

WOJCIECH J. STEC¹, MARIA KOZIOŁKIEWICZ²

Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk

Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

¹e-mail: wjstec@bio.cbmm.lodz.pl

²e-mail: mkoziol@bio.cbmm.lodz.pl

OLIGONUKLEOTYDY: CZY TYLKO FRAGMENTY KWASÓW NUKLEINOWYCH?

W końcu lat 80. mijającego stulecia ARTUR KORNBERG (1987) w swoim eseju: „Dwie różne kultury — chemia i biologia” stwierdził: „chemi-



¹Prof.dr hab. Wojciech J. Stec, kierownik Zakładu Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, czł.korresp.PAN. Absolwent Politechniki Łódzkiej (1963), od 1962 zatrudniony w PAN. Synteza organicznych związków fosforu, analiza konformacyjna cyklicznych fosforanów, stereochemia procesu nukleofilowego podstawienia przy atomie fosforu, były demonstrowane użytecznością tworzonej wiedzy o charakterze podstawowym do badań biologicznych

stry and biology are two distinctive cultures and the rift between them is serious, generally unappreciated, and counterproductive” („Chemia i biologia to dwie odrębne kultury; przepaść

nad strukturą i funkcją cyklicznych biofosforanów (cAMP) oraz modyfikowanych oligonukleotydów znajdujących zastosowanie w biologii molekularnej, biologii komórkowej oraz chemii medycznej. Za istotny wkład w rozwój badań medycznych nagrodzony w roku 1992 przez NIH Fogarty International Center tytułem „Fogarty Scholar-in-Residence”. Autor ponad 300 publikacji naukowych oraz ok. 60 patentów krajowych i zagranicznych, licencjonowanych przez firmy amerykańskie, m.in Applied Biosystems, Lynx Therapeutix, Inex Pharm., Genta Inc. Wyróżniony Medalem Stanisława Kostaneckiego przez Polskie Towarzystwo Chemiczne (1990), Medalem im. Leona Marchlewskiego przez Komitet Biochemii i Biofizyki PAN (1995) oraz Złotym Medalem WIPO (Genewa, 1995). Laureat nagrody Fundacji Onkologii Doświadczalnej i Klinicznej (1997). Promotor zakończonych 25 rozpraw doktorskich. Hobby: publicystyka, polityka naukowa, biotechnologia.

²Doc.dr hab. Maria Koziołkiewicz jest absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego (1982); od kilkunastu lat pracuje w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Jej zainteresowania zawodowe dotyczą chemii i biochemii kwasów nukleinowych, oddziaływań białka-kwasy nukleinowe oraz biologicznych i biochemicznych właściwości modyfikowanych oligonukleotydów (doktorat — 1989). W latach 1991–1992 przebywała na stażu na Uniwersytecie Rockefellera. Po powrocie uczestniczyła w pracach nad tiofosforanowymi analogami oligonukleotydów, ich wykorzystaniem w strategii antysensowych oligonukleotydów oraz w badaniach nad enzymami nukleolitycznymi (habilitacja — 1999). Hobby: historia, historia sztuki.

między nimi jest głęboka, na ogół niedoceniana i wręcz szkodliwa...”). Ten cytat warto zderzyć z wypowiedzią wieloletniego redaktora naczelnego czasopisma „Nature”, Johna Maddoxa: „Chemists have done wonders in losing their identity in the rest of science. Some might argue the point, but it is a fact that the Nobel committee awarded its 1985 chemistry prize to a pair of mathematicians. — Meanwhile, the practice of what still passes for chemistry seems to have been largely preempted by outsiders — physicists, quantum theoreticians, computer maven, statisticians, instrument designers, laser experts, genetic engineers, medical researchers, psychiatrists, astronomers, material specialists and a host of other species. Truly, the science of chemistry has lost its identity” (SEEBACH 1990) („...Chemicy dokonywali cudów, żeby utracić swą tożsamość naukową. Ktoś mógłby dyskutować słuszność tego zarzutu, ale faktem jest, że w 1985 r. nagrodę Nobla w dziedzinie chemii przyznano dwóm matematykom. Tymczasem w praktyce to, co ciągle jeszcze uchodzi za chemię wydaje się być w dużej mierze realizowane przez nie-chemików: fizyków, teoretyków, informatyków, statystyków, genetyków, psychiatrów, astronomów, materiałoznawców, itd., itp. faktycznie, chemia jako nauka, utraciła swą tożsamość...”). Dobór obydwu cytatów nie jest przypadkowy, bowiem niżej podpisani należą do grupy „ludzi pogranicza” (biologii molekularnej oraz chemii bioorganicznej), którzy nie rezygnując ze swej przynależności do dyscypliny „chemia organiczna” w skromnym zakresie uczestniczyli poprzez swe badania w zbliżaniu tych dyscyplin, wykazując jedność nauki i pozytywne strony współpracy chemików i biologów. Kontekst osobisty rzutuje na dobór przykładów demonstrujących, iż wspólne określanie i rozwiązywanie celów badawczych było owocne dla postępów wiedzy, zarówno w zakresie syntezy organicznej, dostarczającej narzędzi do badań enzymologicznych, jak i w zakresie biologii molekularnej.

W naszym odczuciu, zapewne nie bez sprzeciwu dużej części społeczności chemików, za największe osiągnięcie syntezy organicznej mijającego ćwierćwiecza należy uznać opracowanie szybkiej i wydajnej metody syntezy oligonukleotydów. Oligonukleotydy są krótkimi fragmentami kwasów nukleinowych, liczącymi 12–50 nukleotydów. Jakkolwiek znaczenie kwasów nukleinowych, dwóch pierwszych członów podstawowego dogmatu biologii molekularnej: „DNA RNA Białko”, uwypukliły liczne nagrody Nobla przyznane zarówno chemikom (Alexander Todd, Ghobind Khorana, James Watson, Francis Crick), jak i biologom (Paul Berg, Artur

Kornberg), postęp w zakresie poznania ich struktury i funkcji był ograniczony dostępnością oligonukleotydów. Przed rokiem 1980, dla pozyskania drogą syntezy chemicznej jednego kilkunastomerowego oligodeoksyrybonukleotydu, trzeba było nakładu kilkumiesięcznej pracy doświadczanego chemika-organika, który metodą trójestrową w roztworze, krok po kroku, dołączał kolejne nukleozydy do izolowanych wcześniej krótszych prekursorów. Pozyskiwanie tych fragmentów drogą biologiczną było oczywiście możliwe poprzez izolowanie fragmentów DNA ze źródeł naturalnych oraz ich sekwencjonowanie, a następnie degradację polinukleotydów za pomocą enzymów restrykcyjnych. Ten sposób postępowania był pracochłonny i ograniczony ilością pozyskiwanego materiału, jak i możliwością degradacji polinukleotydów. Nie bez znaczenia jest fakt, iż oczyszczanie tak otrzymywanych fragmentów było żmudne, gdyż zarówno metody chromatograficzne, jak i elektroforetyczne, pozwalały na izolowanie niewielkich ilości materiału.

Rewolucyjny postęp w zakresie poznania struktury i funkcji kwasów nukleinowych i ich wykorzystania w badaniach biologicznych odnotowuje się od 1980 r., kiedy to Marvin CARUTHERS opublikował opracowaną w swoim laboratorium amidofosforynową metodę syntezy oligonukleotydów na stałym podłożu (CARUTHERS 1985). Metoda amidofosforynowa uległa szybkiej komercjalizacji, wyrażającej się dostępnością zarówno zautomatyzowanych i sterowanych komputerami syntetyzerów DNA, jak i odczynników koniecznych do tej syntezy. W ciągu jednego dnia za pomocą jednego syntetyzera już w połowie lat 80. można było wyprodukować około 10 różnych oligonukleotydów syntetyzowanych w skali 1 μ mol i zawierających do 20 nukleotydów, bądź też jeden oligonukleotyd w ilości 10 mg (CARUTHERS 1985). Równoległy rozwój metod chromatograficznych, a szczególnie „chromatografii na odwróconej fazie”, pozwalał na otrzymywanie produktów o czystości analitycznej. Taka dostępność syntetycznego materiału genetycznego w pierwszym rzędzie znalazła odbicie w szybkiej i stosunkowo łatwej metodzie łączenia oligonukleotydów (ligacji) w dłuższe fragmenty DNA oraz klonowania, czego wyrazem było pozyskiwanie bakterii i komórek zdolnych do ekspresji obcego genu. Jakkolwiek u podstaw inżynierii białkowej metodą rekombinantowego DNA leżały doświadczenia biologów (Paul Berg), dostępność syntetycznych genów zrodziła dyscyplinę inżynierii białkowej, leżącą u podstaw współczesnej biotechnologii. Możliwość pojedynczej, bądź wielokrotnionej mutacji pozyskiwanego białka stanowiła osiągnię-

nięcie wyrażające się nie tylko otrzymywaniem nowych białek, ale przede wszystkim miała olbrzymie znaczenie dla poznania funkcji poszczególnych aminokwasów w aktywności enzymów oraz określania ich roli w architekturze centrum aktywnego. Nie można także wyobrazić sobie narodzin diagnostyki molekularnej bez szerokiej dostępności oligonukleotydów. Znajomość zależności niektórych schorzeń o podłożu genetycznym od mutacji genetycznych pozwoliła na opracowanie testów diagnostycznych, opartych o sondy oligonukleotydowe i ich zdolność do hybrydyzacji do tych fragmentów DNA, które zawierały błędne, bądź wadliwe, sekwencje nukleotydowe. Dzięki dostępności oligonukleotydów powszechna stała się technika PCR umożliwiająca otrzymywanie zwiokrotnionych ilości wybranych fragmentów DNA bądź RNA (SAIKI i współaut. 1988). Czy możliwy byłby PCR bez dostępności oligonukleotydów o zdefiniowanej sekwencji nukleotydów? — to obecnie pytanie czysto retoryczne. Także możliwość uzyskiwania plazmidów o kasetowo zmienianej strukturze — leżąca u podstaw kontrowersyjnej, ale budzącej wiele nadziei terapii genowej — jest pochodną dostępności oligonukleotydów. Ona także leży u podstaw takich zastosowań oligonukleotydów dla celów ochrony zdrowia, jakimi są szczepionki DNA oraz technologia rybozymów, technologia antysensowych oligonukleotydów i technologia aptamerowa. Wymienione powyżej zastosowania oligonukleotydów, dostępnych dzięki chemicznej metodzie ich syntezy, stwarzają podstawę do szybkiego sekwencjonowania genomu ludzkiego. Firma Perkin-Elmer opracowała ostatnio DNA — syntetyzer zdolny do syntezy 200 oligonukleotydów w ciągu 24 godzin, a bliskie ukończenia jest rozwiązanie technologiczne pozwalające na uzyskanie w ciągu 24 godzin 6000 oligonukleotydów o różnej sekwencji nukleotydów, na dodatek w sposób systematyczny znakowanych znacznikami fluorescencyjnymi, przy czym każdy oligonukleotyd jest związany z ziarnem złoza polistyrenowego.

W naszej opinii opracowanie technologii syntezy oligonukleotydów na fazie stałej metodą amidofosforynową jest największym osiągnięciem chemii organicznej, mającym wpływ na rozwój nauk przyrodniczych. I jakkolwiek jest ono rozważane przez oponentów tej tezy w kategoriach rozwiązania technologicznego, a nie odkrycia naukowego, to jego wpływ na postęp badawczy w wielu obszarach nauk przyrodniczych, choć nie tylko (np. kryminalistyka) jest nieporównywalny do żadnego innego osiągnięcia, bądź odkrycia w zakresie chemii organicznej mijającego stulecia. Ten osobisty pogląd

może być uznany za nieobiektywny, gdyż jest wypowiedzany przez zespół badawczy uczestniczący w procesie rozwoju syntezy tak zwanych modyfikowanych oligonukleotydów. W 1983 r. zwrócono się do jednego ze współautorów (W. J. Stec) o opracowanie sondy hybrydyzacyjnej służącej do wykrywania talasemii (STEC i współaut. 1984). Wydawało się wówczas, iż wprowadzenie do każdego wiązania internukleotydowego w miejsce nie-estrowego atomu tlenu radioaktywnej siarki ³⁵S pozwoli na otrzymanie wysoce czułego testu hybrydyzacyjnego. Jakkolwiek wkrótce ten sposób rozumowania okazał się naiwny ze względu na obniżone, w porównaniu z materiałem naturalnym, właściwości hybrydyzacyjne oligo(nukleozydotiofosforanów), to jednak w kilka lat później (1987) PS-oligonukleotydy stały się jednym z kilku rodzajów analogów DNA znajdującym zastosowanie w hamowaniu ekspresji „niechcianych” genów (MATSUKURA i współaut. 1987). Efektem tego kierunku badań jest zatwierdzenie w 1998 r. przez FDA 22-merowego tiofosforanowego oligonukleotydu jako leku przeciwko utracie wzroku, spowodowanej infekcją wirusa cytomegalii (CMV) u pacjentów cierpiących na AIDS. I jakkolwiek badania nad wykorzystaniem PS-oligonukleotydów w ramach strategii antysensowej doznały wielu porażek (niespecyficzność, wiązanie z białkami, immunogenność wywołująca wyrzut cytokin, itp.) (AGRAWAL i KANDIMALLA 2000), to w dalszym ciągu na liście potencjalnych leków w I, II i III fazie badań klinicznych jest około 15 oligonukleotydów, w których strukturze zasadniczym elementem jest sekwencja oligo(nukleozydotiofosforanowa) (Tabela 1).

W dalszej części niniejszego opracowania nie będziemy jednak omawiać strategii antysensowej — została ona podsumowana w szeregu monografii i jej skrótowe omówienie byłoby niecelowe (STEIN i KRIEG 1998). Pragniemy natomiast zwrócić uwagę Czytelników na inny aspekt zastosowania tiofosforanowych analogów oligonukleotydów, mianowicie ich wykorzystanie jako narzędzi badawczych w poznawaniu architektury centrów aktywnych nukleaz i polimeraz. Kariera tej klasy analogów DNA w badaniach mechanizmów reakcji rozpoczęła się na początku lat 70., kiedy to tiofosforanowe analogi dinukleotydów zaczęto stosować jako substraty w badaniach nad aktywnością niektórych niespecyficznych nukleaz (USHER i współaut. 1972, ECKSTEIN 1985).

Jako nienaturalne, chemicznie zmodyfikowane substraty, wykazywały one znacznie gorsze właściwości substratowe niż niemodyfikowane dinukleotydy. Co więcej, okazało się, że niektóre nukleazy wykazują stereoselektyw-

ność wobec tiofosforanowych wiązań internukleotydowych; innymi słowy, rozpoznają różnicowanie położenie atomu siarki w modyfikowa-

zują nie tylko nukleazy i rybozomy przedstawione w Tabeli 2, ale także większość polimeraz, odwrotna transkryptaza, terminalna transfera-

Tabela 1. Aktualnie prowadzone badania kliniczne z zastosowaniem tiofosforanowych analogów oligonukleotydów (AGRAWAL i KANDIMALLA 2000)

Docelowy gen	Sekwencja oligonukleotydu	Choroba	Sposób podawania	Stan badań
Bcl-2	5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT	Rak prostaty	podskórnie	Faza III [§]
Bcr-abl.	1.5'-CGCTGAAGGGCTTCTTCCT TATTGAT 2.5'-CGCTGAAGGGCTTTGAAC TGTGCTT	Zaawansowane stadium przewlekłej białaczki szpikowej	Ex vivo (1) albo dożylnie (2)	Badania przedkliniczne
c-myb	5'-TATGCTGTGCCGGGGTCTTC GGGC	Przewlekła białaczka szpikowa	Dożylnie albo ex vivo	Faza I
c-raf	5'-TCCC GCCTGTGACATGCATT	Rak prostaty, piersi, trzustki, płuc, jelita, jajnika	Dożylnie	Faza II
Ha-ras	5'-GGGACTCCTCGCTACTGCCT	Guzy	Dożylnie	Faza I
Podjednostka I α kinazy białkowej A(PKA-R1 α)	5'-GCGUGCCTCCTCACUGGC*	Guzy	Dożylnie	Faza III [§]
Kinaza białkowa C	5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA	Rak jajnika, prostaty, piersi, płuc, jelita, mózgu, czerniak	Dożylnie	Faza II
Metylotransferaza DNA	Sekwencja nieujawniona	Guzy	Dożylnie	Faza I
Wirus cytomegalii (CMV)	5'-GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCG	Ślepota wywołana przez wirus CMV	Lokalne, do gałki ocznej	Zatwierdzony
Wirus cytomegalii (CMV)	5'-UGGGGCTTACCTTGCGAACA*	Ślepota wywołana przez wirus CMV	Dożylnie	Faza II

* 2'-O-metyloribonukleotydy; [§] informacja prywatna

nym wiązaniu internukleotydowym i degradują tylko jeden typ wiązań internukleotydowych — o konfiguracji R_p albo S_p (Ryc. 1). Atom fosforu modyfikowanego wiązania jako związany z czterema różnymi podstawnikami jest chiralny (optycznie czynny). Ze względu na różne położenie atomu siarki, tiofosforanowy dinukleotyd występuje jako mieszanina dwóch diastereoizomerów: R_p i S_p, w cząsteczkach których występują wiązania internukleotydowe o konfiguracji, odpowiednio, R_p oraz S_p. Fakt, iż tiofosforanowe analogi oligonukleotydów są odporne na działanie nukleaz, zdecydował między innymi o zastosowaniu tej klasy połączeń dla celów strategii antysensowej. Nukleazy obecne w płynach ustrojowych oraz w komórkach degradują niemodyfikowane oligonukleotydy w ciągu 1–2 godzin, natomiast PS-oligonukleotydy pozostają w tych warunkach trwałe nawet przez kilkanaście godzin (KOZIOLKIEWICZ i współaut. 1997).

Niezależnie jednak od praktycznego znaczenia diastereoselektywności nukleaz wobec tiofosforanowych analogów oligonukleotydów, pozostawały do wyjaśnienia przyczyny tego zjawiska. Zróżnicowaną aktywność wobec tiofosforanowych wiązań internukleotydowych wyka-

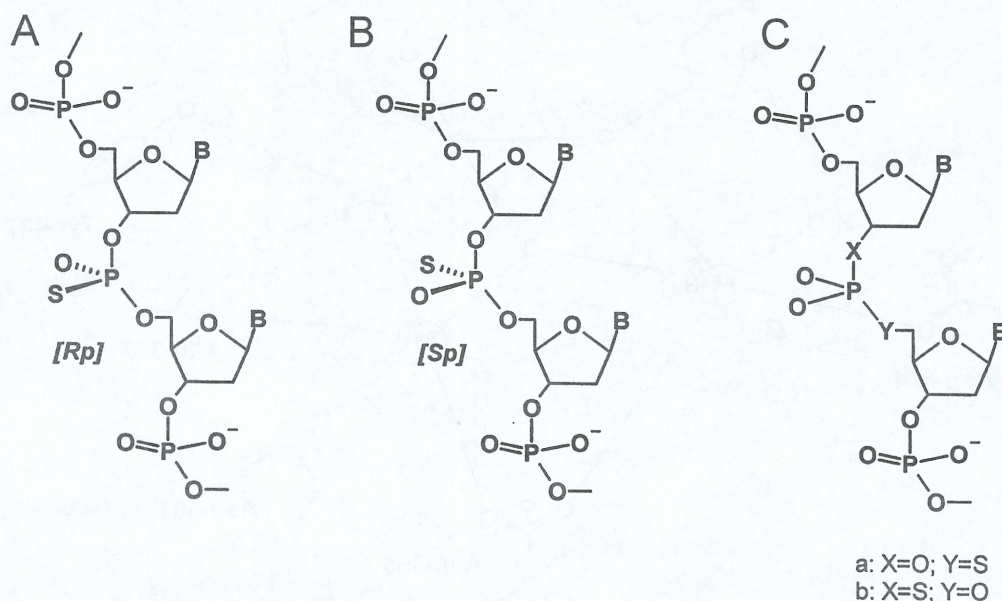
za, topoizomerazy oraz enzymy restrykcyjne typu II. Diastereoselektywna wobec tiofosforanowego analogu odpowiedniego substratu jest także fosfolipaza C (HONDAL i współaut. 1997).

Tabela 2. Diastereoselektywność wybranych enzymów wobec diastereoizomerów tiofosforanowych substratów (kR_p/kS_p)

Enzym	kR _p /kS _p	Praca źródłowa
Fosfodiesteraza z jadu węża	1.7 x 10 ³	GRIFFITS i współaut. 1987
Endonukleaza z <i>Serratia</i>	>1 x 10 ²	FRIEDHOFF i współaut. 1996
Fosfolipaza C	1.6 x 10 ⁵	HONDAL i współaut. 1997
Rybozym typu hammerhead	1.75 x 10 ⁴	SCOTT i UHLENBECK 1999
Rybozym typu hairpin	~1.0	YOUNG i współaut. 1997

Większość tych enzymów rozpoznaje i degraduje tiofosforanowe wiązania internukleotydowe o konfiguracji R_p, ale niektóre z nich wykazują aktywność enzymatyczną tylko wobec atomów fosforu o konfiguracji S_p. Próby wyjaśnienia

przyczyn diastereoselektywności podejmowano już w latach 80. Obejmowały one badania sforanowych substratów. Okazało się jednak, że różnice strukturalne między tymi związkami są



Ryc. 1. Tiofosforanowe analogi oligonukleotydów:

A) i B) podstawienie niemoistkowego atomu tlenu *pro-R* albo *pro-S* atomem siarki prowadzi do utworzenia, odpowiednio, izomeru R_p albo S_p tiofosforanowego analogu oligonukleotydu; C) tiofosforanowy analog oligonukleotydu zawierający atom siarki zamiast atomu tlenu grupy 5'-OH albo 3'-OH.

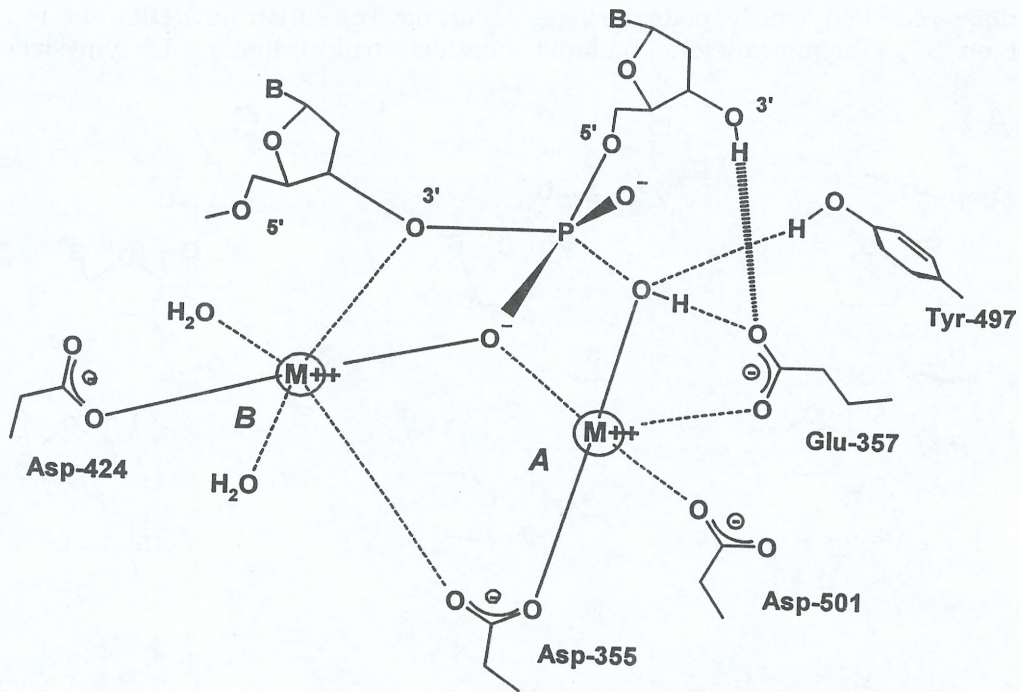
rentgenostrukturalne tiofosforanowych oligonukleotydów oraz odpowiednich enzymów. Przeprowadzono także badania nad powinowactwem enzymów wobec naturalnych i tiofo-

zbyt małe, aby można było je uznać za przyczynę diastereoselektywności enzymów. Wyjaśnienie tego zjawiska stało się możliwe dopiero w drugiej połowie lat 90.

STEREOCHEMIA ENZYMATYCZNYCH REAKCJI PRZENIESIENIA FOSFOROŁOWEJ LUB NUKLEOTYDOWEJ

Poznanie stereochemicznej preferencji enzymów nukleolitycznych w stosunku do tiofosforanowych wiązań internukleotydydowych jest użyteczne dla określenia mechanizmu ich działania. Z chemicznego punktu widzenia reakcje katalizowane przez nukleazy, nukleotydylotransferazy, kinazy, polimerazy lub ligazy są reakcjami nukleofilowego podstawienia na atomie fosforu. W przypadku nukleaz nukleofilem jest cząsteczka wody lub jon hydroksylowy. W przypadku polimeraz jest nim grupa 3'-hydroksylowa nukleotydu znajdującego się na 3'-końcu syntetyzowanego łańcucha RNA lub DNA, która atakuje atom fosforu trójfosforanu rybo- lub deoksyrybonukleozydu (NTP lub dNTP). Na tym etapie reakcji atom fosforu jest związany z pięcioma podstawnikami i tworzy produkt pośredni o strukturze bipiramidy trygonalnej: grupa odchodząca oraz nukleofil zajmują pozycje apikalne, natomiast trzy atomy tlenu zajmują pozycje ekwatorialne tej bipiramidy (Ryc. 2–4). Taki układ przestrzenny grupy atakującej i opuszczającej jest określany jako

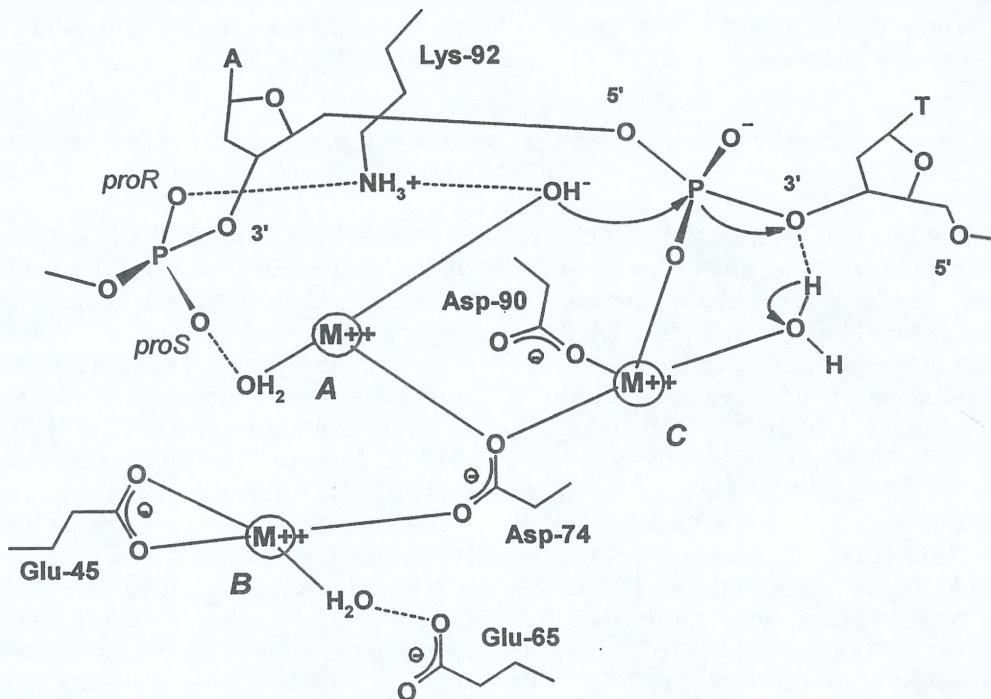
naprzeciwległy (ang. *in-line*). Tworzenie wiązania nukleofil-atom fosforu jest zsynchronizowane z zerwaniem wiązania fosfor-grupa opuszczająca. Ponieważ wiążąca się z fosforem cząsteczka nukleofila zajmuje przeciwstawne położenie do grupy odchodzącej, reakcji towarzyszy inwersja konfiguracji (GERLT 1993). Wiadomo jednak, że w przypadku szeregu reakcji enzymatycznych nukleofilem atakującym atom fosforu hydrolizowanego wiązania internukleotydydowego jest element struktury białka, na przykład łańcuch boczny aminokwasu (seryny, treoniny, tyrozyny lub histydyny). W tej sytuacji tworzy się kompleks enzym-substrat, gdzie enzym jest kowalencyjnie związany z grupą fosforową lub nukleotydydową. Hydroliza tego kompleksu wymaga udziału cząsteczki kolejnego nukleofila, na przykład obecnej w środowisku reakcji wody. Zatem reakcja przebiegająca z udziałem enzymu jako nukleofila jest procesem dwuetapowym. Ponieważ każdej z tych dwóch reakcji towarzyszy inwersja konfiguracji, ostatecznym wynikiem stereochemicznym jest



Ryc. 2. Centrum aktywne 3'-5'- egzonukleazy fragmentu Klenowa polimerazy DNA z *E. coli* (według BRAUTIGAMA i STEIZA 1998).

retencja konfiguracji przy atomie fosforu (GERLT 1993). Określenie stereochemii procesu enzy-

matycznego pozwala ustalić, czy w trakcie katalizowanej reakcji tworzy się kowalencyjny pro-

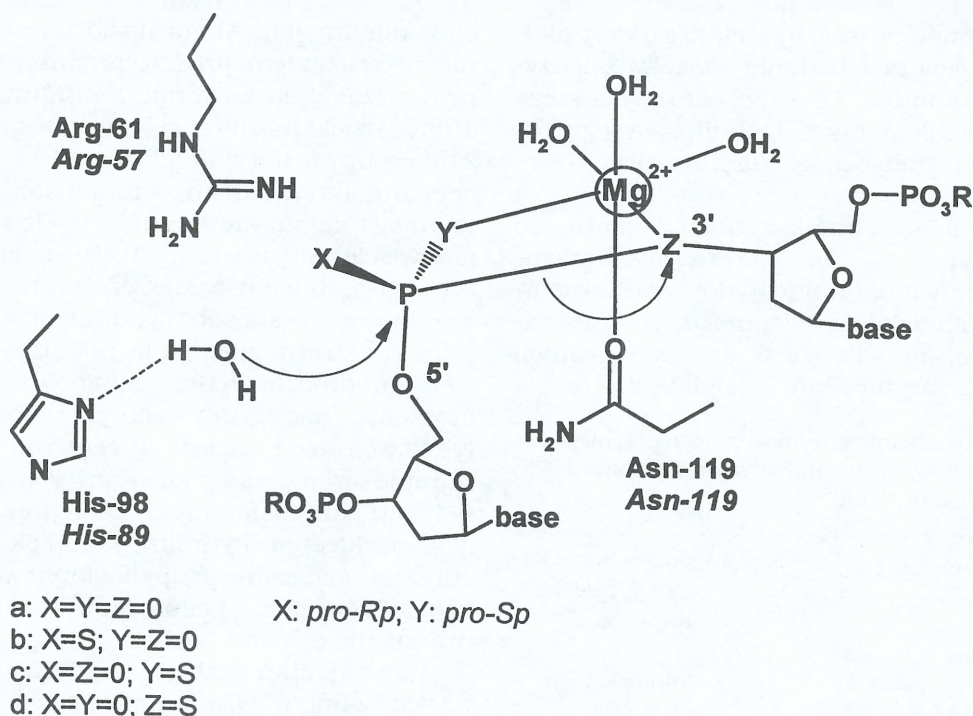


Ryc. 3. Mechanizm reakcji katalizowanej przez restrykcyjną endonukleazę Eco RV (według HORTON i współaut. 1998).

Jon metalu A związany z atomem tlenu *pro-S* generuje cząsteczkę nukleofila, która atakuje atom fosforu sąsiedniego wiązania internukleotydu. Niemostkowy atom tlenu *pro-S* wiązania podlegającego degradacji wiąże jon metalu C, który ułatwia odejście grupy opuszczającej, tzn. fragmentu DNA z grupą fosforanową na 5'-końcu. Jon metalu B pełni funkcję strukturalną.

dukt pośredni, czy też przeniesienie grupy nukleotydydowej lub fosforylowej z donora na akceptor odbywa się bez udziału produktu po-

która wydaje się bardziej uniwersalna niż poprzednie, a co ważniejsze, wymaga zaledwie pikomolowych ilości produktu reakcji enzyma-



Ryc. 4. Proponowany mechanizm degradacji wiązania internukleotydu przez endonukleazę z *Serratia marcescens* oraz endonukleazę *I-PpoI* (według FRIEDHOFFA i współaut. 1999).

Arg-61, His-98 oraz Asn-119 stanowią centrum aktywne endonukleazy *I-PpoI*, natomiast Arg-57, His-89 i Asn-119 pełnią analogiczną rolę w centrum aktywnym nukleazy z *Serratia marcescens* (a). Podstawienie atomu tlenu *pro-R* atomem siarki (X) nie zmienia architektury centrum aktywnego enzymu i tiofosforanowe wiązanie internukleotydu o konfiguracji *R_p* podlega degradacji (b); podstawienie siarką atomu tlenu *pro-S* (Y) jest przyczyną zawady przestrzennej w centrum aktywnym endonukleazy i czyni wiązanie internukleotydu o konfiguracji *S_p* opornym na działanie enzymu (c). Podobny efekt daje podstawienie atomem siarki tzw. mostkowego atomu tlenu w pozycji 3'-OH (d).

średniego, z asystą reszt aminokwasowych bądź kationów metali centrum aktywnego enzymu.

Badania nad stereochemią reakcji enzymatycznych rozpoczęły w 1970 r. Fritz Eckstein analizując mechanizm działania rybonukleazy A (USHER i współaut. 1972). W latach 70. i 80., kiedy możliwości analizy rentgenostrukturalnej były stosunkowo ograniczone, metoda stereochemiczna miała istotne znaczenie w badaniach nad enzymami, które katalizują przemiany mono- i polinukleotydów. W tym okresie opracowano kilka metod badania stereochemii reakcji katalizowanych przez enzymy zaangażowane w metabolizm nukleotydów i kwasów nukleinowych. Nadal zresztą pełna charakterystyka enzymu wymaga określenia, czy reakcja enzymatyczna przebiega z retencją, czy z inwersją konfiguracji. O potrzebie prowadzenia tego typu badań świadczy m.in. fakt, że ostatnio opisano kolejną, nową metodę ustalania stereochemii działania enzymów nukleolitycznych,

które wystarczających do przeprowadzenia końcowej analizy (MIZUUCHI 1999). Ustalenie stereochemii działania jakiegokolwiek enzymu, który katalizuje przeniesienie grupy fosforylowej lub nukleotydydowej, wymaga substratu o znanej konfiguracji absolutnej na chiralnym atomie fosforu. Może to być tiofosforanowy analog naturalnego substratu, pod warunkiem, że enzym wykazuje aktywność katalityczną wobec takiego substratu, a eksperyment jest prowadzony w obecności wody znakowanej izotopem tlenu ^{17}O lub ^{18}O . Jeśli jednak enzym nie akceptuje tiofosforanowych analogów substratu, konieczne jest zastosowanie substratów zawierających izotopy tlenu ^{18}O lub ^{17}O ustalonych konfiguracji atomu fosforu.

Należy jednak zauważyć, że jakkolwiek ustalenie stereochemicznego wyniku reakcji enzymatycznej pozwala określić w ogólnych zarysach mechanizm reakcji, to jednak nie daje żadnych podstaw do zidentyfikowania reszt aminokwasowych działających jako nukleofil,

ogólny kwas czy ogólna zasada. W tym celu konieczne jest przeprowadzenie analizy rentgenostrukturalnej białka, a najlepiej kompleksu enzym-substrat. Bardzo pomocna dla identyfikacji tych aminokwasów bywa także ukierunkowana mutagenesa i badanie właściwości uzyskanych mutantów. Obecnie coraz większego znaczenia nabiera także technika wysokorozdzielczego magnetycznego rezonansu jądrowego.

Nawet pobieżna analiza Tabeli 3 skłania do postawienia pytania, dlaczego enzymy katalizujące przemiany mononukleotydów oraz kwasów nukleinowych działają według różnych mechanizmów? Co sprawiło, że w procesie ewolucji pojawiły się enzymy, które działają z retencją

Tabela 3. Stereochemia enzymatycznego przeniesienia funkcji fosforylowej lub nukleotydylowej (FREY 1992; STRATER i współaut. 1996)

Enzym	Stereochemiczny wynik reakcji
Fosfatazy	Retencja
Fosfodiesterazy: nukleaza P1, nukleaza S1 fosfodiesteraza z jadu węża fosfodiesteraza ze śledziony	Inwersja Retencja Retencja
Fosfolipaza C	Inwersja
Fosfotriesteraza	Inwersja
polimerazy DNA i RNA (w tym TdT i RT)	Inwersja
Ligazy DNA i RNA, topoizomerazy	Retencja
Kinazy ale: kinaza ADP→ATP	Inwersja Retencja
Pirofosforylasy, np. pirofosforylaza UDP-glukozy ale: urydylotransferaza galaktozo- 1-fosforanu	Inwersja Retencja
Cyklazy	Inwersja
syntetazy amino-acylo tRNA	Inwersja
białko fhit	Retencja

konfiguracji na atomie fosforu, skoro wydaje się, że ten mechanizm jest bardziej skomplikowany niż mechanizm bezpośredniego przeniesienia grupy fosforylowej lub nukleotydylowej z cząsteczki donora na akceptor (STRATER i

współaut. 1996, FREY 1992)? Perry FREY porównał mechanizmy działania kilku nukleotydylotransferaz i przedstawił hipotezę, według której dwuetapowy mechanizm prowadzący do retencji konfiguracji na atomie fosforu jest ewolucyjnie rozwiązaniem prostszym, niż mechanizm prowadzący do inwersji konfiguracji (FREY 1989). Dzięki możliwości kowalencyjnego związania grupy fosforylowej lub nukleotydylowej w centrum aktywnym enzymu, jej donor i akceptor mogą zajmować to samo miejsce wiążące, oczywiście pod warunkiem, że mają podobną strukturę. Kolejność zdarzeń jest następująca: enzym wiąże w sposób niekowalencyjny cząsteczkę substratu, następnie powstaje kowalencyjny produkt pośredni i zostaje uwolniony do otoczenia donor grupy fosforylowej lub nukleotydylowej. Jego miejsce w centrum wiążącym zajmuje cząsteczka akceptora grupy nukleotydylowej lub fosforylowej, następuje atak drugiego nukleofila, hydroliza kompleksu enzym-substrat, związanie grupy fosforylowej lub nukleotydylowej z akceptorem, i ostatecznie, uwolnienie enzymu oraz końcowego produktu.

W przypadku reakcji przebiegających z inwersją konfiguracji na atomie fosforu, donor i akceptor grupy fosforylowej lub nukleotydylowej muszą się znaleźć w centrum aktywnym w tym samym czasie, a więc musi ono charakteryzować się odpowiednią strukturą, na ogół bardziej skomplikowaną niż struktura centrum aktywnego enzymów działających z retencją konfiguracji na atomie fosforu. Takie rozwiązanie jest uzasadnione, a nawet konieczne wówczas, gdy donor i akceptor grupy fosforylowej lub nukleotydylowej wykazują znaczne różnice strukturalne. Istnieje opinia, iż według tego mechanizmu działają raczej nukleazy niż nukleotydylotransferazy, ponieważ w przypadku reakcji hydrolizy katalizowanych przez nukleazy donor i akceptor grupy fosforylowej lub nukleotydylowej nie wykazują zwykle podobieństwa strukturalnego (akceptorem jest zazwyczaj cząsteczka wody). Fakt, iż fosfodiesteraza z jadu węża działa z retencją konfiguracji może oznaczać, że w warunkach *in vivo* enzym ten działa jako nukleotydylotransferaza, a nie jako hydrolaza (GERLT 1993).

DWUWARTOŚCIOWE JONY METALI A MECHANIZMY DZIAŁANIA NUKLEAZ I POLIMERAZ

Nie ma chyba podręcznika biochemii lub chemii bioorganicznej, który nie zawierałby opisu mechanizmu działania rybonukleazy A (STRYER 1999). Enzymatyczne reakcje nukleofilowego podstawienia na atomie fosforu wymagają utworzenia aktywnego nukleofila, stabili-

zacji pentakoordynacyjnego stanu przejściowego poprzez zneutralizowanie jego ładunku ujemnego oraz odejścia grupy opuszczającej. Warunkiem katalizy enzymatycznej jest udział elementów struktury białka w tych trzech procesach. Badania strukturalne, w których zastoso-

wano zarówno natywny enzym, jak i jego mutanty wykazały, że aktywność enzymatyczna rybonukleazy A jest zdeterminowana przez kilka reszt aminokwasowych, spośród których His-12 działa jako ogólna zasada i ułatwia nukleofilowy atak grupy 2'-hydroksylowej na atom fosforu wiązania internukleotydu, His-119 działa jako ogólny kwas i ułatwia odejście grupy opuszczającej, natomiast Lys-41 oraz Phe-120 stabilizują pentakoordynacyjny stan przejściowy, ponieważ neutralizują jego ładunek ujemny. Aktywność rybonukleazy A nie zależy od obecności w środowisku reakcji jonów metali dwuwartościowych. Odnotowano jednakże, że w przypadku niektórych enzymów jony metali wspomagają działanie aminokwasów, biorąc udział w którymś z wymienionych wyżej procesów (np. nukleaza ze *Staphylococcus aureus*).

Wiadomo także, iż w przypadku wielu nukleaz i polimeraz za ich aktywność katalityczną odpowiadają wyłącznie jony dwuwartościowych metali, najczęściej jony magnezu i cynku (COWAN 1998). Aminokwasy zaangażowane w strukturę centrum aktywnego tych enzymów są odpowiedzialne za właściwą lokalizację jonów metali i określoną architekturę każdego centrum aktywnego, ale nie zawsze bezpośrednio uczestniczą w reakcjach katalizowanych przez te enzymy. Ma to miejsce między innymi w przypadku 3'-5'-egzonukleazy polimerazy I DNA z *Escherichia coli*, który to enzym był przez blisko 10 lat przedmiotem intensywnych badań grupy Toma Steitza (BRAUTIGAM i STEITZ 1998). Centrum aktywne tego enzymu stanowią grupy karboksylowe trzech reszt asparagianu oraz glutaminian (Ryc. 2). Podobny motyw strukturalny,

zwany triadą aminokwasów karboksylowych, występuje także w centrach aktywnych kilku innych polimeraz: odwrotnej transkryptazy wirusa HIV, eukariotycznej polimerazy β oraz polimerazy RNA bakteriofaga T4. W centrum aktywnym 3'-5'-egzonukleazy reszty Asp-355, Glu-357 oraz Asp-501 wiążą jon cynku w tak zwanym miejscu A, natomiast reszta Asp-424 uczestniczy w wiązaniu jonu magnezu w tak zwanym miejscu B. Jon cynku zapewnia odpowiednie położenie substratu i stabilizuje jon hydroksylowy, który działa jako nukleofil. Atak nukleofila generuje stan przejściowy o strukturze bipiramidy trygonalnej, który jest stabilizowany przez obydwa jony metali. Ponadto drugi jon metalu, oddziałujący z 3'-atorem tlenu grupy opuszczającej, przyspiesza jej odejście i w ten sposób katalizuje degradację wiązania internukleotydu. Istotna wydaje się obserwacja, iż odległość między jonami metali znajdującymi się w miejscach A i B wynosi około 4 Å. Jest ona zdeterminowana położeniem aminokwasów karboksylowych, tworzących centrum aktywne enzymu. Na podstawie analizy rentgenostrukturalnej wiadomo, że centra aktywne wielu nukleaz i fosfataz zawierają dwa jony metalu oddalone od siebie o 4 Å. Można więc przypuszczać, iż enzymy te działają według podobnego mechanizmu (BRAUTIGAM i STEITZ 1998). Mechanizm zaproponowany przez STEITZA dla 3'-5'-egzonukleazy wydaje się wspólny dla tak zwanych egzonukleolitycznych domen występujących w polimerazach i odpowiedzialnych za kontrolę prawidłowości odczytu przez polimerazę informacji zawartej na matrycy DNA.

MOLEKULARNE PODSTAWY ZJAWISKA DIASTEREOSELEKTYWNOŚCI NUKLEAZ WOBEC TIOFOSFORANOWYCH ANALOGÓW OLIGONUKLEOTYDÓW

Grupa Steitza nie poprzestała na analizie rentgenostrukturalnej 3'-5'-egzonukleazy polimerazy I oraz kompleksu enzym-dTMP. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że 3'-5'-egzonukleaza jest enzymem Rp-selektywnym, który hydrolizuje tiofosforanowe wiązanie internukleotydu o konfiguracji Rp z taką samą prędkością jak wiązanie niemodyfikowane, natomiast wiązanie o konfiguracji Sp pozostaje odporne na działanie tego enzymu. Można więc było oczekiwać, iż analiza rentgenostrukturalna kompleksu enzym-substrat, gdzie substrat będzie oligonukleotydem zawierającym pojedyncze tiofosforanowe wiązanie internukleotydu o znanej konfiguracji na atomie fosforu, pozwoli wyjaśnić przyczyny diastereo-selektywności enzymu. Do badań użyto izo-

mery Rp i Sp tetranukleotydu d[TTTT_{P(S)}T]. Okazało się, że atom siarki w cząsteczce izomeru Sp tego tetrameru jest przyczyną zawady przestrzennej, która uniemożliwia odpowiednią lokalizację jonów cynku i magnezu we wspomnianych wcześniej miejscach A i B centrum aktywnego 3'-5'-egzonukleazy (BRAUTIGAM i STEITZ 1998). Niewielka różnica długości promieni Van der Waalsa (1.44 Å dla tlenu i 1.85 Å dla siarki) oraz nieznaczne wydłużenie wiązania P-S w stosunku do wiązania P-O są jednak wystarczająco duże, aby zaburzyć niezwykle precyzyjny układ, jaki jest konieczny dla dokonania aktu hydrolizy wiązania internukleotydu. Zarówno badania prowadzone przez grupę Steitza nad diastereo-selektywnością 3'-5'-egzonukleazy, jak i podobne badania nad nukleazą P1

(ROMIER i współaut. 1998) sugerują, że o Rp- lub Sp-selektywności nukleaz jak również polimeraz decyduje architektura centrum aktywnego (niezależnie od tego, czy za katalizę enzymatyczną są odpowiedzialne jony metali, czy reszty aminokwasowe).

Mechanizm zaproponowany przez Steitza, znany także jako mechanizm zależny od dwóch jonów metalu (ang. two-metal ion mechanism) nie jest uniwersalny dla wszystkich enzymów nukleolitycznych. Ostatnio dla restrykcyjnej endonukleazy Eco RV zaproponowano mechanizm zależny od trzech jonów metalu (Ryc. 3) (HORTON i współaut. 1998). Istnieją podstawy aby przypuszczać, że według tego mechanizmu działają także inne enzymy restrykcyjne typu II.

Nie umniejszając roli badań strukturalnych w poznaniu mechanizmu działania endonukleaz Eco RI oraz Eco RV należy podkreślić, iż wiele danych dotyczących aktywności i specyficzności działania tych enzymów uzyskano stosując tiofosforanowe analogi oligonukleotydów. Oligonukleotydy zawierające pojedyncze tiofosforanowe wiązanie internukleotydydowe w miejscu działania enzymu (tj. pomiędzy dG i dA w sekwencji kanonicznej Eco RI oraz pomiędzy T i dA w sekwencji kanonicznej Eco RV) pozwoliły ustalić, że oba enzymy są aktywne w stosunku do izomerów Rp tak zmodyfikowanych tiofosforanowych substratów (są więc Rp-selektywne) i działają z inwersją konfiguracji (CONNOLLY i współaut 1984, GRASBY i CONNOLLY 1992). Podstawienie niemostrkowego atomu tlenu atomem siarki w innych wiązaniach internukleotydydowych znajdujących się w obrębie sekwencji kanonicznej, ale nie podlegających degradacji przyniosło zarówno w przypadku Eco RI jak i Eco RV ciekawe wyniki (STEC i współaut. 1984, THOROGOOD i współaut. 1996). Okazało się, że enzymy wykazują zróżnicowaną aktywność w stosunku do wiązania podlegającego degradacji, nawet jeśli nie jest ono zmodyfikowane, ale znajduje się sąsiedztwie wiązania internukleotydydowego zmodyfikowanego przez wprowadzenie atomu siarki. Efekt ten został określony jako „zdalnie sterowana” hydroliza wiązania internukleotydydowego (ang. remote control) (KOZIOLKIEWICZ i STEC 1992). Była to istotna obserwacja, ponieważ wcześniej postulowano, że decydujące znaczenie dla rozpoznawania substratu oraz aktywności katalitycznej enzymu ma sekwencja nukleozasad w obrębie sekwencji kanonicznej, natomiast rozpoznawanie wiązań internukleotydydowych ma drugorzędne znaczenie (ECKSTEIN 1986). Szczegółowe analizy procesów asocjacji i dysocjacji kompleksu enzym-substrat prowadzone w laboratorium Lindy

JEN-JACOBSON z wykorzystaniem diastereoizomerycznie czystych tiofosforanowych analogów oligonukleotydów zawierających sekwencję kanoniczną Eco RI potwierdziły, że wskazane fosforany ...pGAApTTC... są niezbędne w procesie rozpoznawania substratu przez enzym (LESSER i współaut. 1992, KURPIEWSKI i współaut. 1996).

Porównując wyniki analizy rentgenostrukturalnej białek Eco RI i Eco RV oraz wyniki degradacji tiofosforanowych substratów zidentyfikowano niektóre aminokwasy odpowiedzialne za kontakty z niemostrkowymi atomami tlenu wiązań internukleotydydowych. Ostatnio opublikowane dane wskazują, że w kontaktach enzymu z niemostrkowym atomem tlenu wiązania internukleotydydowego, które znajduje się w pozycji 3' w stosunku do wiązania podlegającego degradacji, uczestniczy jon dwuwartościowego metalu (Ryc. 3, jon metalu w miejscu A). Prawidłowe funkcjonowanie enzymu wymaga kontaktu tego jonu z atomem tlenu *pro-S*. W ten sposób możliwe jest generowanie anionu hydroksylogowego, który jako nukleofil atakuje atom fosforu sąsiedniego wiązania, to znaczy wiązania podlegającego degradacji. W stabilizowaniu jonu hydroksylogowego uczestniczy łańcuch boczny lizyny (Lys-92). Podstawienie atomu tlenu *pro-S* nieco większym atomem siarki i wydłużenie wiązania P-S w cząsteczkach izomerów Sp tiofosforanowych substratów dla Eco RI albo Eco RV zawierających, odpowiednio, fragment ...GAP(S)ATTC... albo fragment ...GATAP(S)TC... prowadzi do znacznego (przynajmniej 200-krotnego) obniżenia aktywności katalitycznej obu enzymów wobec tak zmodyfikowanych substratów. Natomiast podstawienie siarką atomu tlenu *pro-R* zasadniczo nie zmienia aktywności Eco RI lub Eco RV wobec izomerów Rp odpowiednich oligonukleotydów tiofosforanowych, ponieważ kontakt atomu tlenu *pro-S* z jodem metalu i generowanie nukleofila nie ulega z powodu tej modyfikacji zaburzeniom. Kolejny jon metalu (Ryc. 3, miejsce C) znajduje się sąsiedztwie hydrolizowanego wiązania internukleotydydowego i stabilizuje pentakoordynacyjny stan przejściowy oraz przyspiesza odejście grupy opuszczającej. Jon metalu w miejscu B pełni natomiast funkcję strukturalną, tzn. determinuje odpowiednią przestrzenną lokalizację asparagianu Asp-74, który koordynuje jony metali w miejscach A i C pełniące funkcję katalityczną (HORTON i współaut. 1998).

Mechanizm, według którego działają endonukleazy Eco RI i Eco RV, oraz prawdopodobnie inne enzymy restrykcyjne, jest równie precyzyjny jak wcześniej zaproponowany przez STEITZA mechanizm zależny od dwóch jonów metali.

Wymaga ściśle określonej architektury centrum aktywnego enzymu i nawet tak niewielka zmiana, jaką wydaje się być podstawienie atomem siarki niemostrkowego atomu tlenu w wiązaniu internukleotydowym, prowadzi do znacznego obniżenia aktywności enzymu (KOZIOLKIEWICZ i STEC 1992, LESSER i współaut. 1992, KURPIEWSKI i współaut. 1996).

Pomimo znacznego postępu, jaki osiągnięto w ostatnich latach w poznawaniu mechanizmów działania niektórych nukleaz, sposób rozpoznawania i hydrolizy substratu przez wiele innych enzymów należących do tej klasy pozostaje nadal nieznanym. Porównanie struktury centrum aktywnego sekwencjo-niespecyficznej bakteryjnej nukleazy z *Serratia marcescens* oraz wysoce sekwencjo-specyficznej endonukleazy *I-PpoI* doprowadziło kilka zespołów badawczych zajmujących się tymi enzymami do konkluzji, że istnieje między tymi enzymami istotne podobieństwo strukturalne, które z kolei determinuje taki sam mechanizm działania, różny jednak od mechanizmów działania opisanych dla 3'-5'-egzonukleazy polimerazy I oraz enzymów restrykcyjnych (FRIEDHOFF i współaut. 1999). Endonukleaza *I-PpoI* należy do nukleaz kodowanych przez sekwencje intronowe i odpowiedzialnych za przenoszenie tychże sekwencji (czyli własnych genów) do alleli, które są tych genów pozbawione. Enzymy te wykazują znacznie wyższą specyficzność w rozpoznawaniu sekwencji nukleotydowej substratu niż enzymy restrykcyjne, ponieważ przecinają obie nici DNA po rozpoznaniu specyficznej sekwencji nukleotydowej, liczącej od 14 do 44 nukleotydów. Podobnie jak endonukleaza z *Serratia marcescens*, nukleazy kodowane przez introny są metaloenzymami zależnymi od jonów Mg^{2+} (Ryc. 4). Fakt, że enzymy o tak różnej specyficzności substratowej funkcjonują według tego samego mechanizmu jest zaskakujący i wymaga dalszych badań. Powstaje pytanie, co determinuje tak wysoką specyficzność sekwencyjną rozpoznawania substratu przez endonukleazy kodowane przez introny? Należy bowiem przypuszczać, iż mechanizm odpowiedzialny za generowanie aktywnego nukleofila, stabilizowanie stanu przejściowego i odejście uwalnianej grupy nie odgrywa decydującej roli. Kilka lat temu ustalono, że endonukleaza z *S. marcescens* jest Rp-selektywna w stosunku do tiofosforanowych analogów oligonukleotydów (STEC i współaut. 1995, FRIEDHOFF i współaut. 1996, KOZIOLKIEWICZ i współaut. 1999). Izomer Sp z atomem siarki podstawionym w miejsce atomu tlenu *pro-S* nie podlega hydrolizie, ponieważ jon magnezu odpowiedzialny za katalizę enzymatyczną

wymaga w pozycji *pro-S* tlenu, a obecność siarki wywołuje istotne zmiany w architekturze centrum aktywnego. Diastereoselektywności endonukleaz kodowanych przez introny dotychczas nie zbadano, ale na podstawie wspomnianych wyżej podobieństw strukturalnych i mechanistycznych należy sądzić, że podobnie jak endonukleaza z *Serratia marcescens* są one Rp-diastereoselektywne.

Obok oligonukleotydów zawierających pojedyncze tiofosforanowe wiązanie internukleotydowe, w przedstawianych badaniach enzymatycznych wykorzystuje się także oligonukleotydy zawierające atom siarki w każdym wiązaniu internukleotydowym [PS-oligonukleotydy albo oligo(nukleozydo)tiofosforany]. Biorąc pod uwagę, że pojedyncze wiązanie tiofosforanowe obniża szybkość działania enzymu można by sądzić, iż oligonukleotydy modyfikowane w każdym wiązaniu internukleotydowym w ogóle nie podlegają działaniu nukleaz. Tak jednak nie jest: PS-oligonukleotydy podlegają degradacji przez nukleazy, szczególnie jeśli modelowe substraty mają charakter stereoregularny, tzn. zawierają wiązania internukleotydowe o konfiguracji wyłącznie Rp albo Sp (STEC i WILK 1994; STEC i współaut. 1995, 1998). Tego typu oligonukleotydy wykorzystuje się w badaniach nad Rp- i Sp-selektywnymi nukleazami, które nie wykazują wyraźnej specyficzności substratowej, ale wymagają jako substratów dłuższych oligonukleotydów. Fakt, iż wszystkie wiązania internukleotydowe modelowych substratów są modyfikowane przez podstawienie atomów tlenu siarką pozwala uniknąć tak zwanego „efektu przeskakiwania”, kiedy to endo- a nawet egzonukleazy omijają modyfikowane wiązania i degradują sąsiadujące z nimi niezmodyfikowane wiązania internukleotydowe.

Podczas gdy oligonukleotydy zawierające atomy siarki w pozycjach niemostrkowych wykorzystywane są w badaniach enzymatycznych już od trzydziestu lat, w ostatniej dekadzie coraz większe zastosowanie znajdują oligonukleotydy zawierające atomy siarki w tak zwanych pozycjach mostkowych (Ryc. 1). Są one wykorzystywane w badaniach nad mechanizmami działania białkowych enzymów nukleolitycznych oraz rybozymów. Często jony dwuwartościowych metali odpowiedzialne za katalizę enzymatyczną pozostają w kontakcie z atomami tlenu w pozycji 3' lub w pozycji 5', ułatwiając w ten sposób odejście grupy opuszczającej. W przypadku wielu nukleaz grupą opuszczającą jest grupa 3'-hydroksylowa, w przypadku rybozymów — jest to grupa 5'-hydroksylowa rybozy. Zastosowanie tiofosforanowych oligonukleoty-

dów zawierających atom siarki w pozycjach molekularnych pozwala udowodnić udział jonów metalu w odejściu grupy opuszczającej, a tym

samym w sposób szczegółowy wyjaśnić rolę dwuwartościowych jonów metali.

PODSUMOWANIE

Zamierzeniem autorów niniejszego eseju jest utrwalenie tezy, że badanie Natury jest przedsięwzięciem ponaddiscyplinowym, a postęp odnotowuje się przy harmonijnym rozwoju i współdziałaniu wszystkich dziedzin nauki. Narodzinom Biologii Molekularnej towarzyszyły postępy w obszarze chemii i biofizyki, które aktualnie zmierzają do utworzenia domeny zwanej Biologią Strukturalną. W jej rozwoju istotną rolę będą nadal odgrywali chemicy, którzy nie tylko udoskonalają metody wytwarzania kolejnych narzędzi do badania procesów zachodzących w żywych organizmach, ale coraz częściej podejmują próby wyjaśnienia zjawisk na poziomie supramolekularnym, wskazując iż oddziaływania cząsteczek organizują uzyskiwaną

materię nadając jej nowe właściwości. I jakkolwiek celem naszym było uwypuklenie znaczenia syntezy organicznej demonstrowanego odkryciem wydajnej i szybkiej syntezy oligonukleotydów oraz ich analogów, niedocenień funkcji innych dyscyplin, takich jak współczesna skomputeryzowana analityka oraz bioinformatyka, byłoby niewybaczalnym uproszczeniem i aktem megalomanii. Należy także dostrzec, iż Natura uczy nas pokory. Tak, wkrótce wspólny wysiłek olbrzymich zespołów badawczych doprowadzi do pełnego poznania sekwencji nukleotydów ludzkiego genomu. Ale czy naprawdę już wiemy, jak skorzystać z tej informacji? Nauka jest, rzeczywiście, horyzontem bez końca, i to w wymiarze ponadpokoleniowym.

LITERATURA

- AGRAWAL S., KANDIMALLA E. R., 2000. *Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition?* Mol. Medicine Today 6, 72–81.
- BRAUTIGAM CH. A., STEITZ T. A., 1998. *Structural principles for the inhibition of the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase by phosphorothioates.* J. Mol. Biol. 277, 363–377.
- CARUTHERS M. H., 1985. *Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses.* Science 230, 281–285.
- CONNOLLY B. A., ECKSTEIN F., PINGOUD A., 1984. *The stereochemical course of the restriction endonuclease Eco RI-catalyzed reaction.* J. Biol. Chem. 259, 10760–10763.
- COWAN J., 1998. *Metal activation of enzymes in nucleic acid biochemistry.* Chem. Rev. 98, 1067–1087.
- ECKSTEIN F., 1985. *Nucleoside phosphorothioates.* Ann. Rev. Biochem. 54: 367–372.
- ECKSTEIN F., 1986. *Action of restriction endonuclease on phosphorothioate DNA.* Biochem. Soc. Trans. 1986, 204–205.
- FREY P. A., 1989. *Chiral phosphorothioates: stereochemical analysis of enzymatic substitution at phosphorus.* Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 62, 119–201.
- FREY P. A., 1992. *Nucleosidyltransferases and phosphotransferases.* [W:] *The Enzymes*, t. XX str. 141–186.
- FRIEDHOFF P., FRANKE I., KRAUSE K., PINGOUD A., 1999. *Cleavage experiments with deoxythymidine 3',5'-bis-(p-nitrophenyl phosphate) suggest that the homing endonuclease I-PpoI follows the same mechanism of phosphodiester bond hydrolysis as the non-specific Serratia nuclease.* FEBS Letters 443, 209–214.
- FRIEDHOFF P., MEISS G., KOLMES B., PIEPER U., GIMADUTDINOV O., URBANKE C., PINGOUD A., 1996. *Kinetic analysis of the cleavage of natural and synthetic substrates by the Serratia nuclease.* Eur. J. Biochem. 241, 572–58.
- GERLT J. A., 1993. *Mechanistic principles of enzyme-catalyzed cleavage of phosphodiester bonds.* Nucleases, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- GRASBY J. A., CONNOLLY B. A., 1992. *Stereochemical outcome of the hydrolysis reaction catalyzed by the Eco RV restriction endonuclease.* Biochemistry 31, 7855–7861.
- GRIFFITS A. D., POTTER B. V. L., EPERON J. C., 1987. *Stereospecificity of nucleases towards phosphorothioate-substituted RNA: stereochemistry of transcription by T7 RNA polymerase.* Nucleic Acids Res. 15, 4145–4162.
- HONDAL R. J., RIDDLE S. R., KRAVCHUK A. V., ZHAO Z., LIAO H., BRUZIK K. S., TSAI M. D., 1997. *Phosphatidylinositol-specific phospholipase C: kinetic and stereochemical evidence for an interaction between arginine-69 and the phosphate group of phosphatidylinositol.* Biochemistry 36, 6633–6642.
- HORTON N. C., NEWBERRY K. J., PERONA J. J., 1998. *Metal ion-mediated substrate-assisted catalysis in type II restriction endonucleases.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13489–13494.
- KORNBERG A., 1987. *The two cultures: chemistry and biology.* Biochemistry 26, 6888–6891.
- KOZIOLKIEWICZ M., OWCZAREK A., GENDASZEWSKA E., 1999. *Enzymatic assignment of diastereomeric purity of stereodefined phosphorothioate oligonucleotides.* Antisense & Nucleic Acids Drug Dev. 9, 171–181.
- KOZIOLKIEWICZ M., STEC W. J., 1992. *The application of phosphate-backbone modified oligonucleotides in the studies on Eco RI endonuclease mechanism of action.* Biochemistry 31, 9460–9466.
- KOZIOLKIEWICZ M., WÓJCIK M., KOBYLAŃSKA A., KARWOWSKI B., REBOWSKA B., GUGA P., STEC W. J., 1997. *Stability of stereoregular oligo(nucleoside phosphorothioate)s in human plasma: diastereoselectivity of plasma 3'-exonuclease.* Antisense & Nucleic Acids Drug Dev. 7, 43–48.
- KURPIEWSKI M., KOZIOLKIEWICZ M., WILK A., STEC W. J., JEN-JACOBSON L., 1996. *Chiral phosphorothioates as probes of protein interactions with individual DNA phosphoryl oxygens: Essential interactions of Eco RI endonuclease with the phosphate at pGAATTC.* Biochemistry 35, 8846–8854.
- LESSER D. R., GRAJKOWSKI A., KURPIEWSKI M., KOZIOLKIEWICZ M., STEC W. J., JEN-JACOBSON L., 1992. *Stereoselective interaction with chiral phosphorothioates at the central DNA kink of the Eco RI endonuclease-GAATTC complex.* J. Biol. Chem. 267, 24810–24818.

- MATSUKURA M., SHINOZUKA K., ZON G., MITSUYA H., REITZ M., COHEN J. S., BRODER S., 1987. Phosphorothioate analogs of oligodeoxyribonucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7706-7710.
- MIZUUCHI K., NOBBS T. J., HALFORD S. E., ADZUMA K., QIN J., 1999. A new method for determining the stereochemistry of DNA cleavage reactions: application to the *SfiI* and *HpaII* restriction endonucleases and to the MuA transposase. *Biochemistry* 38, 4640-4648.
- ROMIER CH., DOMINGUEZ R., LAHM A., DAHL O., SUCK D., 1998. Recognition of single-stranded DNA by nuclease P1: high resolution crystal structure of complexes with substrate analogs. *Proteins* 32, 414-424.
- SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B., ERLICH H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- SCOTT E. C., UHLENBECK O., 1999. A re-investigation of the thio effect at the hammerhead cleavage site. *Nucleic Acids Res.* 27, 479-484.
- SEEBACH D., 1990. Organic synthesis - where now? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 1320-1367.
- STEC W. J., GRAJKOWSKI A., KOBYLANSKA A., KARWOWSKI B., KOZIOLKIEWICZ M., MISIURA K., OKRUSZEK A., WILK A., GUGA P., BOCZKOWSKA M., 1995. Diastereomers of nucleoside 3'-O-(2-thio-1.3.2-oxathia(seleno)phospholanes. Building blocks for stereocontrolled synthesis of oligo(nucleoside phosphorothioate)s. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 12019-12029.
- STEC W. J., KARWOWSKI B., BOCZKOWSKA M., GUGA P., KOZIOLKIEWICZ M., SOCHACKI M., WIECZOREK M. W., BLASZCZYK J., 1998. Nucleoside 3'-O-(thio and 3'-O-(2-oxo-, "spiro"-4.4-pentamethylene-1.3.2-oxathiaphospholanes): monomers for stereocontrolled synthesis of oligo(nucleoside phosphorothioate)s and chimeric PS/PO oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 7156-7167.
- STEC W. J., WILK A., 1994. Stereocontrolled synthesis of oligo(nucleoside phosphorothioate)s. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 709-722.
- STEC W. J., ZON G., EGAN W., STEC B., 1984. Automated solid-phase synthesis, separation and stereochemistry of phosphorothioate analogues of oligodeoxyribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 6077-6080.
- STEIN C. A., KRIEG A., 1998. *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*. Wiley-Liss, Inc.
- STRATER N., LIPSCOMB W. N., KLABUNDE T., KREBS B., 1996. Two-metal ion catalysis in enzymatic acyl- and phosphoryl-transfer reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 2024-2055.
- STRYER L., 1999. *Biochemia*. PWN, Warszawa.
- THOROGOOD H., GRASBY J. A., CONNOLLY B. A., 1996. Influence of the phosphate backbone on the recognition and hydrolysis of DNA by the *EcoRV* restriction endonuclease. *J. Biol. Chem.* 271, 8855-8862.
- USHER D. A., ERENRICH E. S., ECKSTEIN F., 1972. Geometry of the first step in the action of ribonuclease A (in-line geometry - uridine 2',3'-cyclic thiophosphate ³¹P NMR). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 115-118.
- YOUNG K. J., GILL F., GRASBY J. A., 1997. Metal ions play a passive role in the hairpin ribozyme catalysed reaction. *Nucleic Acids Res.* 25 3760-3766.