – KOH; pozostałe czynniki j.w.; (średnia zawartość wody 15 ppm)
n-Propanol		cz.d.a.	Destylowano
Tetrahydrofuran (THF)	POCh Gliwice	cz.	Sączono przez kolumnę wypełnioną Al ₂ O ₃ , następnie ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Toluen	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano; przechowywano nad sitami

Reagenty

Wykorzystano poniższe reagenty po uprzednim oczyszczeniu:

Nazwa reagenta	Producent	Stopień czystości	Sposób oczyszczania
Chlorek tionylu	POCh Gliwice	cz.	Destylowano
Chlorek trimetylosililu(TMSCI)	POCh Gliwice	cz.	Destylowano.
Trietyloamina (TEA)	Fluka	cz.d.a.	Ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad CaH ₂

Niżej wymienione reagenty wykorzystano do reakcji bezpośrednio, bez wcześniejszego oczyszczenia:

Nazwa reagenta	Producent	Stopień czystości
Aldehyd 4-metoksybenzoesowy	Aldrich	98%
Amoniak (32%), wodny roztwór	Merck	cz.d.a
Azydek sodu	Merck	99%
Benzaldehyd	Aldrich	99%
o-Nitrobenzaldehyd	Aldrich	99%
Bezwodnik trifluorooctowy	Fluka	>98%
Bromek heksametylenododekanotrimetyloaminy	Aldrich	98%
Chlorek t-butyldimetylosililu	Aldrich	97%
Chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu (DMTCl)	Ifotam Co. Ltd.	98%
Chlorek 4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyny	Aldrich	97%
Chlorek piwaloilu	Fluka	98%
Chlorek sodu	POCh Gliwice	cz.
Chlorofosforan difenylowy (DPCP)	Aldrich	99%
4-Dimetyloaminopirydyna (DMAP)	Fluka	> 98%
Dwuwodorooortofosforan potasu	POCh Gliwice	cz.d.a.
Ester metylowy kwasu α,β -izopropylideno-D-glicerynowego	Fluka	>99%
Ester metylowy kwasu α,β -izopropylideno-L-glicerynowego	Fluka	>99%
α -hydrokso- γ -laktone	Aldrich	96%
Imidazol	Fluka	cz.d.a
Kakodylan sodu	Sigma	–
Kwas dichlorooctowy	Aldrich	99%
Kwas 2,2-bis(hydroksymetylo)propanowy	Aldrich	> 98%
Kwas fluorowodorowy(70% w pirydynie)	Aldrich	–
Kwas octowy (80%)	POCH Gliwice	cz.d.a.
Kwas p-toluenosulfonowy (p-TSA)	POCH Gliwice	cz.d.a.
Kwas trifluorooctowy (98%)	Fluka	98%
Kwas solny (35%)	POCh Gliwice	–
Metyloamina (33% etanolowy roztwór)	Fluka	–
N-Metyloimidazol	Aldrich	99%
N-Metylmorfolina (NMM)	Aldrich	> 99%
10% pallad na węglu (Pd/C)	Aldrich	–
Putrescyna	Aldrich	99%
Siaraczan magnezu bezw.	POCh Gliwice	cz.d.a.
Siaraczan sodu bezw.	POCh Gliwice	cz.d.a.
Sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminoczteroocowego (EDTA)	Fluka	–
Sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminoczteroocowego (EDTA)	POCh Gliwice	cz.
Spermina	Fluka	\geq 99%
Tiocyanian etylu	Merck	cz.d.a.
Woda amoniakalna (32%).	POCh Gliwice	cz.d.a

5.2. Aparatura

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego wykonano na spektrometrze Bruker AVANCE II 400 i Unity 300 firmy Varian (USA) w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) podano względem:

- tetrametylosilanu (TMS – stosowany jako wzorzec wewnętrzny) dla widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR w rozpuszczalnikach organicznych;
- 85 % H_3PO_4 (wzorzec zewnętrzny) dla widm ^{31}P NMR;
- kwasu trifluorooctowego (wzorzec zewnętrzny) dla widm ^{19}F NMR.

Analizę masową związków wykonano przy użyciu:

- spektrometru masowego Bruker Autoflex MALDI-TOF (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań);
- spektrometru masowego ESI.

Oligonukleotydy i ich pochodne syntetyzowano na aparatach do automatycznej syntezy DNA: Gene Assembler Plus Pharmacia LKB (Szwecja) oraz syntetyzerze DNA i RNA firmy K&A Laborgeräte GbR (Niemcy).

Analizy HPLC oligonukleotydów i ich pochodnych prowadzono na aparacie Prominence UFLC firmy Shimadzu. Mieszaniny oligonukleotydowe rozdzielano na kolumnie z fazą odwróconą Lichrospher. Jako bufor stosowano 0,01 M octan amonu ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$).

Widma UV wykonano przy użyciu spektrofotometru Beckman DU-65 oraz Jasco.

Pomiary termodynamiczne prowadzono na spektrofotometrze DU-640 firmy Beckman (USA) z termoprogramem. Pomiary absorpcji dokonywane były w zakresie 4 – 90°C, zmieniając temperaturę próbki o 1°C na minutę. Zmiany absorpcji mierzono przy długości 260 nm. Absorpcja każdej próbki była mierzona co 24 sekundy.

Do syntezy wykorzystano kuchenkę mikrofalową firmy Amica model AMM21E80Gs (2,4 GHz, maksymalna moc 800 W)

W celu zmierzenia zawartości wody w rozpuszczalnikach organicznych przeprowadzono miareczkowanie kulometryczne metodą Karla-Fischera na kulometrze Metrohm 684 KF (Szwajcaria).

5.3. Techniki ogólne

Chromatografia cienkowarstwowa – TLC

Mieszaniny reakcyjne i związki chemiczne chromatografowano metodą wstępującą w cylindrycznych komorach szklanych, których ścianki wyłożono bibułą zanurzoną w eluencie w celu wysycenia atmosfery jego parami. Chromatogramy rozwijano i analizowano na płytkach analitycznych firmy Merck (Niemcy) pokrytych żelazem krzemionkowym 60 HF₂₅₄* (* absorbent

zawiera czynnik fluoryzujący przy długości fali światła wzbudzającego 254 nm) stosując następujące elenty:

- (A) chlorek metylenu / metanol (9:1, v/v);
- (B) chlorek metylenu / metanol (97,5:2,5, v/v);
- (C) metanol / 33% etanolowy roztwór metyloaminy / woda (7:1:2, v/v/v);
- (D) chlorek metylenu;
- (E) *n*-propanol /amoniak /woda (52:38:10, v/v/v);
- (F) *n*-propanol /amoniak /woda (56:32:10, v/v/v);
- (G) benzen / trójetyloamina (9:1, v/v);
- (H) aceton / heksan / trójetyloamina (45:45:10, v/v/v):

W przypadku stosowania eluentu (H) uprzednio impregnowano płytki roztworem trójetyloaminy.

Kolumnowa chromatografia cieczowa

Pochodne poliamin oraz inne związki pośrednie oczyszczano stosując technikę kolumnowej chromatografii cieczowej. Jako wypełnienia kolumn użyto dwa rodzaje żelu krzemionkowego firmy Merck o następujących uziarnieniach: (i) 0,040-0,063 mm oraz (ii) 0,063-0,200 mm. Związki wymywano z kolumn stosując dwie metody: (i) metodę polegającą na zmianie składu procentowego eluentu, a tym samym zmianie siły jego eluowania lub (ii) metodę izokratyczną, w której skład procentowy eluentu nie ulega zmianie. Wykorzystano takie same elenty jak w przypadku chromatografii cienkowarstwowej.

Etylotiotetrazol

Tiocyanian etylu (21 ml, 0,25 mola), NaN_3 (19,6 g, 0,3 mola) oraz NH_4Cl (17 g, 0,31 mola) rozpuszczono w toluenie (50 ml) z dodatkiem H_2O (25 ml). Następnie dodano katalizator międzyfazowy bromek heksametylenododekanotrimetyloaminy (2,5 g, 6,8 mola). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80 °C przez 3 dni. Mieszania reakcyjna została oziębiona, zakwaszona do pH ~ 2 i pozostawiona w lodzie przez kilka godzin. Następnie jeszcze raz zakwaszona. Wykryształowany biały osad odsączono, przemyto kilkakrotnie toluenem i wysuszono. Otrzymano 24,7 g produktu; wyd. 79%.

3'-Amidofosforyn 6-*N*-[tris(*N,N',N''*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyny (dC^{SP})

Amidofosforyn dC^{SP} zsyntezowano wg procedury opracowanej w Pracowni Chemii Biokoniugatów IBCh PAN w Poznaniu przez dr Przemysława Godzinę.¹⁰⁰

Synteza bis-(*N,N*-diizopropylamino)(2-cyanoetoksy)fosfiny

Fosfinę zsyntezowano wg standardowej procedury: Zabezpieczoną przed dostępem wilgoci przechowywano w zamrażarce.¹²⁹

Bufor stosowany do pomiaru mięknięcia kompleksów oligonukleotydów:

100 mM NaCl, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7,0.

Bufor stosowany w eksperymentach NMR:

50 mM NaCl, 10 mM bufor fosforanowy, 0,1 mM EDTA, pH 7,0.

Powtarzalne procedury laboratoryjne

Do typowego przerobu mieszaniny reakcyjnej używano nasycony roztwór wodorowęglanu sodu i CH₂Cl₂. Warstwę wodną ekstrahowano trzykrotnie porcjami CH₂Cl₂.

Organiczne ekstrakty, otrzymywane w trakcie izolacji produktu z mieszaniny reakcyjnej sączono przez bezwodny siarczan sodu w celu ich odwodnienia.

Czyste produkty reakcji liofilizowano rozpuszczając je w benzenie, następnie zamrażano w ciekłym azocie i prowadzono sublimację rozpuszczalników na linii próżniowej od kilku do kilkunastu godzin.

Oligonukleotydy otrzymywano zautomatyzowaną metodą amidofosforynową na podłożu stałym CPG (załadowanie 20 – 30 μmoli/g) lub podłożu polistyrenowym Primer firmy Pharmacia LKB. Oczyszczanie odblokowanych oligonukleotydów i ich pochodnych prowadzono na płytkach z żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄, 0,25 mm, z zastosowaniem fazy rozwijającej E lub F.

5.4. Synteza pochodnych kwasu 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowego**Kwas 2,2-di-O-trimetylosililo-metylopropanowy (60)**

Do kwasu 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowego (1,34 g, 10 mmoli) rozpuszczonego w CH₂Cl₂ (20 ml) z dodatkiem Et₃N (2,9 ml, 21 mmoli, 2,1 ekw.) dodano kroplami chlorek trimetylosililu (2,9 ml, 21 mmoli, 2,1 ekw.). Reakcję prowadzono przez 2 godziny, a następnie zakończono przez dodanie NaHCO₃ i ekstrakcję CH₂Cl₂ (3x20 ml). Warstwę organiczną osuszono (MgSO₄) i odparowano otrzymując biały olej, który pozostawiono w lodówce. Po 24 h wykrył biały osad. Otrzymano 1,5 g czystego produktu **61**; wyd. 40%.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 3,55-3,67 (dd, 4H, *J* 11,2 Hz, *J* 9,2 Hz, 2xCH₂), 1,12 (s, 3H, CH₃), 0,05 (s, 18H, 2x(CH₃)₃Si)

Kwas 5-metylo-2-fenyl-1,3-dioksano-5-karboksylowy¹¹¹ (62)

Do kolby zawierającej kwas **59** (5 g, 37 mmoli) rozpuszczony w bezwodnym DMF (30 ml) dodano benzaldehyd (4,2 ml, 40,7 mmoli) i katalityczne ilości kwasu p-toulenosulfonowego

(355 mg, 1,85 mmola). Reakcję pozostawiono przez 4 dni w temperaturze pokojowej. Po tym czasie reakcję zakończono neutralizując p-TSA przez dodanie 2 ml roztworu $\text{NH}_4\text{OH}/\text{EtOH}$ (1:1). Rozpuszczalnik i nieprzereagowany aldehyd odparowano a surową mieszaninę rozpuszczono w CH_2Cl_2 i przemyto H_2O (3x 20 ml). Warstwę organiczną odparowano i produkt **62** w postaci dwóch izomerów otrzymano (6,38 g) przez rekrytalizację z CH_2Cl_2 ; wyd. 77,1%; $R_f(\text{A}) = 0,48$; $R_f(\text{A}) = 0,52$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): izomer B : δ (ppm) 7,28-7,46 (m, 5H, Ph), 5,45 (s, 1H, PhCHO_2), 4,65 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,67(d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 1,02 (s, 3H, CH_3); izomer A: δ (ppm) 7,28-7,51 (m, 5H, Ph), 5,41 (s, 1H, PhCHO_2), 4,14-4,06 (k, 4H, J 11,23 Hz, J 9,27 Hz, $2\times\text{CH}_2$), 1,57 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 178,89 (COOH), 137,58 (C1, Ph), 129,081 (C4,Ph), 128,23 (C2 i C6; Ph), 128,23 (C3 i C5, Ph), 101,86 (O-C-O), 73,43 ($2\times\text{CH}_2$), 42,17 (CMe), 17,78 (CH_3).

ESI MS: $[\text{M}-\text{H}]^-$ 221,08 obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ 222,24.

Kwas 5-metylo-2-(4-metoksy)-1,3-dioksano-5-karboksylowy¹¹⁴ (63)

Kwas 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowy (1 g, 7,4 mmole), aldehyd 4-metoksy benzoesowy (1,34 ml, 11,1 mmoli) i PPTS (40 mg, 0,148 mmola) rozpuszczono w 15,4 ml benzenu. Do kolby dodano MgSO_4 i reakcje prowadzono w suszarce w temperaturze 75°C przez 4 dni. Następnie rozpuszczalnik odparowano a surową mieszaninę rozpuszczono w CH_2Cl_2 i ekstrahowano kwaśnym węglanem sodu. Część produktu **63** wykryta z CH_2Cl_2 w trakcie ekstrakcji. Pozostałą część warstwy organicznej odparowano i uzyskany olej oczyszczono na kolumnie chromatograficznej ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$). Otrzymano 1,4 g związku **63** w postaci dwóch izomerów; wyd. 75 %, $R_f(\text{A}) = 0,65$; $R_f(\text{A}) = 0,38$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,41 (d, J 8,78 Hz, 2H, *orto*-Ph), 6,86 (d, J 8,78 Hz, 2H, *meta*-Ph), 5,45 (s, 1H, PhCHO_2), 4,56 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,7 (s, 3H, OCH_3), 3,67 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 1,10 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 178,89 (COOH), 159,9 (C4, Ph), 129,7 (C1, Ph), 127,9 (C2 i C6, Ph), 113,4 (C3 i C5, Ph), 101,86 (O-C-O), 73,43 ($2\times\text{CH}_2$), 42,17 ($(\text{CH}_2)_2\text{CMe}$), 17,78 (CH_3).

ESI MS: $[\text{M}-\text{H}]^-$ 251,09 obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 252,26.

Kwas 5-metylo-2-(o-nitrofenylo)-1,3-dioksano-5-karboksylowy (64)

W zlewce o pojemności 50 ml umieszczono kwas 2,2-bis-(hydroksymetylo)propanowy (201 mg, 1,5 mmola), aldehyd o-nitrobenzoesowy (199 mg, 1,3 mmola) i p-TSA (30 mg, 0,075 mmola). Wszystkie substraty dobrze razem wymieszano i zlewkę umieszczono w kuchence mikrofalowej. Reakcję prowadzono przez 18 minut z 50% mocą kuchenki. Zlewkę ochłodzono do temperatury pokojowej a następnie wiano do niej $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaHCO}_3$. Połączone ekstrakty organiczne odparowano uzyskując czysty produkt **64** w postaci białego osadu. W postaci dwóch izomerów otrzymano 356 mg związku **84**; wyd. 89%; $R_f(\text{A}) = 0,71$

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,12 (d, 1H, Ph), 7,45-7,7 (m, 3H, Ph), 6,11 (s, 1H, PhCHO₂), 4,61 (d, 2H, *J* 11,5 Hz, 2 x *a* lub *e* OCHCCO), 3,7 (d, 2H, *J* 11,5 Hz, 2 x *a* lub *e* OCHCCO), 1,1 (s, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 179,9 (COOH), 148,22 (CNO₂, Ph), 132,9 (C, Ph), 131,6 (C, Ph), 129,7 (C,Ph), 127,9 (C, Ph), 124,4 (C, Ph), 97,3 (O-C-O), 73,43 (2xCH₂), 42,3 (CMe), 17,74 (CH₃).

ESI MS: [M-H]⁻ 266,06 obliczone dla C₁₂H₁₃NO₆ 267,23.

***N*-butylo-5-metylo-2-fenylo-1,3-dioksano-5-karboksyamid (66)**

Substrat **62** (200 mg, 0,89 mmola) rozpuszczono w pirydynie (5 ml) następnie dodano CDMT (187,4 mg, 1,06 mmola, 1,2 ekw.) oraz NMM (292 μl, 2,67 mmola, 3 ekw.). Reakcję prowadzono w zamkniętym naczyniu w temperaturze pokojowej. Po 1 godz. do kolby z mieszaniną reakcyjną dodano *n*-butyloaminę (65,83 mg, 0,89 mmola, 1 ekw.) i reakcję prowadzono kolejne 2 godziny. Po tym czasie reakcję przerwano przez dodanie wodorowęglanu sodu (10 ml) i kilkakrotnie ekstrahowano CH₂Cl₂. Warstwę organiczną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość oczyszczono na silikażelowej płycie preparatywnej (PTLC) otrzymując 50 mg związku **66** w postaci białego osadu. 60% wyd.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,34-7,47 (m, 5H, Ph), 5,49 (s, 1H, PhCHO₂), 4,30 (d, 2H, *J* 11,7 Hz, 2 x *a* lub *e* OCHCCO), 3,78 (d, 2H, *J* 11,7 Hz, 2x *e* lub *a* OCHCCO), 3,31 (k, 2H, *J* Hz, HNCH₂) 1,44-1,52 (m, 2H, CH₂ reszty *n*-butyloaminy) 1,25-1,37 (m, 2H, CH₂- reszty *n*-butyloaminy), 1,04 (s, 3H, CH₃CO); 0,86 (t, 3H, *J*, CH₃);

***N*-(4-aminobutylo)-5-metylo-2-fenylo-1,3-dioksano-5-karboksyamid (67)**

Związek **62** rozpuszczono w suchym chlorku metylenu (44 ml) z 10% zawartością pirydyny i kilku kropli DMF. Następnie kroplami dodawano chlorek tionylu (1,26 ml, 17,8 mmola). Reakcję prowadzono przez 2 godziny a następnie nadmiar chlorku usunięto przez kilkakrotne odparowanie z chlorkiem metylenu i toluenem. Otrzymany brązowy olej został rozpuszczony w bezwodnym chlorku metylenu (46 ml) a następnie dodany do roztworu putrescyny (4,47 ml, 44,5 mmola) i trójetyloaminy (1,4 ml) w chlorku metylenu (2 ml) umieszczonego w łaźni (-10 °C). Po 1 godzinie mieszania za pomocą mieszadła magnetycznego w temperaturze pokojowej reakcję zakończono przez dodanie NaHCO₃. Warstwę wodną kilkakrotnie ekstrahowano CH₂Cl₂. Warstwę organiczną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Czysty produkt eluowano 4% roztworem MeOH w CH₂Cl₂ otrzymując 1,57 g żółtego oleju **67**; wyd. całkowita 60%. R_f(A) = 0,5.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,34-7,43 (m, 5H, Ph), 7,16 (t, 1H, NHCO), 5,5 (s, 1H, PhCHO₂), 4,33 (d, 2H, *J* 12 Hz, 2 x *a* lub *e* OCHCCO), 3,78 (d, 2H, *J* 12 Hz, 2 x *a* lub *e* OCHCCO), 3,33 (k, 2H, *J* 6,3 Hz, *J* 5,8 Hz, CH₂-reszty putrescyny) 3,21 (k, 2H, *J* 6,3 Hz, *J* 5,8 Hz, CH₂-reszty putrescyny), 1,5-1,56 (m, 4H, CH₂-2,3 reszty putrescyny), 1,04 (s, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 137,45 (C1, Ph), 128,7 (C4,Ph), 128,03 (C2 i C6; Ph), 125,53 (C3 i C5, Ph), 101,22 (OCO), 75,07 (2xCH₂), 47,6 (CMe), 47,6 (2xCH₂ reszty putrescyny), 26,53 (2xCH₂ reszty putrescyny), 18,03 (CH₃).

***N*-(4-(2,2,2-trifluoroacetamido)butyl)-5-methyl-2-phenyl-1,3-dioksano-5-karboksyamid (79)**

Substrat **67** (430 mg, 1,47 mmola) odparowano z bezwodną pirydyną (3x 5 ml) i ponownie rozpuszczono w 14,7 ml pirydyny, a następnie dodano NMI (1 ekw. 1,46 mmola, 116 μl), Roztwór oziębiono i dodano bezwodnik trifluorooctowy (593 μl, 4,41mmola, 3 ekw.). Po 30 min. reakcję zakończono, roztwór podzielono między nasycony NaHCO₃ (30 ml), a CH₂Cl₂ (30 ml). Warstwę wodną ekstrahowano porcjami chlorku metylenu (2x 30 ml), które odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskany olej naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Czysty produkt wyeluowano chlorkiem metylenu i otrzymano 300 mg oleju **79** ; wyd. 52; R_f(D) 0,8.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,33-7,45 (m, 5H, Ph), 5,5 (s, 1H, PhCHO₂), 4,38 (d, 2H, *J* 11,7 Hz, 2 x *a* lub *e* OCHCCO), 3,78 (d, 2H, *J* 11,7 Hz, 2 x *a* lub *e* OCHCCO), 3,2-3,4 (m, 4H, 2xCH₂-reszty putrescyny), 1,49-1,54 (m, 4H, CH₂-2,3 reszty putrescyny), 1,06 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 182,83 (Ph), 137,45 (C1, Ph), 128,7 (C4,Ph), 128,03 (C2 i C6; Ph), 125,53 (C3 i C5, Ph), 101,22 (OCO), 75,07 (2xCH₂), 47,6 (CMe), 47,6 (2xCH₂ reszty putrescyny), 26,53 (2xCH₂ reszty putrescyny), 18,03 (CH₃).

¹⁹F NMR 1,78 (s, 3F, CF₃).

***N*-(4-(*N*-trifluoroacetamido)butylo)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2-hydroksymetylo-2-metylopropanoamid (85)**

W 6 N roztworze HCl/EtOH (HCl(aq)/EtOH, 1:5, v/v) rozpuszczono związek **79** (240 mg, 0,61 mmola) i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 72 godziny. Nadmiar kwasu solnego usunięto przez kilkakrotne odparowanie z metanolem i toluenem otrzymując brunatny olej. Po 24 godzinnym suszeniu na linii próżniowej i odparowaniu z pirydyną (2x5 ml) surowy produkt rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (2,4 ml). Dodano DMTCl (243 mg, 0,72 mmole, 1,2 ekw.). Reakcję zakończono po około 3 godzinach. Następnie dodano NaHCO₃ i ekstrahowano CH₂Cl₂. Warstwę organiczną osuszono (MgSO₄) i odparowano, a uzyskany surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej. Czysty produkt w postaci piany rozpuszczono w bezwodnym benzenie (1ml) po czym zamrożono i zliofilizowano na linii próżniowej otrzymując 180 mg żółtego ciała stałego **85**; wyd. całkowita 48,4%. R_f(A) = 0,5

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,43-6,86 (m, 13H, Ph), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,83 –3,62 (m, 4H, 4 x *a* lub *e* OCHCCO), 3,43-3,23 (m, 4H, CH₂-1,4 reszty putrescyny), 1,4-1,8 (m, 4H, CH₂-2,3 reszty putrescyny), 1,2 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 174,4 (C=O), 158,5 (Ph), 158,4 (C od TFA), 144,6 (Ph), 135,5 (Ph), 130,02 (Ph), 128,3 (Ph), 128,05 (Ph), 126,8 (Ph), 113,16 (Ph), 113,09 (CF₃), 86,2 (C(Ph)₃) 67,15

(OCH₂), 65,7 (OCH₂), 55,19 (OCH₃), 47,8 (CMe), 43,5 (CH₂ reszty putrescyny), 38,9 (CH₂ reszty putrescyny), 24,5 (2xCH₂ reszty putrescyny), 18,7 (CH₃).

N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5-metylo-2-fenyl-1,3-dioksano-5-karboksyamid (68)

Metoda (a)

Do kwasu 5-metylo-2-fenyl-1,3-dioksano-5-karboksyłowego **62** (3 g, 13,5 mmola) rozpuszczonego w bezwodnym etanolu (67,5 ml) z dodatkiem Et₃N (2 ml, 14,85 mmola, 1,1 ekw.) dodano chlorek tionylu (2,6 ml, 33,7 mmola, 2,5 ekw.). Reakcję prowadzono przez 16 godzin a następnie nadmiar chlorku usunięto przez kilkakrotne odparowanie z chlorkiem metylenu i toluenem.

Część otrzymanego oleju (400 mg) rozpuszczono w bezwodnym THF (4 ml) i dodano sperminę (3,2 g, 15,9 mmola, 10 ekw.). Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną a następnie w suszarce przez 24 godz. w temp. 65-70°C. Reakcję zakończono przez wlanie nasyconego NaHCO₃ (20 ml) i chlorku metylenu (2 x 30 ml). Po ekstrakcjach fazy organiczne zatężono na wyparce. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, stosując mieszaninę metanolu, 33% etanolowego roztworu metyloaminy i wody jako eluent. Uzyskano 400 mg **68** w postaci oleju; wyd. 30%; R_f(A) = 0,5. R_f(A) = 0,35.

Metoda (b)

Kwas 5-metylo-2-fenyl-1,3-dioksano-5-karboksyłowy **62** (1 g, 4,4 mmola) rozpuszczono w tetrahydrofuranie (20 ml) i dodano chlorek piwaloilu (0,607 ml, 4,9 mmola, 1,1 ekw.) i Et₃N (1,25 ml). Reakcję prowadzono przez 40 minut, a następnie dodano sperminę (4,5 g, 22,45 mmola, 5 ekw.) prowadząc reakcję przez kolejne 2 h. Po zakończeniu reakcji dodano NaHCO₃ i ekstrahowano CH₂Cl₂. Po osuszeniu i odparowaniu warstwy organicznej, pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując mieszaninę metanolu, 33% etanolowego roztworu metyloaminy i wody jako eluent. Stosowano gradient od 78 : 2 : 20 do 76 : 4 : 2. Uzyskano 914 mg **68** w postaci oleju; wyd. 50%. R_f(A) = 0,5. R_f(A) = 0,35.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,5-7,16 (m, 5H, Ph), 5,51 (s, 1H, PhCHO₂), 4,3 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,8 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,2-3,49 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 –reszty sperminy), 1,5-1,87 (m, 8H, 3, 7, 8, 12 – reszty sperminy) 1,04 (s, 3H, CH₃).

N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5-metylo-2-(4-metoksy)-1,3-dioksano-5-karboksyamid (69)

Reakcję dla związku **63** prowadzono (500 mg, 1,97 mmoli) analogicznie do procedury otrzymywania związku **68**. Otrzymano 406 mg związku **69** w postaci oleju wyd. 47%. R_f(A) = 0,5.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,43-6,86 (m, 5H, Ph), 5,44 (s, 1H, PhCHO₂), 4,3 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2x a lub e OCHCCO), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,73 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,4-3,2 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 –reszty sperminy), 1,47-1,73 (m, 8H, 3, 7, 8, 12 – reszty sperminy), 1,01 (s, 3H, CH₃).

N*-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5-metylo-2-(o-nitrofenylo)-1,3-dioksano-5-karboksyamid (70)*Metoda (b) stosowana dla związku 62**

Reakcję prowadzono dla pochodnej **64** (350 mg, 0,772 mmola) analogicznie do otrzymywania związku **68**. Otrzymano 147 mg związku **70** w postaci oleju, wyd. 27%. $R_f(A) = 0,5$.

Metoda (c)

Kwas 5-metylo-2-(o-nitrofenylo)-1,3-dioksano-5-karboksylowy (1,3 g, 4,68 mmola) i chlorofosforan difenyłu (1,26 ml, 6 mmoli, 1,3 ekw.) rozpuszczono w 15,6 ml bezwodnej pirydyny. Po 40 minutach dodano sperminę (2,8 g, 14 mmoli, 3 ekw.). Kolbę z mieszaniną reakcyjną pozostawiono na 2 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie pirydynę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 30 ml chlorku metylenu i ekstrahowano NaHCO_3 w celu usunięcia nadmiaru sperminy. Część organiczną odparowano a otrzymany olej oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Produkt eluowano mieszaniną $\text{MeOH} / \text{MeNH}_2 / \text{H}_2\text{O}$ uzyskując 1,8 g produktu **70**; wyd. 80%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,14-7,36 (m, 4H, Ph), 6,09 (s, 1H, PhCHO_2), 3,72-4,4 (m, 4H, 4x a lub e OCHCCO), 3,3-3,12 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 –reszty sperminy), 1,47-1,73 (m, 8H, 3, 7, 8, 12 – reszty sperminy), 1,01 (s, 3H, CH_3);

***N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5-metylo-2-fenylo-1,3-dioksano-5-karboksyamid (80)**

Substrat **68** (300 mg, 0,66 mmola) suszono na linii próżniowej przez noc. Następnie rozpuszczono w 10 ml pirydyny. Kolbę zamknięto gumowym korkiem i po umieszczeniu w łaźni lodowej dodano porcjami bezwodnik trifluoroctowy (554 μl , 3,99 mmola, 6 ekw.). Po dodaniu ostatniej porcji reakcja była prowadzona jeszcze przez 20 min. w temperaturze pokojowej. Reakcję zakończono przez wlanie nasyconego NaHCO_3 (20 ml) i chlorku metylenu (2 x 30 ml), fazy organiczne osuszono i zatężono na wyparce. Surowy produkt **80** oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, stosując $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ jako eluent. Czysty produkt wypłynął przy 2% stęż. MeOH . Otrzymano 560 mg oleju **80**; wyd. 60% .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,16-7,5 (m, 5H, Ph), 5,52 (s, 1H, PhCHO_2), 4,3 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,8 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,2-3,49 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 –reszty sperminy), 1,5-1,87 (m, 8H, 3, 7, 8, 12 – reszty sperminy) 1,04 (s, 3H, CH_3);

***N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5-metylo-2-(4-metoksy)-1,3-dioksano-5-karboksyamid (81)**

Reakcję prowadzono analogicznie do otrzymywania związku **80**; wyd. 60%; $R_f(A) = 0,76$
 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 6,8-7,36 (m, 4H, Ph), 5,46 (s, 1H, PhCHO_2), 4,27 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,78 (s, 3H, OCH_3), 3,65 (d, 2H, J 11,7 Hz, 2 x a lub e OCHCCO), 3,12-3,4 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 –reszty sperminy), 1,45-1,88 (m, 8H, 3, 7, 8, 12 – reszty sperminy) 1,04 (s, 3H, CH_3).

N-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5-metylo-2-(o-nitrofenylo)-1,3-dioksano-5-karboksyamid (82)

Reakcję prowadzono analogicznie do otrzymywania związku **80**; wyd. 62%; $R_f(A) = 0,76$
 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,16-7,34 (m, 4H, Ph), 6,12 (s, 1H, PhCHO_2), 3,66-4,37 (m, 4H, 4 x a lub e OCHCCO), 3,08-3,37 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 –reszty sperminy), 1,48 (m, 4H, 3, 12 –reszty sperminy), 1,73-1,75 (m, 4H, 7, 8– reszty sperminy) 1,02 (s, 3H, CH_3);

ESI MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 763,26 obliczone dla $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{F}_9\text{N}_5\text{O}_8$ 739,58.

Usuwanie grup benzylidenowych— **usunięcie grupy benzylidenowej i p-metoksybenzylidenowej****metoda (a)**

Substrat rozpuszczono w 6 M roztworze HCl w EtOH (1:5; v/v) i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 5 dni. Mieszaninę zatężono a nadmiar kwasu usunięto przez kilkukrotne odparowanie z metanolem i toluenem. Surową mieszaninę przeznaczono do reakcji trytylowania.

metoda (b)

Do acetalu **81** (448 mg, 0,62 mmola) w 10% roztworze HCOOH/MeOH (3,3 ml 85% HCOOH w 30 ml MeOH) dodano zawiesinę 5% Pd/C (1 g) w metanolu (10 ml). Reakcję prowadzono przez 48 godz. w temp. pokojowej, następnie dodano jeszcze jedną porcję alkoholowego roztworu kwasu mrówkowego i reakcję prowadzono w temp. 67 °C przez 6 godzin. Katalizator odsączono a nadmiar kwasu usunięto przez kilkukrotne odparowanie z metanolem i toluenem. Surową mieszaninę przeznaczono do reakcji trytylowania.¹¹⁷

metoda (c)

Acetal **81** (0,2 mmola) i mrówczan amonu (100 mg) w rozpuszczono w metanolu (5-10 ml). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w obecności 5% Pd/C (400 mg) przez 72 godz. Po zakończeniu reakcji katalizator został odsączony, a przesącz zatężony. Surową mieszaninę przeznaczono do reakcji trytylowania.¹¹⁸

— **usunięcie grupy o-nitrobenzylidenowej****metoda (a)**

Acetal **82** rozpuszczono w roztworze kwasu trifluorooctowego (TFAA), MeOH , CH_2Cl_2 w stosunku 2:5:2. mieszaninę trzymałam w łaźni lodowej utrzymując przez cały czas trwania reakcji temperaturę 0 °C i naświetlałam lampą UV o długości fali $\lambda = 254$ nm. Reakcja trwała ok. 72 godzin. Po tym czasie rozpuszczalniki odparowano a nadmiar kwasu usunięto przez kilkukrotne odparowanie z toluenem. Surową mieszaninę przeznaczono do reakcji trytylowania.¹³¹

5.5. Synteza pochodnych kwasów α,β -izopropylideno-D(L)-glicerynowych

(S)-N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-2,2-dimetylo-1,3-dioksolano-4-karboksyamid (73)

Ester metylowy kwasu α,β -izopropylideno-D-glicerynowego (450 μ l, 3 mmole) oraz sperminę (2,4 g, 12 mmoli, 4 ekw.) rozpuszczono w bezwodnym metanolu (1 ml). Reakcje prowadzono przez 48-72 godziny w temperaturze 25-35 °C. Następnie rozpuszczalnik odparowano. Do pozostałej mieszaniny dodano NaHCO₃ (20 ml) i chlorek metylenu (2 x 30 ml). Organiczne ekstrakty odparowano a uzyskany olej oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Produkt eluowano mieszaniną MeOH/MeNH₂/H₂O uzyskując, 720 mg produktu **73**; wyd. 70%; R_f(C) = 0,52;

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,21 (m, 1H, NHCO), 4,45 i 4,05 (2 x k, 2 x 1H, J 5,37 Hz, J 2,44 Hz lub 3,41 Hz, 2xCOCH) 4,22 (t, 1H, J 7,8, OCHCO), 3,28-3,36 (m, 2H, 2 – reszta sperminy), 2,53-2,65 (m, 10H, 4, 6, 9, 13 – reszta sperminy), 2,059 (4H, NH), 1,66 (m, 2H, 3,12 – reszta sperminy), 1,49 (m, 2H, 7, 8 – reszta sperminy) 1,04 (s, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 171,34 (C=O), 110,67 (OCO), 74,8 (C, 1,3-dioksolan, α), 67,6 (C, 1,3-dioksolan, β), 49,14 (reszta sperminy), 46,8 (reszta sperminy), 37,13 (reszta sperminy), 28,65 (reszta sperminy), 27,17 (reszta sperminy), 26,06 (reszta sperminy), 24,8 (2x CH₃);

ESI MS: [M+K]⁺ 371,28 obliczone dla C₁₆H₃₄N₄O₃ 330,47.

(R)-N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-2,2-dimetylo-1,3-dioksolano-4-karboksyamid (74)

Reakcję prowadzono analogicznie do otrzymywania związku **73**; wyd. 55%; R_f(C) = 0,52;

ESI MS: [M+H]⁺ 331,27 obliczone dla C₁₆H₃₄N₄O₃ 330,47.

(S)-N-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-2,2-dimetylo-1,3-dioksolano-4-karboksyamid (83)

Substrat **73** (350 mg, 1,05 mmola) odparowano z bezwodną pirydyną (3 x 5 ml) i ponownie rozpuszczono w 10 ml pirydyny. Roztwór oziębiono i dodano porcjami bezwodnik trifluoroocetowy (875 μ l, 6,3 mmola, 6 ekw.). Po dodaniu ostatniej porcji reakcja była prowadzona przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Reakcję zakończono przez dodanie nasyconego NaHCO₃ (30 ml). Warstwę wodną ekstrahowano porcjami chlorku metylenu (2 x 30 ml), które odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Czysty produkt wyeluowano chlorkiem metylenu z 2% MeOH i otrzymano 368 mg oleju **83**; wyd. 58%; R_f(C) = 0,8.

ESI MS: [M+K]⁺ 657,17 obliczone dla C₂₂H₃₁F₉N₄O₃ 618,21.

(R)-N-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-2,2-dimetylo-1,3-dioksolano-4-karboksyamid (84)

Reakcję prowadzono analogicznie do otrzymywania związku **83**; wyd. 58%; R_f(C) = 0,8

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,09 (m, 1H, NHCO), 6,72 (m, 1H, NHCO), 4,46 i 4,07 (2 x k, 2 x 1H, J 5,34 Hz, J 3,78 Hz, 2xCOCH) 4,28 (t, 1H, J 7,64 Hz, OCHCO), 3,25-3,49 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 – reszta sperminy), 1,78-1,86 (m, 4H, 3,12 – reszta sperminy), 1,61 (m, 4H, 7, 8 – reszta sperminy) 1,39 (s, 3H, CH_3).

$^{19}\text{F NMR}$ 6,98-7,22 (m, 9H, 3x CF_3).

ESI MS: $[\text{M}+\text{K}]^+$ 657,17 obliczone dla $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{F}_9\text{N}_4\text{O}_3$ 618,21.

Usuwanie grupy izopropylidenowej

Metoda (a)

Substrat **83** (500 mg, 0,75 mmola) rozpuszczono 50% wodnym roztworze kwasu octowego (4,5 ml). Kolbę reakcyjną umieszczono 40 minut suszarce w temp. 50 °C. Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano kilkakrotnie z metanolem i toluenem w celu pozbycia się niepożądanego kwasu. Otrzymany surowy produkt przeznaczono do reakcji trytylowania.

Metoda (b)

Do roztworu **83** (500 mg, 0,75 mmola) w metanolu (4 ml) dodano kwas p-toluenosulfonowy (30 mg, 0,15 mmola). Kolbę reakcyjną pozostawiono na noc w temp. pokojowej. Po ok. 30 godz. odparowano metanol i do oleistej pozostałości dodano octan etylu (3 x 20 ml) i NaHCO_3 (20 ml). Po odparowaniu warstwy organicznej otrzymany surowy produkt przeznaczono do reakcji trytylowania.

Metody (a) i (b) zostały analogicznie wykorzystane do usunięcia grup ochronnych związku **84**. Podobnie jak w przypadku związku **83** otrzymany surowy produkt przeznaczono do reakcji trytylowania.

5.6. Synteza poliaminowej pochodnej α -hydroksy- γ -butyrolaktonu

***N*-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-2,4-dihydroksybutyroamid (76)**

Do α -hydroksy- γ -laktonu (430 μl , 4,16 mmola) dodano roztwór sperminy (2,9 g, 14,5 mmoli, 5 ekw.) w bezwodnym THF (6 ml). Kolbę z mieszaniną reakcyjną ogrzewano w suszarce w temp. 65 °C. Po 2-3 dniach mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałą surową mieszaninę przeznaczono do dalszych reakcji.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,2 (m, 1H, NHCO), 4,2-4,23 (m, 1H, OCHCO), 3,7-3,82 (m, 2H, CH_2OH), 3,32-3,39 (m, 2H, 2- reszty sperminy), 2,54-2,75 (m, 10H, 4, 6, 9, 11, 12 – reszty sperminy), 2,03-2,08 (m, 2H, OCH CH_2), 1,46-1,66 (m, 8H, 3, 7, 8, 13 – reszty sperminy) 0,9 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0,16 (s, 3H, CH_3C), 0,14 (s, 3H, CH_3C).

3-(*tert*-Butylodimetylosililo)-dihydrofuran-2-on (77)

Imidazol (470 mg, 3,21 mmola, 1 ekw.), DMAP (392 mg, 3,21 mmola, 1 ekw.) i TBDMSCI (1,5 g, 9,63 mmola, 3 ekw.) zostały dodane do roztworu laktonu (250 μ l, 3,21 mmola,) w bezwodnym MeCN (16 ml). Reakcję pozostawiono na 16 godz. w temp. pokojowej mieszając na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano. Do pozostałego oleju dodano nasyconego NaHCO₃ (30 ml). Warstwę wodną ekstrahowano porcjami Et₂O (2 x 30 ml). Połączone ekstrakty organiczne osuszono nad bezwodnym MgSO₄, odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem a uzyskany surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej. Produkt **97** eluowałam mieszaniną heksan/Et₂O (4:1 do 2:1) otrzymując 485 mg związku **97** w postaci oleju; wyd. 70%;

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 4,35-4,4 (m, 2H, CH₂O), 4,15-4,2 (dt, 1H, OCH), 2,16-2,5 (2 x m, 2 x 1H, OCHCH₂), 0,9 (s, 9H, 3 x CH₃ z t-Bu), 0,16 (s, 3H, CH₃CSi), 0,14 (s, 3H, CH₃CSi);

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 175,86 (C=O), 68,19 (OCH), 64,72 (CH₂OCO), 33,3 (CH₂), 25,61 (C, 3 x Me), 18,19 (SiC(Me)₃), -5,5 (C, 2 x Me);

ESI MS: [M-H]⁻ 215,02 obliczone dla C₁₀H₂₀O₃Si 216,35.

N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-2-(*tert*-butylodimetylosililo)-4-hidroksybutyroamid (78)**Metoda (a)**

3-(*tert*-Butylodimetylosililo)-dihydrofuran-2-on (300 mg, 1,5 mmola) suszono na linii próżniowej i rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (15 ml). Następnie dodano sperminę (1,5 g, 7,5 mmola, 5 ekw.). Reakcję prowadzono przez 48 godzin w temp. 70 °C. Mieszaninę reakcyjną podzielono między nasycony roztwór NaHCO₃ (20 ml) i CH₂Cl₂ (3 x 20 ml). Organiczne ekstrakty odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Produkt **78** eluowano mieszaniną MeOH / MeNH₂ / H₂O uzyskując w postaci oleju 253 mg związku **78**; wyd. 70%;

Metoda (b)

Związek **77** (216 mg, 1mmol) i sperminę (202,3 mg, 1 ekw.) umieszczono w kolbie stożkowej na 10 ml. Kolbę z mieszaniną reakcyjną wstawiono do kuchenki mikrofalowej ustawiając 50% mocy. Reakcję prowadzono przez 45 minut. Następnie kolbę ochłodzono dodano NaHCO₃ i ekstrahowano CH₂Cl₂. Po osuszeniu i odparowaniu warstwy organicznej, otrzymany surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej Produkt **78** eluowano mieszaniną MeOH/MeNH₂/H₂O uzyskując w postaci oleju 266 mg związku **78**; wyd. 64%;

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,02 (t, 1 H, NHCO) 4,25 (t, 1H, *J* 6,01 Hz, COCHOSi), 3,68-3,72 (t, 2H, *J* 5,89 CH₂OH), 3,29-3,41 (m, 2H, 2-reszty sperminy), 2,58-2,67 (m, 10H, 4, 6, 9, 11, 13 – reszty sperminy), 1,89-1,99 (m, 2H, OCHCH₂), 1,62-1,71 (m, 4H, 3,12-reszty sperminy), 1,49-1,52 (m, 4H, 7, 8-reszty sperminy) 0,9 (s, 9H, 3xCH₃ z t-Bu), 0,11 (s, 3H, CH₃CSi), 0,08 (s, 3H, CH₃CSi).

***N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-2-(*tert*-butylodimetylosililo)-4-hydroksybutyroamid (84)**

Substrat **78** (266 mg, 0,64 mmola) odparowano z bezwodną pirydyną (3x 5 ml) i ponownie rozpuszczono w 6,4 ml pirydyny, Roztwór oziębiono i dodano bezwodnik trifluorooctowy (517 μ l, 3,83 mmola, 6 ekw.). Po wyjęciu kolby z łaźni reakcję prowadzono przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie reakcję zakończono a roztwór podzielono między NaHCO₃ (30 ml) i CH₂Cl₂ (30 ml). Warstwę wodną ekstrahowano porcjami chlorku metylenu (2x 30 ml), które odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskany olej naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Czysty produkt wyeluuowano chlorkiem metylenu z 2-3% MeOH otrzymując 297 mg oleju **84**; wyd. 66%; R_f(C) = 0,8.

¹⁹F NMR 6,98-7,22 (m, 9H, 3xCF₃).

ESI MS: [M-H]⁻ 705,28 obliczone dla C₂₆H₄₃F₉N₄O₆Si 706,28.

Usunięcie grupy *tert*-butylodimetylosililowej

Do związku **84** (254 mg, 0,36 mmola) rozpuszczonego w THF (1 ml) dodano roztwór TEAF (1M w THF/dioksan, 3 ekw., 1,08 mmola, 1ml). Mieszaninę reakcyjną trzymano przez 24 h w temp. pokojowej. Reakcję zakończono przez dodanie nasyconego roztworu NH₄Cl a następnie ekstrahowano warstwę wodną octanem etylu (3 x 5 ml). Po odparowaniu warstwy organicznej otrzymany surowy produkt przeznaczono do reakcji trytylowania.

5.7. Trytylowanie pochodnych sperminy***N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2-hydroksymetylo-2-metylo-propanoamid (86)**

Nie oczyszczony z wolnymi grupami hydroksylowymi związek otrzymany po etapie usuwania grup ochronnych związku 80 odparowano czterokrotnie z suchą pirydyną (4x5 ml) i ponownie rozpuszczono w pirydynie (2,3 ml). Następnie porcjami dodano DMTCl (250 mg, 0,74 mmola, 1,3 ekw.). Po 3 godz. reakcję zakończono rozcieńczając mieszaninę reakcyjną roztworem NaHCO₃ (20 ml). Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x20 ml). Zebrane frakcje organiczne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały olej naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Jako eluent wykorzystano mieszaninę CH₂Cl₂ i metanolu z dodatkiem 0,2% pirydyny. Produkt wypłynął przy 2-3% metanolu. Uzyskano 150 mg **86** w postaci liofilizatu; wyd. 40%;

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 6,74-7,3 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 3,77 (s, 6H, 2 x OCH₃), 3,25-3,38 (m, 4H, 2 x CH₂O), 2,99-3,2(m, 10H, reszty sperminy), 2,48-2,5 i 1,37-1,74 (m, 10H, reszty sperminy), 1,28 (s, 3H, CH₃);

ESI MS: [M+Na]⁺ 934,38 obliczone dla C₄₂H₄₉F₉N₄O₆ 908,85.

(S)-N-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3-hydroksypropanoamid (87)

Reakcje prowadzono analogicznie do otrzymywania trytylowanej pochodnej kwasu hydroksypropanowego **86**. Wyd. 69,5 %

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 6,8-7,39 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 4,44-4,49 i 4,05-4,1 (2x m, 2x 1H, 2xCOCH) 4,25-4,28 (m, 1H, J 7,64 Hz, OCHCO), 3,75 (s, 1H, 2x OCH₃), 3,25-3,48 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 – reszty sperminy), 1,55-1,83 (m, 8H, 3, 7, 8, 12 – reszty sperminy), 1,39 (s, 3H, CH₃).

ESI MS: [M+Na]⁺ 903,29 ; [M+K]⁺ 919,26 obliczone dla C₄₀H₄₅F₉N₄O₈ 880,79.

(R)-N-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3-hydroksypropanoamid (88)

Reakcje prowadzono analogicznie do otrzymywania trytylowanej pochodnej kwasu hydroksypropanowego **86**. Wyd. 60 %.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,10-7,38 (m, 9H, aromatyczne od DMT), 6,76 (d, 4H, J 8,6 Hz, aromatyczne od DMT), 4,41-4,45 i 4,02-4,06 (2x m, 2x 1H, 2x COCH) 4,19-4,27 (m, 1H, OCHCO), 3,73 (s, 1H, 2x OCH₃), 3,15-3,44 (m, 12H, 2, 4, 6, 9, 11, 13 – reszty sperminy), 1,51-1,81 (m, 8H, 3, 7, 8, 12 – reszty sperminy).

ESI MS: [M-H]⁻ 879,30 obliczone dla C₄₀H₄₅F₉N₄O₈ 880,79.

N-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-4-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2-hydroksybutyroamid (89)

Reakcje prowadzono analogicznie do otrzymywania trytylowanej pochodnej kwasu hydroksypropanowego **86**; wyd. 72 %.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,19-7,36 (m, 9H, aromatyczne od DMT), 6,78 (d, 4H, J 8,6 Hz, aromatyczne od DMT), 4,21 (dt, 1H, COCHOH), 3,74 (s, 6H, 2 x OCH₃), 3,0-3,44 (m, 14H, CH₂OH, 2, 4, 6, 9, 11, 13 – reszty sperminy), 2,18-2,19 (m, 2H, OCHCH₂), 1,56-1,88 (m, 8H, 3, 7, 8, 12-reszty sperminy);

ESI MS: [M+Na]⁺ 933,27 obliczone dla C₄₀H₄₆F₉N₄O₈ 908,85.

5.8. Synteza amidofosforyn analogów poliaminonukleozydów**3-Amidofosforyn N-(4-(N-trifluoroacetamido)butylo)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2-metylopropanoamidu (90)**

Związek **85** (143 mg, 0,234 mmola) oraz etylotiotetrazol (27,3 mg, 0,21 mmola, 0,9 ekw.) suszono w eksykatorze na linii próżniowej przez co najmniej 24 h. Bis(*N,N*-diizopropylamino) (2-cyanoetoksy)fosfinę (90 μl, 0,3 mmola, 1,3 ekw.) wstrzyknięto do roztworu **85** i etylotiotetrazolu w bezwodnym chlorku metylenu (1,17 ml). Reakcja zaszła po 2 godziny. Całość odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie dodano NaHCO₃ (10 ml) i ekstrahowano

porcjami chlorku metylenu (3 x 10 ml). Surowy związek oczyszczono chromatograficznie na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym, stosując jako eluent 10% roztwór trójetyloaminy w benzenie. Odpowiednie frakcje odparowano i **89** zliofilizowano z benzenu otrzymując 133,5 mg białego osadu; wyd. 70%. $R_f(G) = 0,36$;

$^{31}\text{P NMR}$ (C_6H_6): δ (ppm) 148,30; 148,54.

3-Amidofosforyn *N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2-metylo-propanoamidu (91)

Reakcję związku **86** (150 mg, 0,25 mmola) przeprowadzono analogicznie do otrzymywania amidofosforynu **90**. Otrzymano 130 mg produktu **90**; wyd. 50%. $R_f(H) = 0,38$.

$^{31}\text{P NMR}$ (C_6H_6): δ (ppm) 148,6; 148,5; 148,45; 148,3.

2-Amidofosforyn (*S*)-*N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-propanoamidu (92)

Związek **87** (300 mg, 0,34 mmola) oraz etylotiotetrazol (0,3 mmola, 39,8 mg, 0,9 ekw.) suszono w eksykatorze próżniowym przez co najmniej 24h. Bis(*N,N*-diizopropylamino) (2-cyanoetoksy)fosfinę (0,442 mmola, 133 μl , 1,3 ekw.) wstrzyknięto do roztworu **87** i etylotiotetrazolu w bezwodnym chlorku metylenu (1,17 ml). Reakcja zaszła po 2 godz. Całość odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy związek precypitowano trzykrotnie z heksanu. Zliofilizowano z benzenu otrzymując 210 mg białego ciała stałego **92**; wyd. 52%; $R_f(H) = 0,36$.

$^{31}\text{P NMR}$ (C_6H_6): δ (ppm) 151,90; 151,70; 149,07; 149,87; 148,7; 147,65.

2-Amidofosforyn (*R*)-*N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-3-(4,4'-dimetoksytrytylo)-propanoamidu (93)

Reakcję związku **88** (200 mg, 0,226 mmola) przeprowadzono analogicznie do otrzymywania amidofosforynu **92**. wyd. 52%; $R_f(H) = 0,36$

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,14-7,38 (m, 9H, aromatyczne od DMT), 6,78 (m, 4H, aromatyczne od DMT), 4,8 (m, 1H, COCH) 4,65 (m, 1H, OCHCO), 3,73 (s, 1H, 2x OCH₃), 3,12-3,55 (m, 16H, CH₂OH, 2, 4, 6, 9, 11, 13 – reszty sperminy, CH₂-OP) 2,4-2,78 (m, 2H, 2x CH od grupy i-Pr, CH₂CN, 1,41-1,92 (m, 8H, 3, 7, 8, 12 – reszty sperminy) 1,17-1,23 (m, 12H, 4x CH₃ grupa i-Pr).

$^{31}\text{P NMR}$ (C_6H_6): δ (ppm) 151,77; 151,44; 149,25; 149,07; 148,97; 148,85.

ESI MS: $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1079,63 obliczone dla $\text{C}_{49}\text{H}_{62}\text{F}_9\text{N}_6\text{O}_9\text{P}$ 1080,43.

2-Amidofosforyn *N*-(Tris(2,2,2-trifluoroacetylo-1-ylo)-4,9,13-triazatridekano)-4-(4,4'-dimetoksytrytylo)-butyroamidu (94)

Reakcję związku **89** (270 mg, 0,3 mmola) przeprowadzono analogicznie do otrzymywania amidofosforynu **90**. wyd. 55%; $R_f(H) = 0,35$

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 6,76-7,4 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 4,22 (dt, 1H, COCHOH), 3,74 (s, 6H, 2x OCH_3), 3,12-3,55 (m, 16H, CH_2OH , 2, 4, 6, 9, 11, 13 – reszty sperminy, $\text{CH}_2\text{-OP}$), 2,56-2,62 (m, 2H, 2x CH od grupy i-Pr), 2,24-2,42 (m, 4H, OCHCH_2 , CH_2CN), 1,57-1,84 (m, 8H, 3, 7, 8, 12-reszty sperminy) 1,1-1,2 (m, 12H, 4x CH_3 grupa i-Pr).

$^{31}\text{P NMR}$ (C_6H_6): δ (ppm) 151,73; 151,59; 148,25; 147,83.

ESI MS: $[\text{M}+\text{K}]^+$ 1133,1 obliczone dla $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{F}_9\text{N}_6\text{O}_9\text{P}$ 1094,43.

5.9. Synteza i oczyszczanie poliamooligonukleotydów i analogów poliaminooligonukleotydów

Synteza

Liofilizat 3'-amidofosforynu poliaminonukleozydu (dCSp) i standardowe 3'-amidofosforyny rozpuszczono w acetonitrylu i zasypano sitami 3 Å na dzień przed wykonaniem syntez poliaminooligonukleotydów. Syntezy prowadzono w skali 0,2 μmola . W przypadku każdej kondensacji podawano taką samą ilość amidofosforynu i nie przedłużano czasu kondensacji na etapie przyłączania modyfikowanej jednostki. Syntezę prowadzono według standardowego programu zamieszczonego w tabeli 18.

Tabela 18. Schemat cyklu syntetycznego stosowanego do otrzymywania łańcucha oligomeru.

Krok cyklu	Nazwa procesu	Odczynnik	Czas
1.	Detrylacja	3% TCA w CH_2Cl_2	35"
2.	Kondensacja	FAdC/FAdT/FAdG/FAdA w CH_3CN	3'50"
3.	Acetylacja	Ac_2O , lutydyna, NMI w CH_3CN	30"
4.	Utlenienie	3% I_2 , 10% H_2O w Py	5' 30"

FAdC, FAdT, FAdG, FAdA - Glen Research
TCA, Ac_2O , I_2 – Roth

Liofilizaty amidofosforynów analogów poliaminonukleozydów suszono na linii próżniowej 24-48 godzin przed rozpoczęciem syntezy. Podczas wprowadzania modyfikacji wykorzystano dwukrotny nadmiar odpowiednich amidofosforynów oraz zwiększono czas kondensacji do 10 minut. Otrzymane poliaminooligonukleotydy i analogi poliaminooligonukleotydów poddano typowej procedurze odblokowania, czyli działaniu 32% wodnego roztworu NH_3 w 55°C przez noc.

Oczyszczenie oligomerów

Próbki rozpuszczono w 150 μl wody i nałożono na płytki silikażelowe (20 x 20 cm) w celu oczyszczenia oligomerów (układ E lub F). Po zakończeniu rozdziału prążki oligodeoksynukleotydów usunięto razem z silikażelem z płytek i eluowano 3-krotnie 2 ml wody. Połączone frakcje odparowano do sucha. Próbki rozpuszczono w 400 μl wody, następnie

przeniesiono do nowych probówek (Eppendorf). Poprzednie probówki przepłukano 2-krotnie 100 µl wody i po zwirowaniu połączono wszystkie roztwory.

Otrzymane oligonukleotydy oczyszczano również wykorzystując aparat HPLC z kolumną wypełnioną C-18. Czyste oligonukleotydy eluowano buforem (40% CH₃CN : 60% 0,01 M octan trójetyloamoniowy). Po odparowaniu zebranych frakcji oligomery odsalano na kolumnkach Sephadex-G25.

Czystość otrzymanych oligonukleotydów potwierdzono za pomocą MALDI-TOF. W tabeli 19 zamieszczono wartości mas dla otrzymanych oligonukleotydów.

Tabela 19. Wartości mas oligomerów [kDa].

Nazwa	Sekwencja 5'→3'	Masa obliczona	Masa [M-H] ⁻ MALDI-TOF
JB1	CTC AAG CAA GCT	3675,44	3674,87
JB2	AGC TTG CTT GAG	3613,42	3611,50
DOD1	CTC ACA TGC GCG	3605,39	3605,54
DOD2	CGC GCA TGT GAG	3685,44	3686,25
DOD1-10	XTC ACA TGC GXG	3977,39	3976,84
DOD1-9	XTC ACA TGX GCG	3977,39	3978,06
DOD3-9	CTX ACA TGX GCG	3977,39	3977,08
DOD5-9	CTC AXA TGX GCG	3977,39	3977,14
DOD1-1	XTC ACA TGC GCG	3789,50	3791,10
DOD1-3	CTX ACA TGC GCG	3789,50	3789,40
DOD1-5	CTC AXA TGC GCG	3789,50	3789,14
DOD2-1	XGC GCA TGT GAG	3869,2	3871,16
DOD2-3	CGX GCA TGT GAG	3869,2	3870,95
DOD2-5	CGC GXA TGT GAG	3869,2	3869,41
8G1	GTCGGCTG	2440,63	2438,54
8C9	CAGCCGAC	2378,60	2376,61
8C9Sp	CAGXCGAC	2563,7	2562,73
JB8	X ₀ CTC AAG CAA GCT	3911,42	3910,87
5'-Lak	X ₁ CTC ACA TGC GCG	3973,12	3970,65
5'-Dg	X ₂ CTC ACA TGC GCG	3959,12	3959,57
5'-Lg	X ₃ CTC ACA TGC GCG	3959,54	3959,24
JB3	CTC AAG X ₀ CAA GCT	3911,42	3911,45
Lak-B	CTC ACA X ₁ TGC GCG	3973,12	3973,12
Dg-B	CTC ACA X ₂ TGC GCG	3959,54	3959,75

Dodatkowe oczyszczenie oligomerów do badań NMR

Oligonukleotydy poddawane były dodatkowemu oczyszczeniu na kolumnach. W celu odsolenia próbek użyto kolumny zawierające silanizowane podłoże C18. Kolumny przemyto acetonitrylem (10 ml), a następnie 10 mM roztworem octanu amonu (10 ml). Na tak przygotowane kolumny nakładano próbki rozpuszczone w 10 mM roztworu octanu amonu (10 ml). Zbierano trzy frakcje oznaczone odpowiednio: L – przesącz uzyskany po nałożeniu próbki, W – przemycie próbki 10 mM roztworem octanu amonu (10 ml) oraz C – frakcja właściwa zawierająca oligonukleotyd po przemyciu kolumny 30% roztworem acetonitrylu w wodzie (5 ml). Na płytce TLC (układ E) wykonano próbę na obecność oligonukleotydu w trzech zebranych frakcjach, a frakcję C zawierającą produkt odparowano do sucha.

5.10. Przygotowanie próbek oktameru referencyjnego (5'-CAGCCGAC-3', 5'-GTCGGCTG-3') oraz oktameru modyfikowanego resztą dC^{Sp} (badania NMR)

Oligonukleotydy: 5'-GTCGGCTG-3' i komplementarny 5'-CAGCCGAC-3' oraz modyfikowany resztą dC^{Sp} (5'-CAGdC^{Sp}CGAC-3') zostały zmieszane w stosunku molowym 1:1. Po odparowaniu rozpuszczono je w buforze o składzie: 50 mM NaCl, 10 mM fosforan sodu oraz 0,1 mM EDTA, pH 7,0. Próbki trzykrotnie odparowano z D₂O a następnie rozpuszczono w 300 µl D₂O, (99,99%) i przeniesiono do mikropróbki NMR (Shigemi). Tak przygotowane próbki posłużyły do przeprowadzenia eksperymentów NMR. W celu analizy sygnałów pochodzących od protonów wymienialnych (iminowych i aminowych) próbki były ponownie odparowane i rozpuszczone w mieszaninie H₂O/D₂O 9:1 v/v, przy zachowaniu składu buforu. Przed każdą serią pomiarów umieszczano próbkę w łaźni o temperaturze 80 °C, a następnie chłodzono w celu poprawnego uformowania dupleksu.

Techniki NMR wykorzystane do otrzymania widm dupleksów DNA

Widma NMR dupleksów DNA wykonane zostały na spektrometrze Bruker Avance 600 w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza. Dodatkowo były wykonane widma na spektrometrze Bruker Avance II 400 w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN. Otrzymane dane eksperymentalne przetwarzano za pomocą programu Topspin 2.0 (Bruker), a następnie analizowano w programie Felix 2002 (*Accelrys*).

Jednowymiarowe widma ¹H NMR (600 MHz, D₂O) wykonane zostały w temperaturach 25 i 30°C. Jednowymiarowe różnicowe widma ¹H NMR NOE (600 MHz, 90% H₂O/10% D₂O) zostały zarejestrowane przy selektywnym naświetlaniu pojedynczą częstotliwością rezonansową w temperaturach 2 °C i 10 °C. Dwuwymiarowe, fazoczułe widma NOESY (600 MHz, D₂O) wykonane były przy dwóch różnych czasach mieszania $\tau_m = 150$ i 400 ms. Aby ułatwić przypisanie sygnałów rezonansowych, oraz wyciągnięcie informacji strukturalnych, pomiary efektu NOE zostały przeprowadzone w różnych temperaturach: 20, 25 i 30 °C. Wykonane zostały

także eksperymenty 2D NOESY w D₂O przy częstotliwości 400 MHz. Widma zarejestrowane zostały z czasem mieszania 150 i 400 ms w temperaturze 25 °C. Dwuwymiarowe, fazoczułe widma NOESY (600 MHz, 90% H₂O/10% D₂O) wykonane zostały w temperaturze 10 °C z czasem mieszania $\tau_m = 150$ ms. W celu wygaszenia silnego sygnału wody, podczas eksperymentu stosowano sekwencję (3-9-19) gradientowych impulsów w metodzie WATERGATE. W przypadku dwuwymiarowych, fazoczułych widm TOCSY (600 MHz, D₂O) okres mieszania, podczas którego zastosowano sekwencję impulsów MLEV-17, trwał 60 ms. Dwuwymiarowe eksperymenty korelacyjne ¹H-¹³C HSQC (D₂O) przeprowadzone zostały na próbkach o naturalnej zawartości izotopu ¹³C w temperaturze 25 °C metodą odwrotnej detekcji. Dwuwymiarowe, fazoczułe widma korelacyjne ¹H-³¹P HSQC (D₂O) zostały wykonane na spektrometrze Bruker AVANCE 600 dla szerokości spektralnej 2.4 kHz w kierunku ³¹P oraz 1.5 kHz w kierunku ¹H.

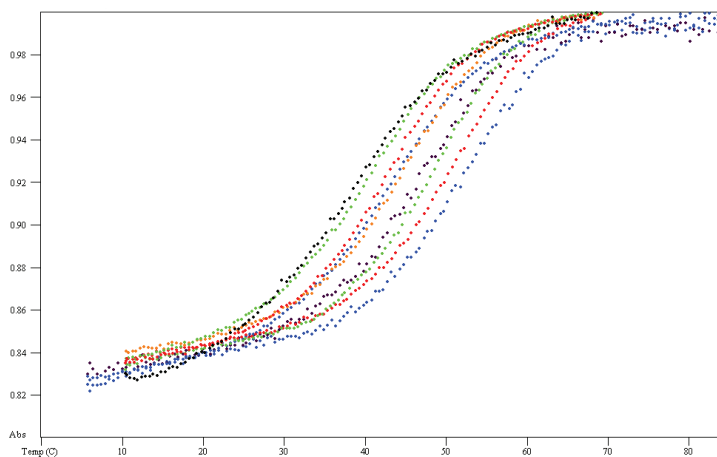
5.11. Pomiary termodynamiczne

Pomiary trwałości termodynamicznej dupleksów prowadzono na spektrofotometrze Beckman DU-640 z termoprogramatorem, wykorzystując metodę topnienia UV (ang. *UV melting*). Stężenia oligonukleotydów użytych do eksperymentów termodynamicznych obliczano na podstawie pomiarów absorbancji w temperaturze 80 °C oraz ich współczynników ekstynkcji. Pomiary trwałości termodynamicznej dupleksów prowadzono w świetle UV przy długości fali 260 nm i zakresie temperatur od 3 °C do 90 °C. Szybkość zmian temperatury wynosiła 1 °C/min, pomiar absorbancji następował co pół minuty. Przykładowe krzywe topnienia dla dziewięciu różnych stężeń dupleksu przedstawione są na rysunku 48. Dla dokładnego określenia parametrów termodynamicznych stosowano dziewięć stężeń każdego dupleksu w zakresie od 10⁻³ do 10⁻⁶ M. Dupleksy były rozpuszczone w buforze: 100 mM NaCl, 20 mM kakodylan sodu, 0,2 mM Na₂EDTA (pH 7) i umieszczone w trzech kuwetach kwarcowych o pojemności 30 μ l, 150 μ l oraz 300 μ l i drodze optycznej odpowiednio 0,1 cm, 0,5 cm i 1 cm. Przykładowy protokół rozcieńczeń dla dupleksu jest przedstawiony na rysunku 47.

	Sequence		Abs. (80C)	Volume (ml)	Dilution	# OD	Ext. Coeff	# Mol	Abs. (20°C)
			in water						n buffer
DOD2	CGCGCATGTGAG		0,816	1	30	24,5	107200	2,28E-07	
DOD1	CTCACATGCGCG		0,205	0,3	30	1,8	80800	2,28E-08	
	DOD2-DOD1			e260=	94000				
						DOD2	DOD1		
Conc. #	Conc. (M)	Path (cm)	Th. Abs	Volume (ul)	# Mol	Vol. Stock A (ul)	Vol. Stock B (ul)	Vol. Prevs. (ul)	Vol. Buffer (ul)
1	1,8E-04	0,100	1,70	30	5,426E-09	11,89	35,69	Dry Down	30
2	1,1E-04	0,100	1,03	30	3,275E-09			18,11	11,89
3	6,6E-05	0,100	0,62	30	1,977E-09			18,11	11,89
4	4,0E-05	0,500	1,87	150	5,969E-09	13,08	39,27	Dry Down	150
5	2,4E-05	0,500	1,13	150	3,604E-09			90,56	59,44
6	1,5E-05	0,500	0,68	150	2,176E-09			90,56	59,44
7	8,8E-06	1,000	0,82	300	2,627E-09	5,76	17,28	Dry Down	300
8	5,3E-06	1,000	0,50	300	1,586E-09			181,12	118,88
9	3,2E-06	1,000	0,30	300	9,574E-10			181,12	118,88

Rys. 47. Przykładowy protokół rozcieńczeń stosowany w eksperymentach topnienia UV

W celu otrzymania względnych wartości absorbancji na początku serii pomiarów stosowano kuwetę zawierającą jedynie bufor używany do badań termodynamicznych.



Rys. 48. Krzywe topnienia dla dziewięciu stężeń pojedynczego dupleksu

Otrzymane krzywe topnienia dupleksów analizowano za pomocą programu MeltWin 3.5.¹³² W wyniku obróbki danych uzyskano parametry termodynamiczne: entalpię (ΔH°), entropię (ΔS°) oraz energię swobodną (ΔG°) charakteryzujące badany dupleks (rysunek 49).

Full Analysis
Date: 7 Oct 2007 Comment: Imported From ASCII

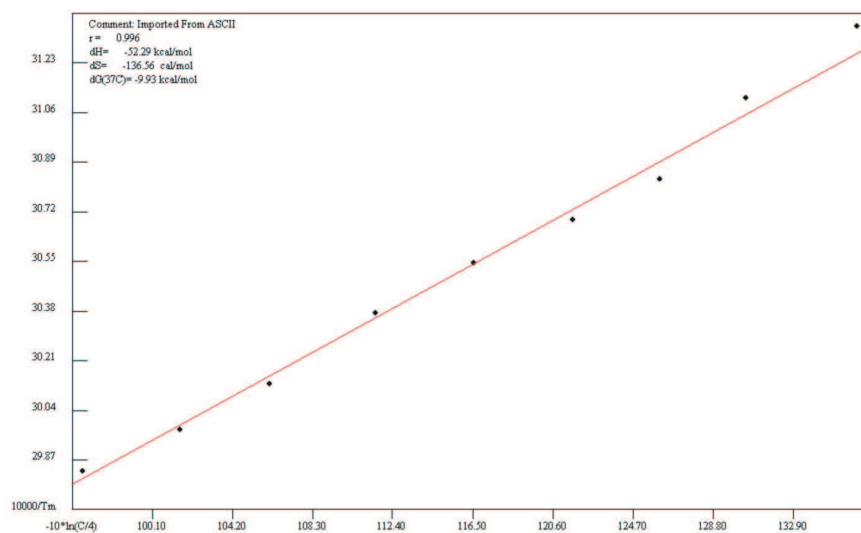
Melt Curve Results				
Concentration (M)	dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	T _m (°C)
2.561e-04	-62.86	-168.33	-10.65	62.07
1.556e-04	-55.34	-145.70	-10.15	60.48
9.866e-05	-39.62	-158.55	-10.44	58.74
5.716e-05	-60.11	-160.39	-10.36	56.10
3.464e-05	-56.34	-148.93	-10.15	54.25
2.089e-05	-54.70	-143.72	-10.13	52.67
1.339e-05	-56.42	-148.91	-10.24	51.21
8.616e-06	-52.66	-137.91	-9.89	48.29
4.874e-06	-47.31	-121.28	-9.70	45.78
Averages:	-56.15	-148.19	-10.19	54.40

Analysis of Melt Curve Fits/Errors			
dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	T _m (°C, 1.0e-4M)
-56.15 ± 4.554	-148.19 ± 13.781	-10.19 ± 0.285	58.6

Analysis of T _m Dependence/Errors			
dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	T _m (°C, 1.0e-4M)
-52.29 ± 1.727	-136.56 ± 5.276	-9.93 ± 0.093	58.6

Rys. 49. Zestawienie danych uzyskanych w programie MeltWin.¹³²

Parametry były obliczane na dwa różne sposoby: poprzez dopasowanie eksperymentalnych krzywych topnienia z krzywymi wyznaczonymi teoretycznie oraz z wykresu zależności odwrotności temperatury topnienia $1/T_m$ od logarytmu stężenia oligonukleotydu (rysunek 50). W przypadku różnicy w wartościach parametrów termodynamicznych mniejszej niż 15 % przyjmuje się że topnienie duplexu przebiega według modelu dwustanowego, natomiast przy większej różnicy, odpowiednio, według modelu jednostanowego.



Rys. 50. Wykres zależności odwrotności temperatury topnienia $1/T_m$ od logarytmu stężenia oligonukleotydu uzyskany z programu MeltWin.¹³²

6. LITERATURA

1. Tabor, C. W., Tabor H., *Polyamines. Ann Rev Biochem.* **1984**, *53*, 749-790.
2. Leeuwenhoek, A., *Philos Trans. R. Soc.*, London **1678**, *12*, 1040.
3. Gerner, E. W., Meyskens Jr, F. L., *Nature Rev. Can.*, **2004**, *4*, 781-792.
4. Cohen, S.S., *A Guide to the Polyamines*, **1998**, 185–230, Oxford University Press.
5. Gugliucci, A., *Clinica Chim. Acta*, **2004**, *344*, 23-35.
6. (a) Janne, J., Alhonen, L., Leinonen, P., *Ann. Med.*, **1991**, *23*, 241– 59; (b) Gugliucci, A., Menini, T., *Life Science*, **2003**, *72/23*, 2603–16.
7. D'agostino, L., di Pietro, M., di Luccia, A., *FEBS*, **2005**, *272*, 3777-3787.
8. Pegg, A. E., *Cancer Res.*, **1988**, *48*, 759–774.
9. (a) Hasan R., Alam M. K., Ali R., *FEBS Lett.*, **1995**, *368*, 27–30; (b) Basu, H. S., Schwietert, H. C. A., Feuerstein, B. G., Marton, L. J., *Biochem. J.* **1990**, *269*, 329-334.
10. Thomas T. J., Gunnia U. B., Thomas T., *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*: 6137–6141.
11. Matthews H. R., *Bioessays*, **1993**, *15*, 561–566.
12. Bryson K. and Greenall R. J. J., *Biomol. Struct. Dyn.*, **2000**, *18*, 393–412.
13. Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., Casero, R. A. Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, *95*, 11140–11145.
14. Cao, H., Schuster, G. B., *Bioconj. Chem.*, **2005**, *16*, 820-826.
15. Pingound, A., Urbanke, C., Alves, J., Ehbrecht, H. J., Zabeau, M., Gualerzi, C., *Biochemistry*, **1984**, *23*, 5697-5703.
16. Oana, H., Tsumoto, K., Yoshikawa, Y., Yoshikawa, K., *FEBS Lett.*, **2002**, *530*, 143-146.
17. Wilson, R. W., Bloomfield, V. A., *Biochemistry*, **1979**, *18*, 2192–2196.
18. Yoshikawa, K., Matsuzawa, Y., *Physica D.*, **1995**, *84*, 220–227.
19. Garner, M. M., Felsenfeld, G., *J. Mol. Biol.*, **1987**, *196*, 581.
20. Childs, C., Mehta, D. J., Gerner, E.W., *Cell. Mol. Life Sci.*, **2003**, *60*, 1394–1406.
21. D'Agostino, L., Di Luccia, A., *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4317–4325.
22. Tadolini, B., Cabrini, L., Varani, E., Sechi, A. M., Pasquali, P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, *122*, 550-555.
23. Morgan D.M., *Biochem. Soc. Trans.*, **1990**, *18*, 1080.
24. Russell, D. H.; Durie, B. G. M. *Prog Cancer Res Ther*, **1978**, *8*, 139–155.
25. Russell, D. H. , *Clin. Chem.*, **1975**, *23*, 22-27.
26. Catros-Quemener, V., Leray, G., Moulinoux, J.P., Havouis, R., de Certaines, J.D., Chapman, J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *346*, 30– 37.
27. Aikens, D., Bunce, S., Onasch, F., Parker, R., Hurwitz, C., Clemans, S., *Biophys. Chem.*, **1993**, *17*, 67-74.

28. Hedwig, G. R., Powell, H. K. J., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1973**, 793-797.
29. (a) Takeda, Y., Samejima, K., Nagano, K., Watanabe, M., Sugeta, H., Kyogoku, Y., *Eur. J. Biochem.*, **1983**, *130*, 383-389; (b) Łomozik, L., Gasowska, A., Bregier-Jarzębowska, R., Jastrzab, R., Krzyśko, G., *Na pograniczu chemii i biologii*, t. XII, 453-476.
30. Thomas, T. J.; Bloomfield, V. A., *Biopolymers*, **1985**, *24*, 725-729.
31. (a) Basu, H. S.; Schwietert, H. C. A.; Feuerstein, B. G. Marton, L. J., *Biochem. J.*, **1990**, *269*, 329-334; (b) Padmanabhan, S., Brushaber, V. M., Anderson, C. F., Record, M. T. Jr., *Biochemistry*, **1991**, *30*, 7550-7559.
32. (a) Andreasson, B., Nordenskiöld, L., Braunlin, W. H., *Biopolymers*, **1996**, *38*, 505-513; (b) Andreasson, B., Nordenskiöld, L., Schultz, J., *Biophys. J.*, **1996**, *70*, 2847-2856.
33. Medina, A. M., Uridales, J. L., Rodriguez-Caso, C., Ramirez, F.J., Sanchez-Jimenez, F., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **2003**, *38*, 23-59.
34. Bratek-Wiewiórska, M.D., Alejska, M., Figlerowicz, M., Barciszewski, J., Wiewiórowski, M., *Pure Appl. Chem.*, **1987**, *59*, 407-414.
35. Ganem, B., *Acc. Chem. Res.*, **1982**, *15*, 290-298.
36. Tabor, C. W., Tabor, H., *Ann. Rev. Biochem.*, **1976**, *45*, 285-306.
37. Childes, A. C., Mechta, J., Gerner, E. W., *CMLS*, **2003**, *60*, 1394-1406.
38. Yatin, M., *JCMB*, **2002**, *1*, 57-67.
39. Bibillo, A., Figlerowicz, M., Kierzek, R., *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 3931-3937.
40. (a) Markiewicz, W. T., Godzina, P., Markiewicz, M., Astriab, A., *Nucleosides & Nucleotides*, **1998**, *17(9&11)*, 1871-1880; (b) Markiewicz, W. T., Godzina, P., Markiewicz, M., *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, *18(6&7)*, 1449-1454; (c) Markiewicz, W. T., Astriab, A., Godzina, P., Markiewicz, M., *Il Farmaco*, **2000**, *55*, 174-177.
41. Praca doktorska dr Anny Orłowskiej.
42. (a) Prakash, T. P., Barawkar, D. A., Kumar, V., Ganesh, K. N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 1733-1738; (b) Thomas, R. M., Thomas, T., Wada, M., Sigal, L. H., Shirahata, A., Thomas, T. J., *Biochemistry*, **1999**, *38*, 13328-13337.
43. Matsuda, A., Ueno, Y., Takenaka, A., *Frontiers in Nucleoside and Nucleic Acids*, **2004**, 549-576.
44. Lin, K.Y., Matteucci, M.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 8531-8532; (b) Flanagan, W.M., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1999**, *96*, 3513-3518; (c) Maier, M.A., *Biochemistry*, **2002**, *41*, 1323-1327.
45. Sund, C., Puri, N., Chattopadhyaya, J., *Tetrah.*, **1996**, *52*, 12275-12290; (b) Sund, C., Puri, N., Chattopadhyaya, J., *Nucleos. & Nucleotid.*, **1997**, *16(5&6)*, 755-760.
46. Bonfils, E., Depierreux, C., Midoux, P., Thuong, N. T., Monsigny, M., Roche, A. C., *Nucleic Acid Res.*, **1992**, *20*, 4621-4629.
47. Moriguchi, T., Sekiguchi, H., Tachibana, M., Shinozuka, K., *Nucleos. & Nucleot. Nucleic Acid*, **2006**, *25*, 601-612.
48. Pallan, P. S., „Nucleobase-poliamine conjugates of oligonucleotides and PNA-DNA chimera: synthesis and biophysical studies”, **2001**, 52-70.
49. Haas, J., Engels, J. W., *Tetrah. Lett.*, **2007**, *21*, 488891-488894.
50. (a) Ueno, Y., Nagasawa, Y., Sugimoto, I., Kojima, N., Kanazaki, M., Shuto, S., Matsuda, A., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 1660-1667; (b) Ueno, Y., Karino, N., Matsuda, A., *Bioconjug. Chem.*, **2000**, *11*, 933-940; (c) Atsumi, N., Ueno, Y., Kanazaki, M., Shuto, S., Matsuda, A., *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 2933-2939.
51. Horn, T., Chaturvedi, S., Balasubramaniam, T. N., Letsinger, R. L., *Tetrah. Lett.*, **1996**, *37*, 743-746.
52. Michael, T., Martinand-Mari, C., Debart, F., Lebleu, B., Robbins, I., Vasseur, J.-J., *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 5282-5290.
53. Dagle, J. M., Weeks, D. L., *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 2143-2149.
54. Robles, J., Ibáñez, V., Grandas, A., Pedroso, E., *Tetrah. Lett.*, **1999**, *40*, 7131-7134.

55. Christensen, U. B., Pedersen, E. B., *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 4918-4925.
56. Filichev, V. V., Hilmy, K. M. H., Christensen, U. B., Pedersen, E. B., *Tetrah. Lett.*, **2004**, *45*, 4907-4910.
57. Wamberg, M. C., Hassan, A. A., Bond, A. D., Pedersen, E. B., *Tetrah.*, **2006**, *62*, 11187-11199.
58. Gianolio, D.A., Segismundo, M. J., McLaughlin L. W., *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 2128- 2134.
59. (a) Shi, Y., Kuzuya, A., Machida K., Komiyama M., *Tetrah. Lett.*, **2004**, *45*, 3703-3706; (b) Kuzuya, A., Machida K., Komiyama M., *Tetrah. Lett.*, **2002**, *43*, 8249-8252.
60. Kuzuya, A., Zhou, J.M., Komiyama, M., *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, **2004**, *1*, 125-131.
61. Asanuma, H., Liang, X., Komiyama, M., *Tetrah. Lett.*, **2000**, *41*, 1055-1058.
62. Liang, X., Asanuma, H., Komiyama, M., *Tetrah. Lett.*, **2001**, *42*, 6723-6725.
63. Guzaev, A., Salo, H., Azhayev, A., Lönnberg, H., *Bioconjug. Chem.*, **1996**, *7*, 240-248.
64. Langenegger, S. M., Häner, R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 5062-5065.
65. Balakin, K. V., Korshun, V. A., Mikhalev, I. I., Maleev, G. V., Malakhov, A. D., Prokhorenko I. A., Berlin, Yu. A., *Biosensor & Bioelectric*, **1998**, *13*, 771-778.
66. Dioubankova, N. N., Malakhov, A. D., Stetsenko, D. A., Korshun, V. A., Gait, M. J., *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 4607-4610.
67. Drew, H. R., Dickerson, R. E., *J. Mol. Biol.*, **1981**, *151*, 535-556.
68. Chiu, T. K., Kaczor-Grzeskowiak, M., Dickerson, R. E., *J. Mol. Biol.*, **1999**, *292*, 589-608.
69. Shui, X., McFail-Isom, L., Hu, G. G., Williams, L. D., *Biochemistry*, **1998**, *37*, 8341-8355.
70. Williams, L. D., Frederick, C. A., Ughetto, G., Rich, A., *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 5534-5541.
71. Tar, L. W., Secco, A. S., *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 2065-2073.
72. Xiao, L., Swank, R. A., Matthews, H. R., *Nucleic Acids Res.*, **1991**, *19*, 3701-3708.
73. Thomas, T. J., Gunnia, U. B., Thomas, T., *J. Biol. Chem.*, **1991**, 6137-7141.
74. Gessner, R. V., Frederick, C. A., Quigley, G. J., Rich, A., Wang, H.J., *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 7921-7935.
75. Ohishi, H., Nakanishi, I., Inubushi, K., van der Marel, G., van Boom, J. H., Rich, A., Wang, A. H. J., Hakoshima, T., Tomita, K., *FEBS Lett.*, **1996**, *391*, 153-156.
76. Ohishi, H., Suzuki, K., Ohtsuchi, M., Hakoshima, T., Rich, A., *FEBS Lett.*, **2002**, *523*, 9-34.
77. Bancroft, D., Williams, L.D., Rich, A., Egli, M., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 1073-1086.
78. Ban, C., Ramakrishnan, B., Sundaralingam, M., *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 5466-5476.
79. Wemmer, D. E., Srivenugopol, K. S., Reid, B. R., Morris, D. R., *J. Mol. Biol.*, **1985**, *185*, 457-459.
80. Banville, D. L., Feuerstein, B. G., Shafer, R. H., *J. Mol. Biol.*, **1991**, *219*, 585-590.
81. Van Dam, L., Nordenskiöld, L., *Biopolymers*, **1999**, *49*, 41-53.
82. Keniry, M. A., *FEBS Lett.*, **2003**, *542*, 153-158.
83. Liquori, A. M., Constantino, L., Crescenzi, V., Elia, V., Giglio, E., Puliti, R., de Santis Savino, M., Vitaliano, V., *J. Mol. Biol.*, **1967**, *24*, 113-122.
84. Suwalsky, M., Traub, W., Shmueli, Y., *J. Mol. Biol.*, **1969**, *42*, 363-373.
85. Zakrzewska, K., Pullman, B., *Biopolymers*, **1986**, *25*, 375-392.
86. (a) Feuerstein, B. G., Pattabiraman, N., Marton, L. J., *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 6883-6892; (b) Feuerstein, B. G., Pattabiraman, N., Marton, L. J., *Nucleic Acids Res*, **1990**, *18*, 1271-1282.
87. (a) Yuki, M., Grukhin, V., Lee C.-S., Haworth, I. S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1996**, *325*, 39-46; (b) Haworth, I. S., Rodger, A., Richards, W. G., *Proc. R. Soc. London B*, **1991**, *244*, 107-116.
88. Korolev, N., Lyubartsev, A. P., Laaksonen, A., Nordenskiöld, L., *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 5971-5981.

89. Korolev, N., Lyubartsev, A. P., Laaksonen, A., Nordenskiöld, L., *Biophys. J.*, **2002**, *82*, 2860–2875.
90. Zon, S. J. G., Sundaralingam, M., *Biochemistry*, **1989**, *28*, 2360-2364.
91. Ruiz-Chica, J., Medina, M. A., Sánchez-Jiménez, F., Ramírez, F. J., *Biophys. J.*, **2001**, *80*, 443-454.
92. Ruiz-Chica, J., Medina, M.A., Sánchez-Jiménez, F., Ramírez, F.J., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, *285*, 437-446.
93. Ruiz-Chica, J., Medina, M.A., Sánchez-Jiménez, F., Ramírez, F.J., *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *16*, 11–21.
94. Deng, H., Bloomfield, A. V., Benevides, J. M., Thomas Jr, G. J., *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 3379-3385.
95. Ouameur, A. A., Tajmir-Riahi, H.-A., *Jour. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, *40*, 42041–42054.
96. (a) Ito, T., Ueno, Y., Komatsu, Y., Matsuda, A., *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 2514 – 2523; (b) Juan, E. C. M., Kondo, J., Kurihara, T., Ito, T., Ueno, Y., Matsuda, A., Takenaka, A., *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 1969 - 1977.
97. Li, Z., Huang, L., Dande, P., Gold, B., Stone, M. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 8553-8560.
98. (a) Moulaei, T., Maehigashi, T., Lountos G. T., Komeda, S., Watkins, D., Stone, M. P., Marky, L. A., Li, J., Gold, B., Williams, L. D., *Biochemistry* **2005**, *44*, 7458-7468; (b) Shikiya, R., Li, J., Gold, B., Marky, L. A., *Biochemistry*, **2005**, *44*, 12582-12588.
99. Hou, M.-H., Lin S.-B., Yuann, J.-M. P., Lin, W.-C., Wang, A. H.-J., Kan L.-S., *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, 5121-5128.
100. Godzina, P., Praca doktorska: Chemiczna synteza poliaminooligonukleotydów, **1999**.
101. Letsinger, R. L., Singman, C. N., Hstand, G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 4470-4471.
102. (a) Watanabe, S., Kusama-Eguchi, k., Kobayashi, H., Igarashi, K., *J. Biol. Chrm.*, **1991**, *266*, 20803-20809; (b) Wang, J.-Y., *Amino Acids*, **2007**, *33*, 241-252.
103. (a) Wijmenga, S. S., *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **1998**, *32*, 287-387; (b) Chary, K. V. R., *NMR in Biological System*, Springer Velaq, 2008. (c) Croasmum, W. R., Carlson, R. M. K., *Two-Demensional NMR Spectroscopy*, sec. edytion, VCH. (d) Neidle, S., *Nucleic Acid Structure*, Oxford, **1999**, 39-74.
104. Schwieters, C.D., Kuszewski, J.J. and Clore, G.M. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2006**, *48*, 47-62.
105. Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. and Karplus, M. *Journal of Computational Chemistry*, **1983**, *4*, 187-217
106. Miertus, S., Scrocco, E., Tomasi, J., *Chem. Phys.*, **1981**, *55*, 117-129.
107. Kuszewski, J.J., Schwieters, C.D. and Clore, G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 3903-3918.
108. Lavery, R., Sklenar, H., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1988**, *5*, 63-91.
109. Merle, Y., Bonneil, E., Merle, L., Sági, J., Szemző, A., *Int. J. biol. Macrom.*, **1995**, *17*, 239-246.
110. Metz, W. A., Jones, W. D., Ciske, F. L., Peet, N. P., *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, *8*, 2399-2403.
111. (a) Ihre, H., Hult, A., Söderlind, E., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6388-6395. (b) H. Ihre, L Padilla De Jesus, O., J Fréchet, J. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5908-5917; (c) Detterbeck, R., Hesse, M., *Tetrah.* **2002**, *58*, 6887–6893; (d) Trollsås, M., Atthoff, B., Claesson, H., Hedrick, J. L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1998**, *37*, 3132.
112. Annaby, U., Malmberg, M., Pettersson, B., Rehnberg, N., *Tetrah. Lett.*, **1998**, *39*, 3217-3220.
113. McMurry, J., *Chemia Organiczna t.1*, Wydawnictwo Naukowe PWN, **2000**, 106-146.
114. (a) Parkkari, T., Savinainen, J. R., Rauhala, A. L., Tolonen, T. L., Nevalainen, T., Laitinen, J. T., Gynthera, J., Järvinen, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 3231–3234; (b) Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I., Mechoulam, R., *PNAS*, **2001**, *98*, 3662–3665; (c) Amicor, R., Callahan, C., Mattson, F. H., *Jour. Lipid Res.*, **1967**, *8*, 63-65.

115. (a) Fukuzawa, S., Tsuchimoto, T., Hiyama, T., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 151-156; (b) Gustafsson, T., Schou, M., Almqvist F., Kihlberg, J., *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8694-8701; (c) Aguilera, B., Romero-Ramírez, L., Abad-Rodríguez, J., Corrales, G., Nieto-Sampedro, M., Fernández-Mayoralas, A., *Med. Chem.* **1998**, *41*, 4599-4606.
116. Rao, V. S., Perlin, A., *Carboh. Res.*, **1980**, *83*, 175-177.
117. Bieg, T., Szeja, W., *Carboh. Res.*, **1985**, *140*, C7-C8.
118. (a) Pourjavadi, A., Fatemeh Mirjalili, B., *J. Chem. Research (S)*, **1999**, 562-563; (b) Jin, T.-S., Ma, Y.-R., Li, T.-S., Wang, J.-X., *J. Chem. Research (S)*, **1999**, 268-269; (c) Cun-de, W., Xin-Zhong, S., Ren-Jian, X., *Synth. Commun.*, **1997**, *27*, 2517-2520; (d) Ricardo, A.W., Filho, N., Srivastava, R. M., *Molecules*, **2006**, *11*, 318-324; (e) Perreux, L., Loupy, A., Volatron, F., *Tetrah.*, **2002**, *58*, 2155-2162.
119. Jaroszewska-Mannaj, J., Wydział Chemii UW, Wykład: „Mikrofale w syntezie chemicznej”.
120. (a) Kaminski, Z. J., *Synthesis*, **1987**, *10*, 917-20; (b) Kamiński, Z. J., Kolesińska, B., Kamińska, J. E., Góra, J., *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 6276-6281; (c) Kaminski, Z. J., Kolesinska B., Marcinkowska, M., *Synth. Commun.*, **2004**, *34*, 3349-3358.
121. Kunishima, M., Kawachi, C., Morita, J., Terao, K., Iwasaki, F., Tani, S., *Tetrah.*, **1999**, *55*, 13159-13170.
122. Christian, A., Montalbetti, G. N., Falque, V., *Tetrah.* **2005**, *61*, 10827-10852.
123. Froehler, B. C., Matteucci, M. D., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 469-472.
124. Cieślak, J., Szymczak, M., Wenska, M., Stawiński, J., Kraszewski, A., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, 3227-3331.
125. Andukar, S. V., Stables, J. P., Kohn, H., *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 2381-2389.
126. Pattenden, G., Gonzalez, A. M., Little, P. B., *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 4173-4208.
127. Huang, G., Hollingsworth, R. I., *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 1355-1360.
128. (a) Vogel, K. W., Stark, L. M., Mishra, P. K., Yang, W., Drucehammerb, D. G., *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 2451-2460; (b) Dauben, W. G., Hendricks, R. T., Pandey, B., Wu, S. C., Zhang, X., Luzzio, M. J., *Tetrah. Let.*, **1995**, *44*, 519.
129. Nielsen J., Dahl O., *Nucleic Acid Research*, **1987**, *15*, 3626.
130. Kierzek, R., w Na pograniczu chemii i biologii, H. Koroniak, J. Barciszewski, W.T. Markiewicz, K. Ziemnicki (eds), Wydawnictwo Naukowe UAM, **1998**, 369-416.
131. Wuts, P. G. M., Greene, T. W., *Willey-Intersine*, **2007**, 340.
132. McDowell, J. A., MeltWin, 36147 N. Tangueray Dr. Grayslake, IL 60031 USA, napisane i redagowane 1995, 1996, 2001.