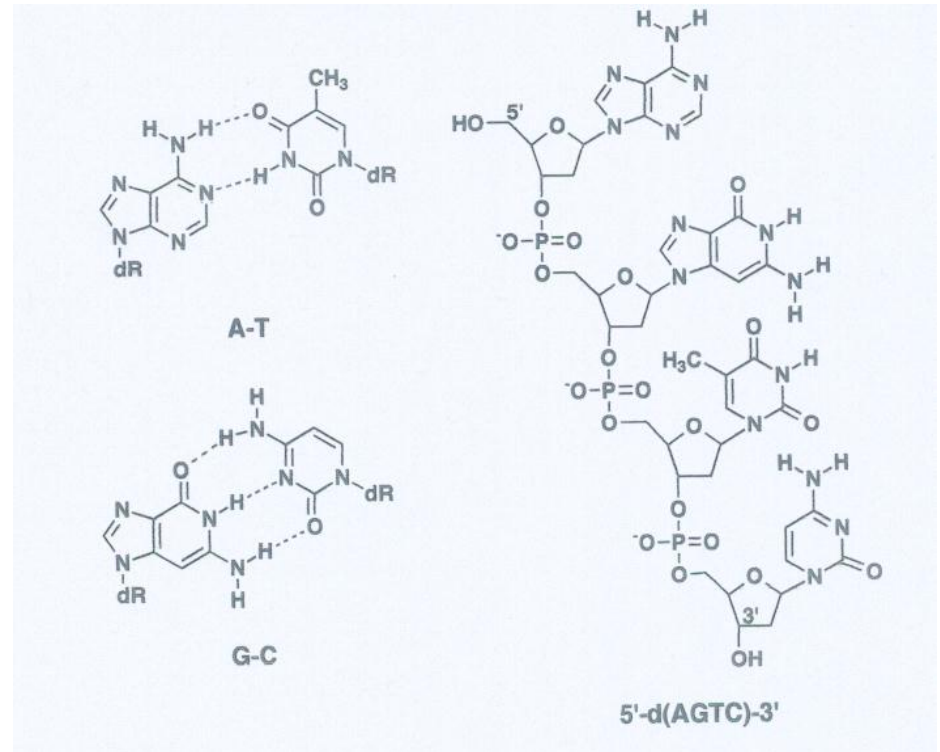
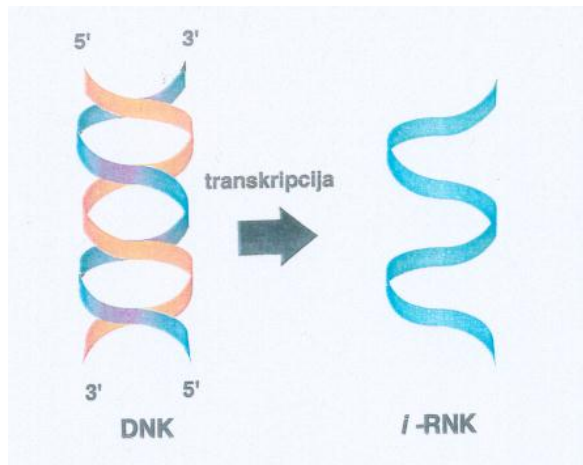


PRIPRAVA, ANALIZA I PRIMJENA OLIGONUKLEOTIDA

Prof. dr. sc. Ivan Habuš

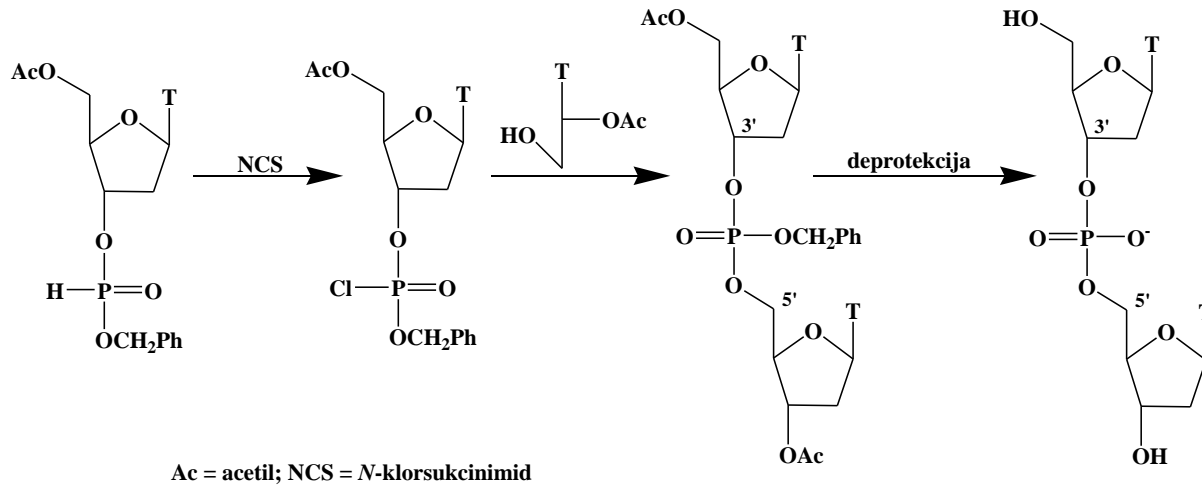
SINTEZA OLIGONUKLEOTIDA

Nakon otkrića nukleinskih kiselina koncem XIX stoljeća, trebalo je proći nekoliko desetljeća da bi se otkrila prava struktura purinskih i pirimidinskih jedinica, te priroda njihovog međusobnog povezivanja u polinukleotidne lance. Kemijska struktura obaju rodova nukleinskih kiselina, DNK i RNK, utvrđena je do 1952. godine. Ubrzo nakon toga Watson i Crick predložili su strukturu dvostruke uzvojnice za DNK, a time je ujedno započela nova era kemijskih, biokemijskih i molekularno-bioloških studija nukleinskih kiselina.

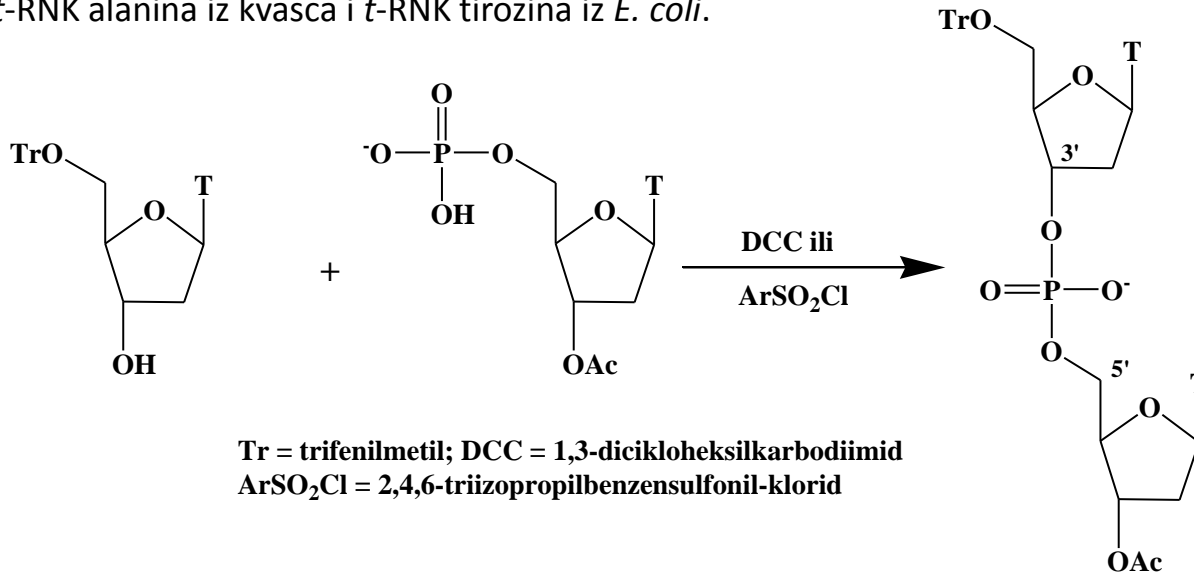


1. NAJUSPJEŠNIJI PRIMJERI PRVIH POKUŠAJA PRIPREVE OLIGONUKLEOTIDA U OTOPINI

1.1. Michelson i Todd publicirali su 1955. godine prvu sintezu 3'-d(TT)-5' dimera u otopini.



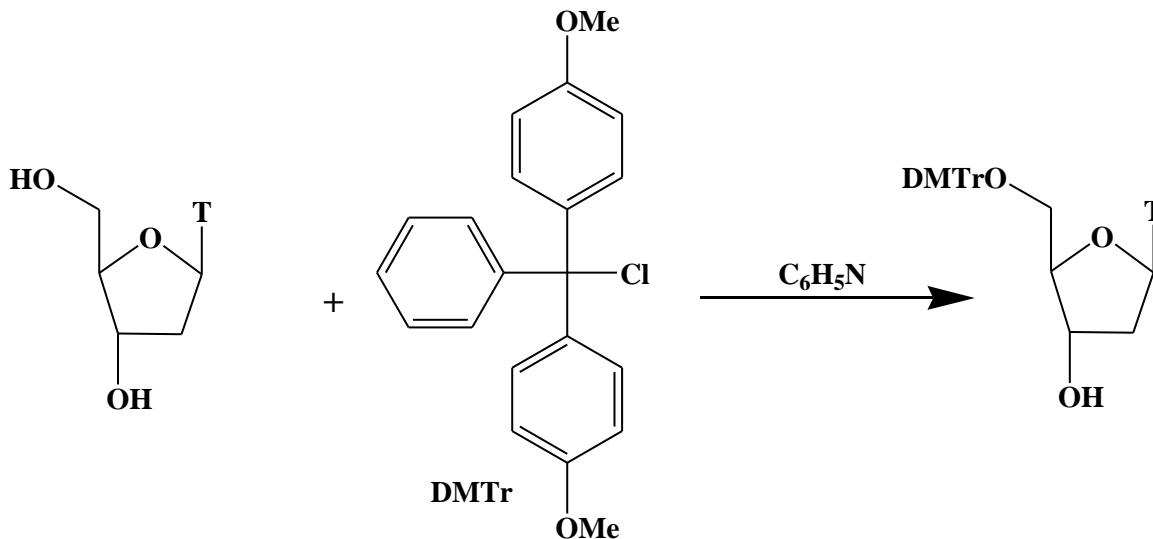
1.2. Khorana i njegovi suradnici su 1960-tih uspjeli pripraviti u otopini tzv. „fosfodiesterskim“ postupkom, kraće lance deoksinukleotida s određenim redoslijedom baza, koji su zatim međusobno povezani u duge lance u prisutnosti T4-DNK ligaze. Takvim postupkom uspješno su sintetizirali gene odgovorne za biosintezu *t*-RNK alanina iz kvasca i *t*-RNK tirozina iz *E. coli*.

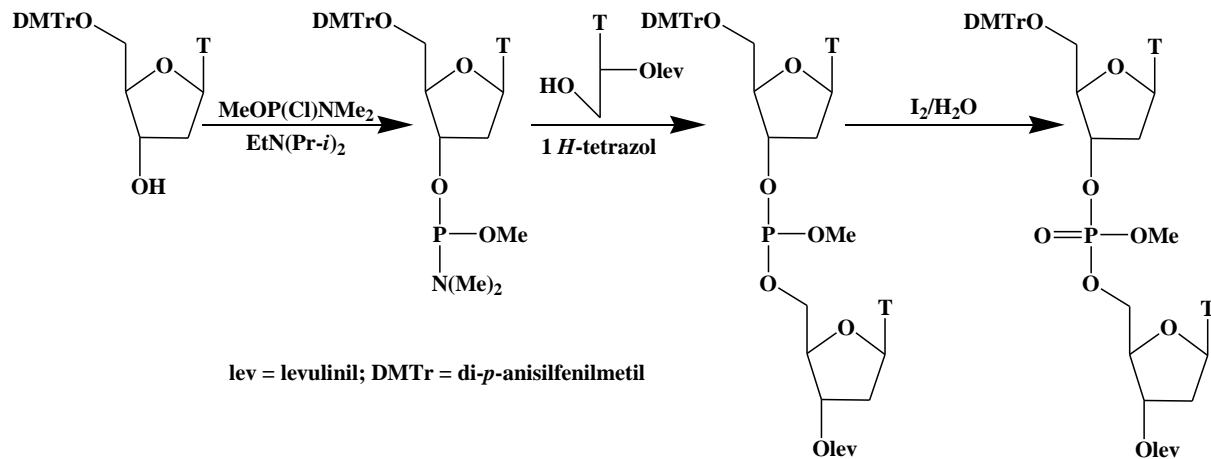


2. RAZVOJ KEMIJSKIH POSTUPAKA ZA PRIPRAVU OLIGONUKLEOTIDA NA ČVRSTIM NASAČIMA

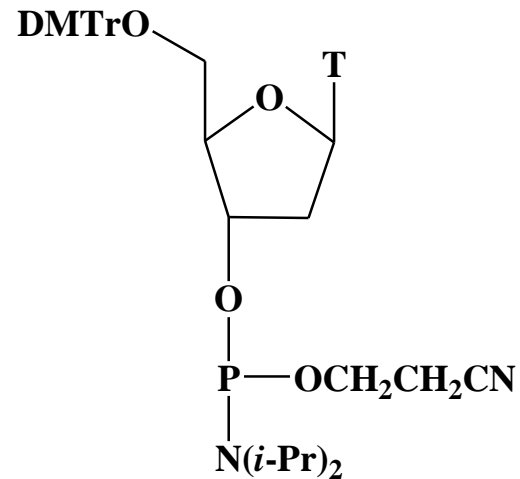
2.1. FOSFORAMIDATNI POSTUPAK

Tako su Beaucage i Caruthers pripravili nove sintone za sintezu oligonukleotida – fosforamide deoksiribonukleozida. Oni su pripremljeni u reakciji 5'-*O*-dimetoksitritildeoksitimina sa *N,N*-dimetilaminoklor metoksifosfinom kao fosforilirajućim sredstvom. Aktivacijom tako dobivenog fosforamida sa slabom kiselinom – 1*H*-tetrazolom, u prisutnosti 3'-*O*-levuliniltimina pripremljen je dinukleozid kao fosfitni triester u gotovo kvantitativnom iskorištenju. Njegovom oksidacijom vodenom otopinom joda dobiven je stabilni dinukleotid u obliku fosfatnog triestera.



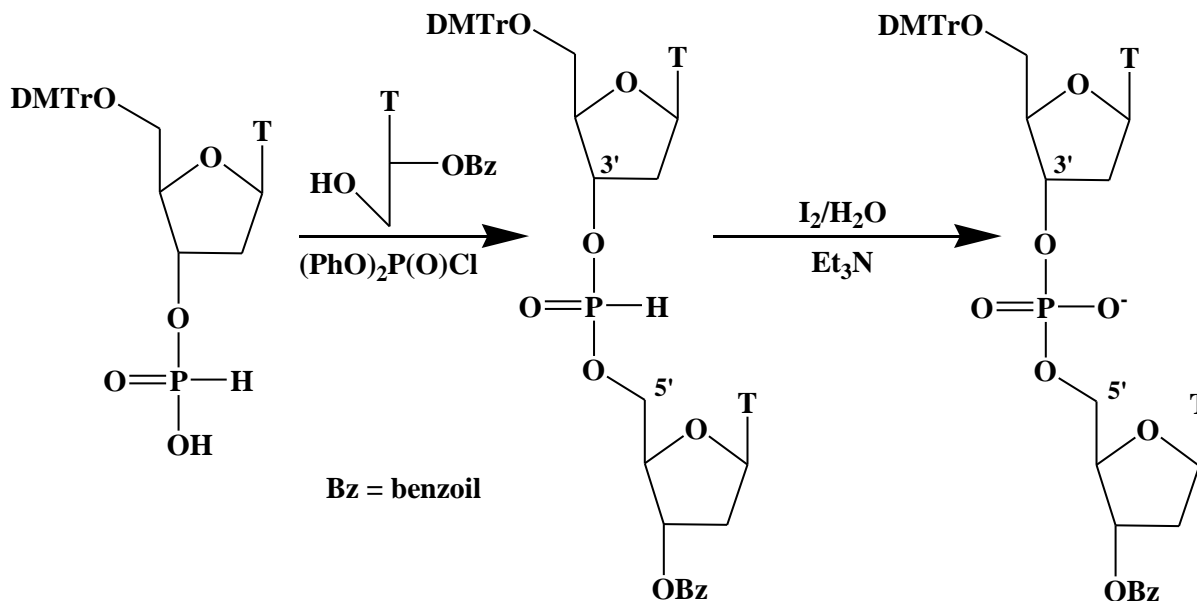


U kasnijem poboljšanom postupku struktura monomera je nešto izmijenjena, a pri tome su *N,N*-dimetilamino- i metoksi- skupine zamijenjene *N,N*-diizopropilnom i cijanoetoksi skupinom.



2.2. HIDROGEN FOSFONATNI POSTUPAK

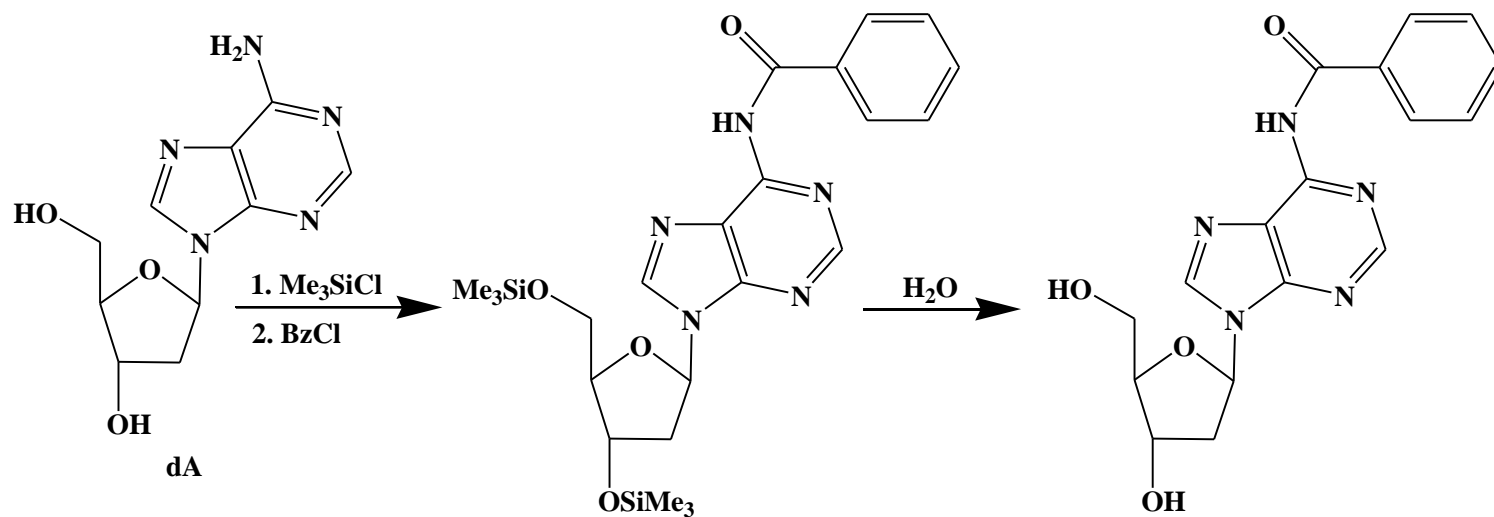
Garegg i suradnici uočili su da 5'-*O*-dimetoksitritildeoksiribonukleozid-3'-*O*-hidrogenfosfonat brzo reagira sa 3'-*O*-benzoiltiminom u prisutnosti aktivirajućih agenasa kao što su TPS-Cl, benzonsulfonil-klorid ili difenilfosfokloridata, pri čemu kao produkt nastaje odgovarajući (3'-5')-dinukleozid hidrogenfosfat. Prilikom automatizacije toga procesa pivaloil-klorid i adamantoil-klorid pokazali su se efikasnijim aktivirajućim agensima od naprijed spomenutih u sintezi u otopini. Oksidacijom vodenom otopinom joda uz trietilamin hidrogenfosfonatna veza dinukleozida efikasno je oksidirana u fosfatnu.



Oba postupka danas se u vrlo velikoj mjeri primjenjuju u laboratorijima širom svijeta u automatiziranim postupcima sinteze oligodeoksi- i oligoribonukleotida s točno definiranim sekvencijama na čvrstim nosačima.

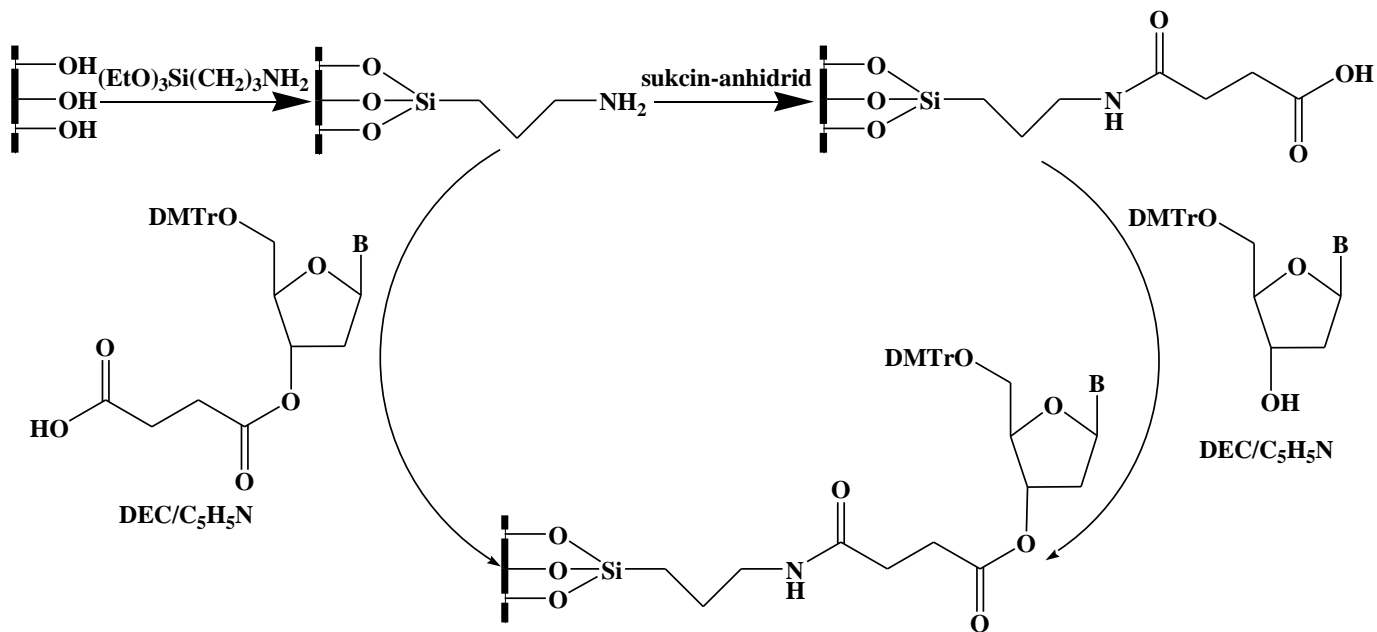
2.3. ZAŠTITNE SKUPINE EGZOCIKLIČKIH AMINO SKUPINA NUKLEOZIDNIH BAZA

Za zaštitu egzocikličkih amino-skupina nukleozidnih baza najčešće se rabe kiselinski kloridi kao npr. benzoil- ili *p*-metoksibenzoil-klorid za dA i dC, dok se za dG primjenjuje *i*-butiril-klorid, u „one-pot“ reakciji preko trimetilsililnih intermedijara.

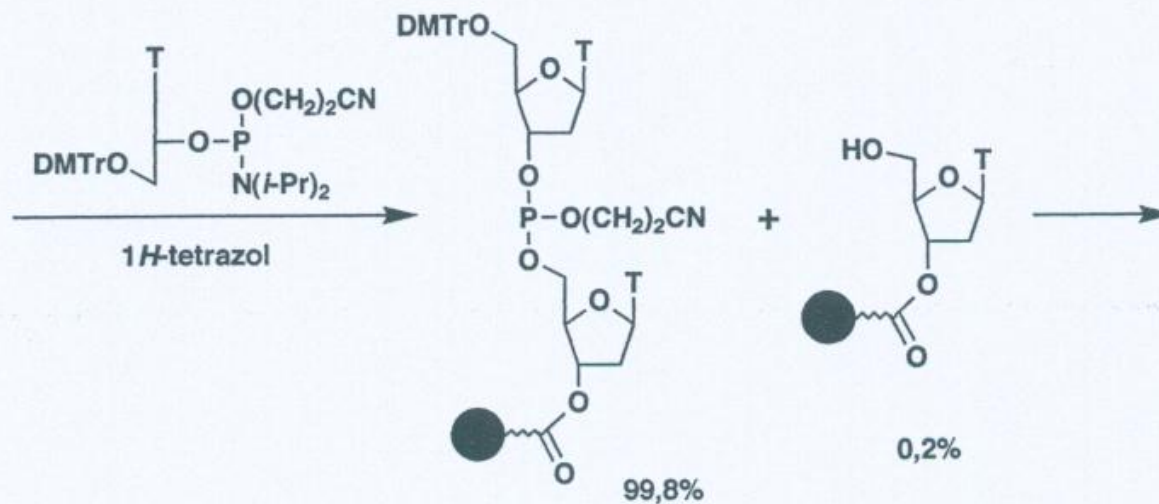
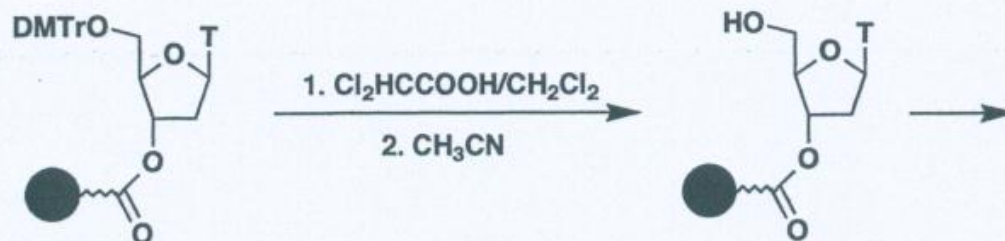


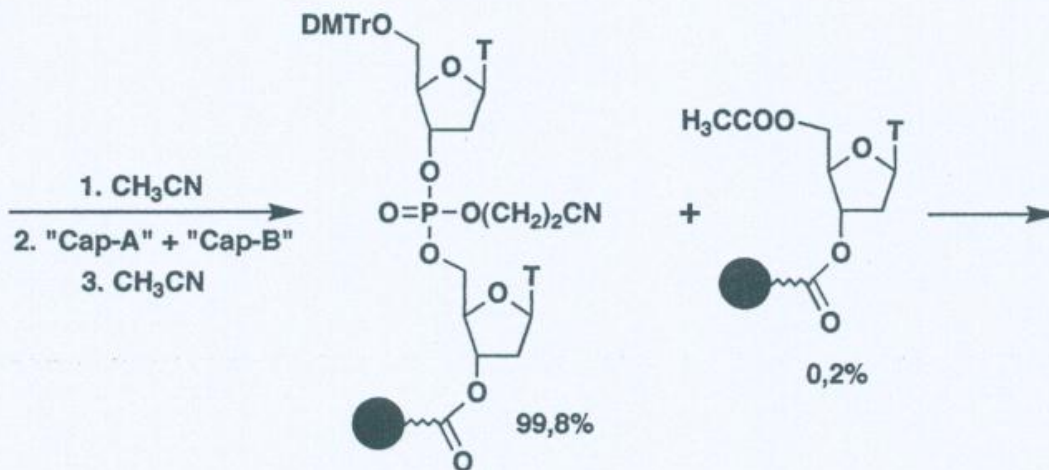
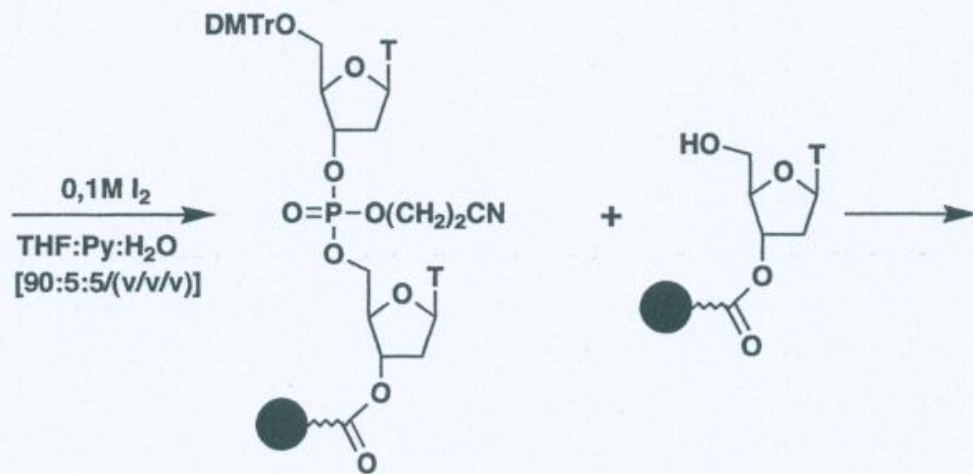
2.4. FUNKCIONALIZACIJA SILIKAGELA ILI CPG

Funkcionalizacija silikagela ili CPG („Controlled Pore Glass“) kao čvrstih nosača postiže se reakcijom s 3-aminopropiletoksisilanom. Rezultirajući aminoalkilirani silikagel ili CPG se zatim dalje funkcionalizira u reakciji s anhidridom jantarne kiseline pri čemu se uvodi slobodna karboksilna skupina. Ta se skupina potom esterificira preko 3'-OH-skupine deoksiriboze odgovarajućeg nukleozida u prisutnosti DEC u piridinu. Alternativno, odgovarajući 3'-O-sukcinirani nukleozid također se može na aminoalkilirani silikagel ili CPG vezati izravno amidnom vezom.

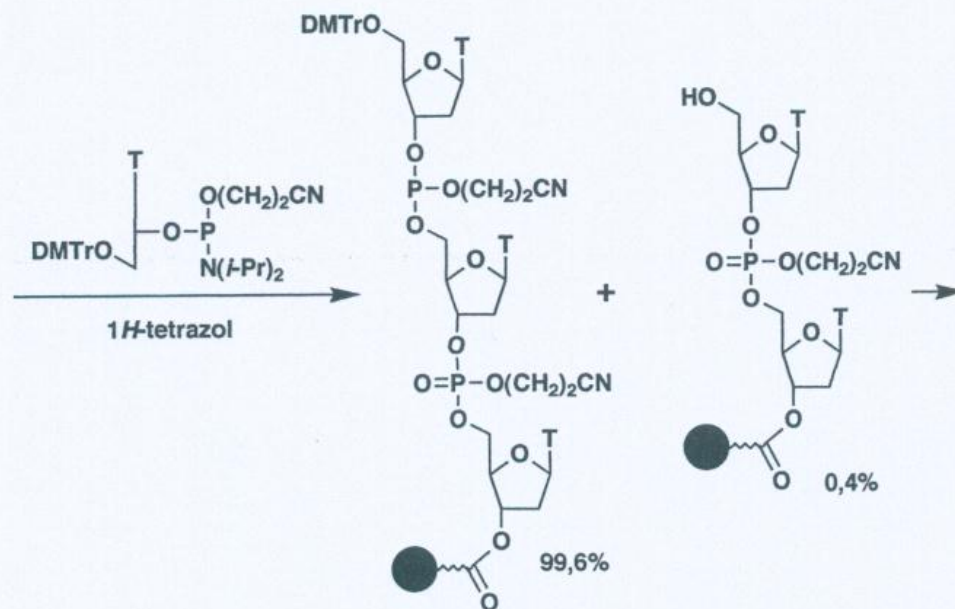
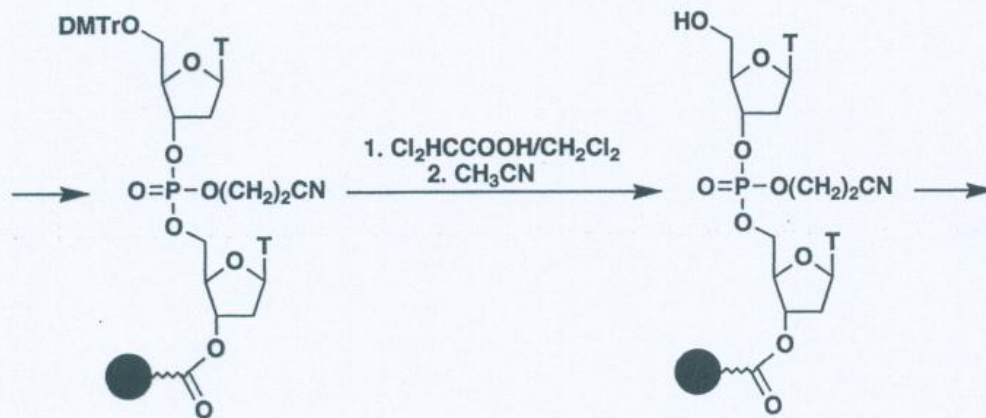


DEC = 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid

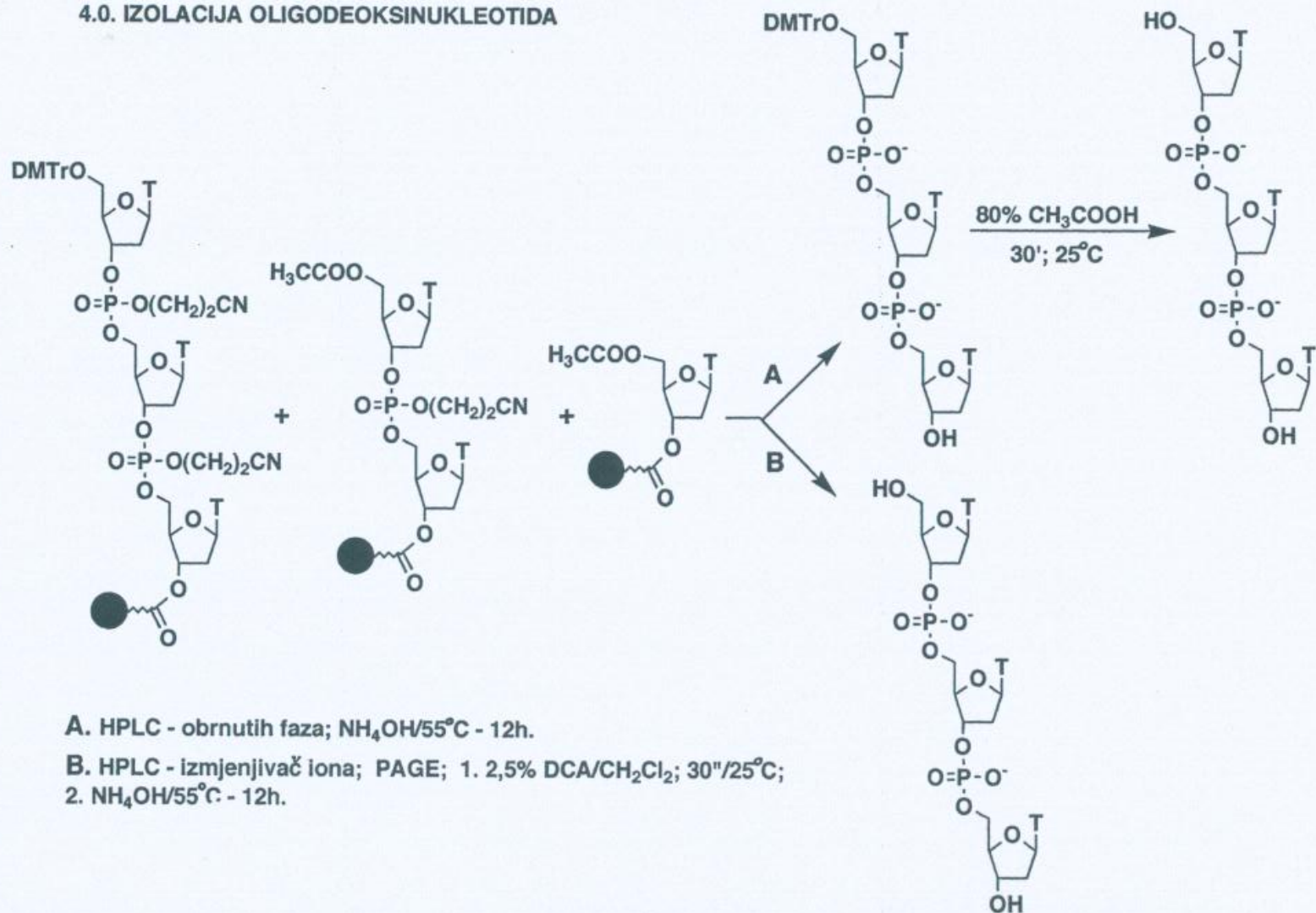




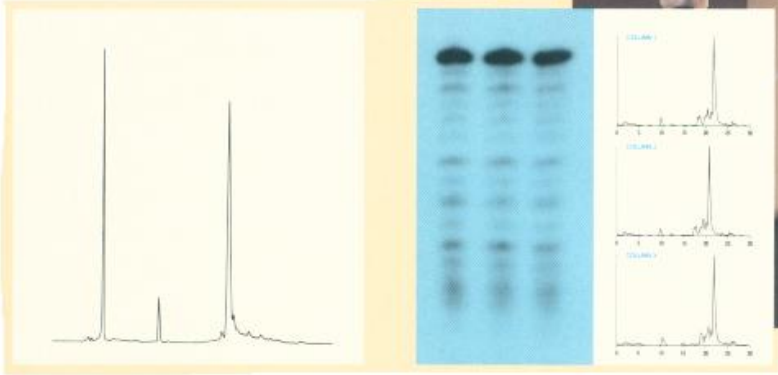
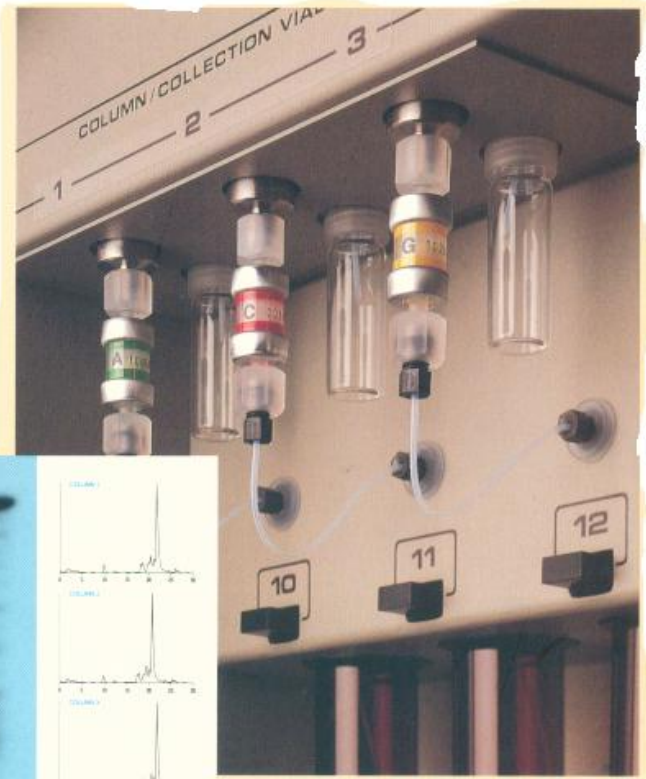
"Cap-A" = anhidrid octene kiseline : 2,6-lutidin : THF
 "Cap-B" = 2,0 M otopina 1-metilimidazola u THF



4.0. IZOLACIJA OLIGODEOKSINUKLEOTIDA



AUTOMATIZIRANI DNK SINTETIZER



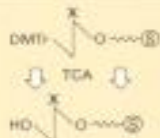


Three columns for simultaneous synthesis of oligonucleotides.

Phosphoramidite Chemistry

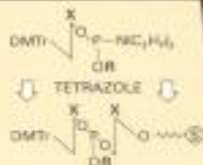
DETRITYLATION

- 1** The dimethoxy trityl group which protects the 5'-OH is removed by treatment with trichloroacetic acid (TCA). This frees the 5'-OH for reaction.



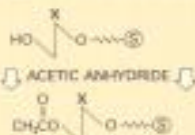
ADDITION

- 2** Tetrazole and the phosphoramidite are mixed as they enter the reaction chamber. These form a highly reactive species which rapidly reacts with the 5'-OH.



CAPPING

- 3** Acetic anhydride and dimethyl amino pyridine are mixed and form a powerful acetylating species which terminates or "caps" any chains which did not react in the addition step.



OXIDATION

- 4** The labile trivalent phosphorous linkage formed in the addition step is converted to the stable, pentavalent phosphorus linkage of biologically active DNA.



DEPROTECTION

- 5** After chain assembly is complete, the phosphate protecting groups are removed, the chains are separated from the solid support, and the base protecting groups are removed.

OLIGONUCLEOTIDE

START:
Support-bound
Nucleoside

Cycles
2 through X

Last Cycle

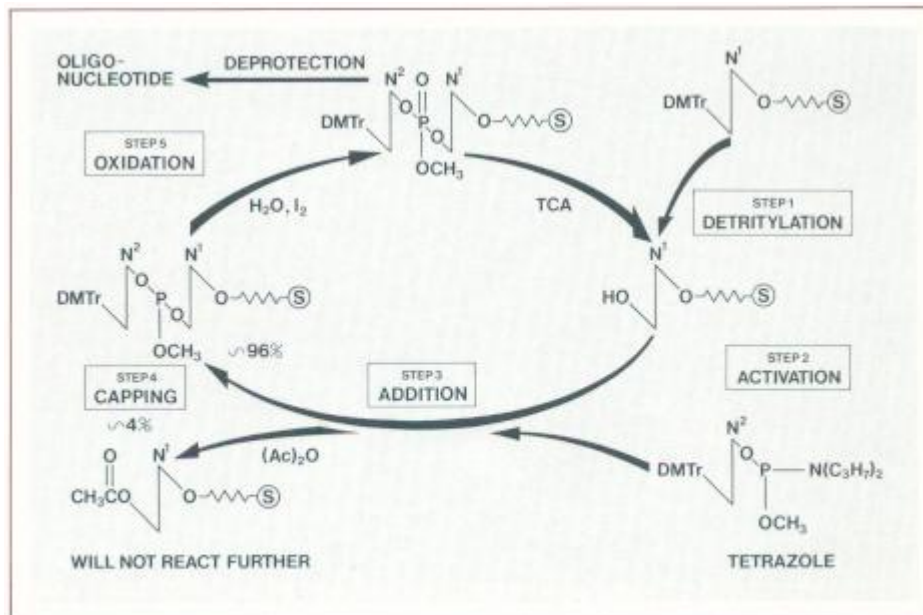


Figure 1. Summary of chemistry for synthesis of DNA with efficient phosphoramidite chemistry.

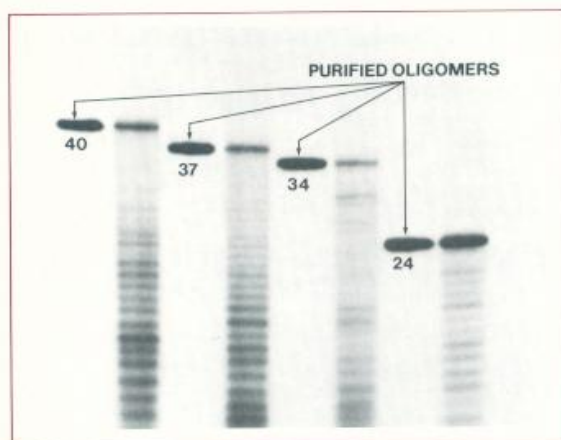


Figure 2. Autoradiogram of crude and purified oligonucleotides.

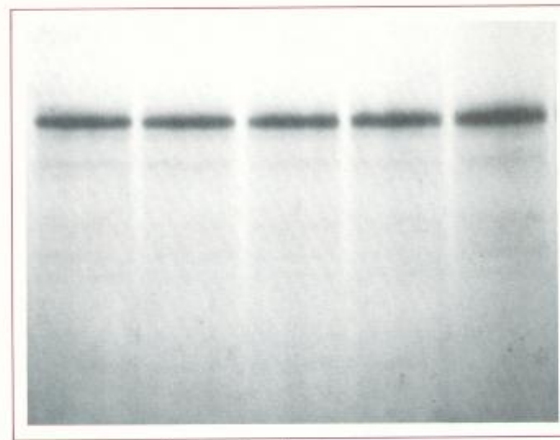


Figure 3. UV shadowing of crude 40-mer.