

Nukleinsavak szintézise és alkalmazásai

(speciálkollégium vegyész és kémia szakos hallgatóknak)

Alkalmazások

Szintézisek

Analitika

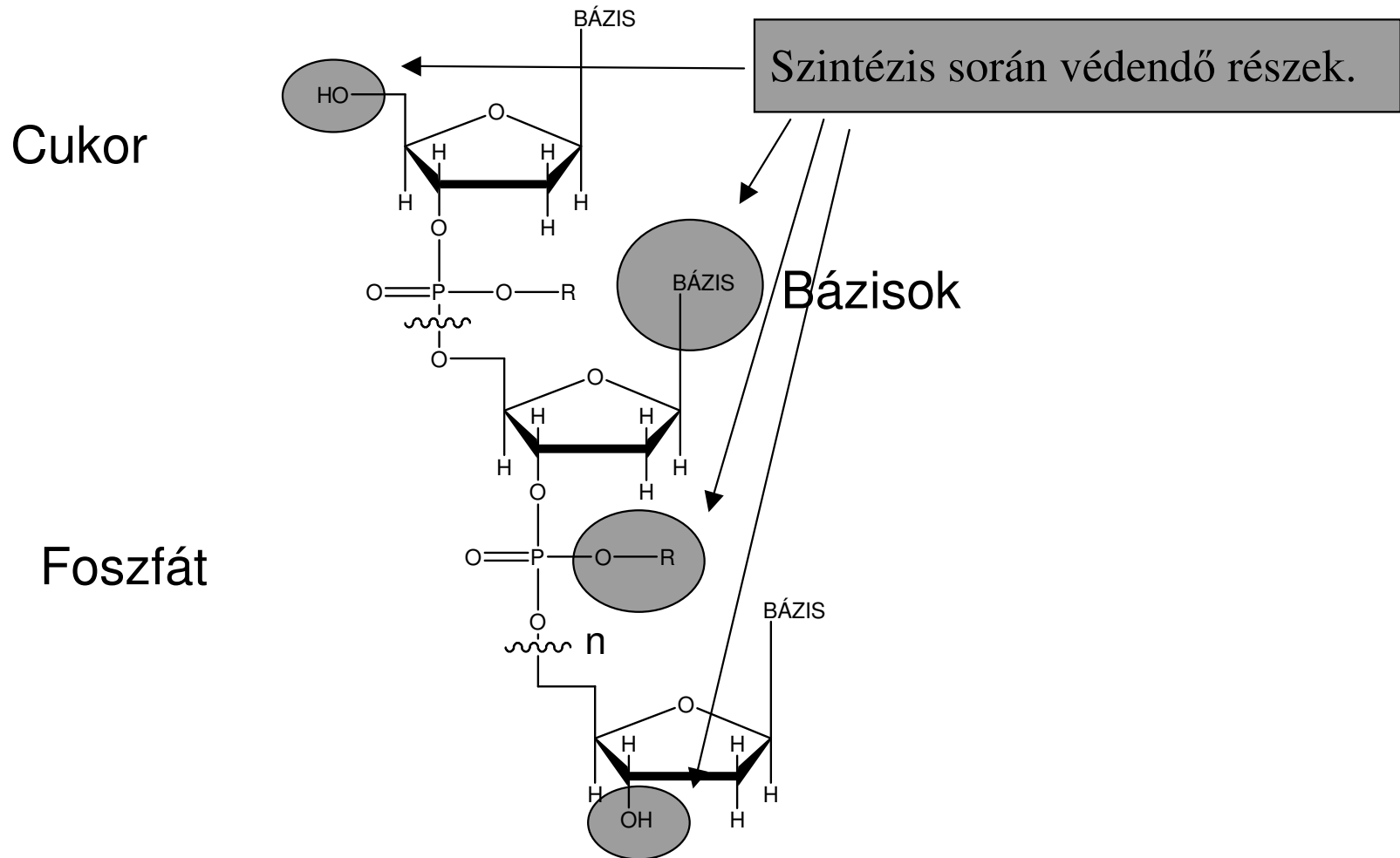
DNS szintézis

1. Történeti előzmények

1910-50		<i>A DNS kémiai szerkezetének felderítése</i>	
1943, '52	Avery, Hershey	<i>A DNS az örökítőanyag</i>	
1953	Watson és Crick	<i>A DNS kettős hélix szerkezete, genetikai kód, 'centrális dogma'</i>	
1961-68	Nirenberg, Matthaei Leder,	<i>A genetikai kódszótár megfejtés</i>	!!!

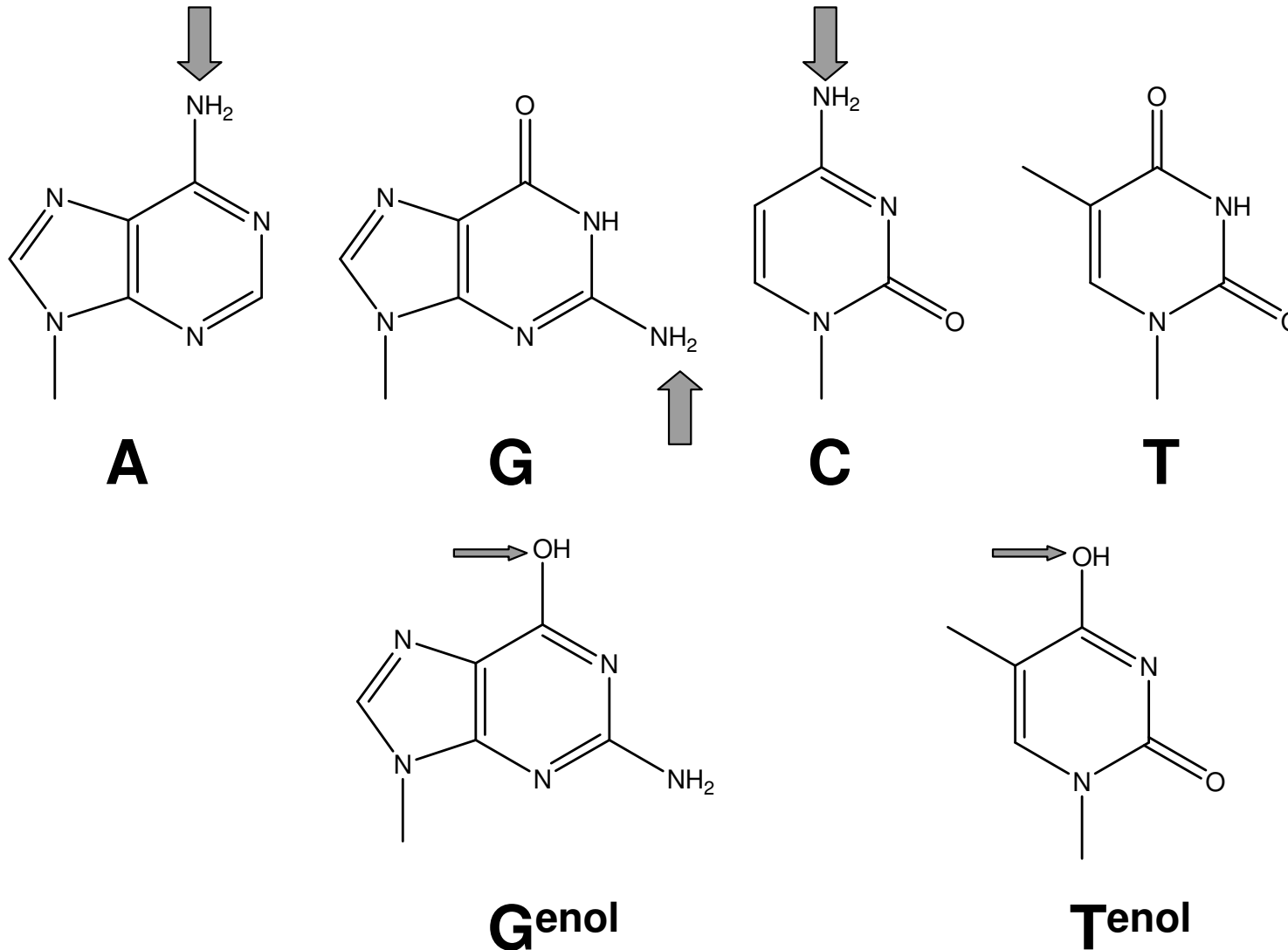
DNS szintézis

2.a Szerkezet szintetikus szempontból (a váz/gerinc)



DNS szintézis

2.b Szerkezet szintetikus szempontból (a bázisok)



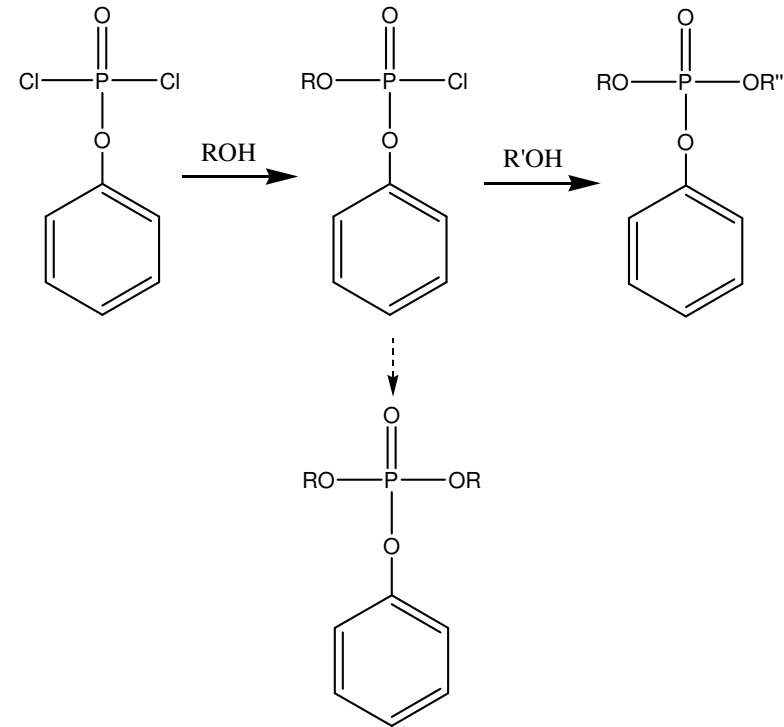
DNS szintézis

3. Legelső oldat fázisú szintézisek (Todd, G. Khorana és mtsai)

- A fő cél eleinte nem is nukleinsavak szintézise, hanem csak foszforiláció volt, mert nukleotid koenzimeket, kofaktorokat szerettek volna előállítani. (Pl. ADP, ATP, cAMP, lipid-foszforsavészterek) { trifoszfátok: Ludwig János }*
- Kémiai szintetikus módszerek hiányában már 1957-ben enzimatis úton szintetizáltak ribonukleinsavakat biológiai munkákhoz, de ezek elég kezdetleges és korlátozott módszerek voltak.*

DNS szintézis

3.a Foszforsavészterek előállítása

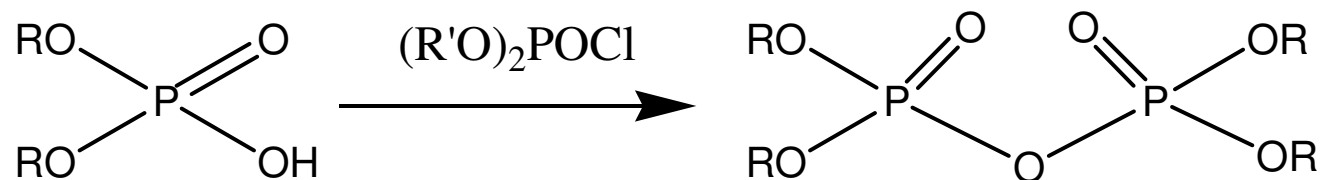
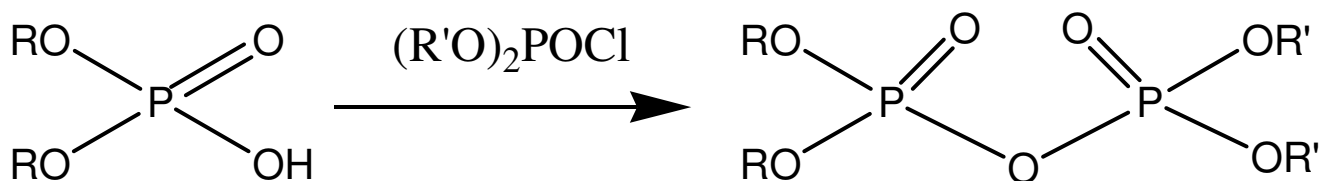


- kiindulási anyag: a foszforsav kloridjai, és vegyes észterei
- Fenilészterek könnyen elérhetőek voltak és könnyen eltávolíthatók a fenil csoportok a végén
- Sajnos a szimmetrikus vegyület melléktermék és az elválasztást meg kell oldani.
- Ha a két lépés különválasztható, akkor az oligomer szintézis is megoldható elvileg. Fontos, hogy itt még védve volt a foszforsav a fenillel a kapcsolások között, amit később benzilre cseréltek, mert az hidrogénezéssel eltávolítható volt így új lehetőségeket adott máshol más védőcsoportoknak.
- Később új utak, de fontos, hogy sok hasznos tapasztalat gyűlt össze a foszfor(V) és foszfor (III) vegyületekről, sok új védőcsoport és kapcsolószer, tisztítási módszer ekkor alakult ki.

DNS szintézis

3.a Foszforsavészterek előállítása (teljes védelemmel)

- Pirofoszfátképződés, mint mellékreakció, hidrolízisre érzékeny védett foszfátészterek.

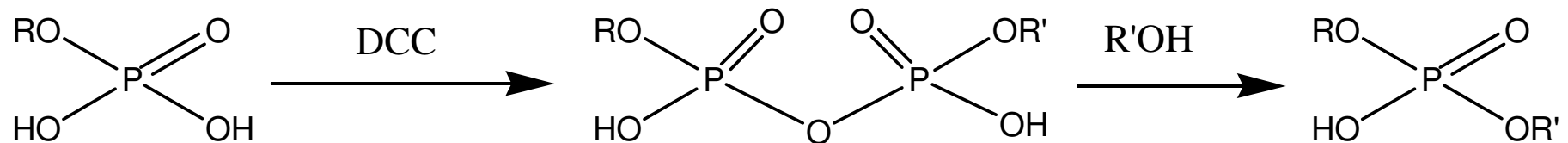
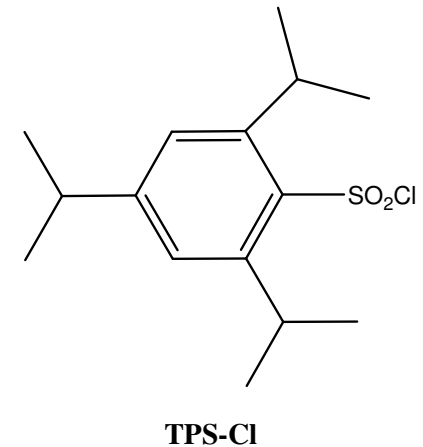


- Ez a mellékreakció felvetette, hogy esetleg nem kell teljesen védeni a foszfort vagy nagyon gyors és egyértelműen nem foszfort célba vevő védőcsoporteltávolításra van szükség.

DNS szintézis

3.b Foszforsavészterek előállítása (részleges védelemmel pirofoszfáton keresztül)

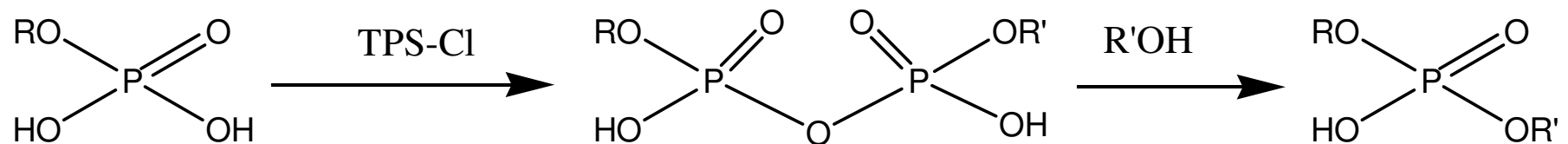
- A foszforsav erősebb nukleofil, mint az alkohol!
- Kapcsolószerek: DCC(általában hamarabb, mint a peptideknél), arilszulfonil-kloridok



DNS szintézis

3.c Nukleinsavak szintézise FOSZFODIÉSZTER módszerrel (Khorana) (szekvenciaspecifikus szintézis!!!)

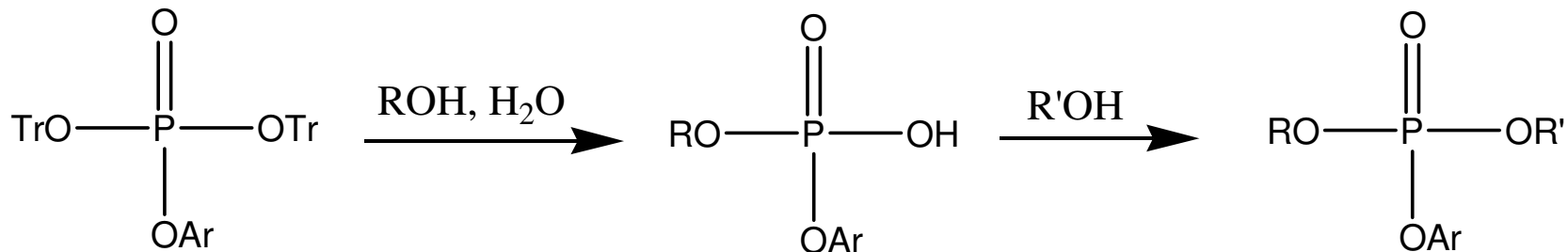
- Kapcsolószer DCC, majd a jobb TPS-Cl.
- Acil védőcsoportok a nukleobázisokon (A, G, C).
- DMTr átmeneti védőcsoport a cukor primer OH-ján.
- Fáradtságos szintézisek 2-3-4merekre. (Sok sok ember...), majd ezek összekapcsolása enzimatikusan → “genetikai kód”



DNS szintézis

3.c Nukleinsavak szintézise FOSZFOTRIÉSZTER módszerrel (Letsinger, Reese)

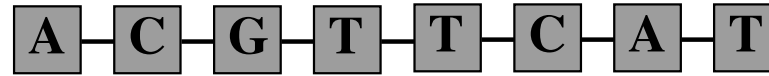
- Annyi különbség az előző módszerhez képest, hogy a foszfát védve van, ezért a végén szükséges egy védőcsoport hasítása. (Bázikus, ami eleinte 3% láncszakadáshoz vezetett.)
- Foszfát védőcsoportok: aril (2-klorofenil), illetve cianoetil
- gyorsabb kapcsolások és elfogadható szintézisek az optimalizációk után
- előnye a foszfor védőcsoportnak, hogy apolárosabb, könnyebben kezelhető átmeneti termékek



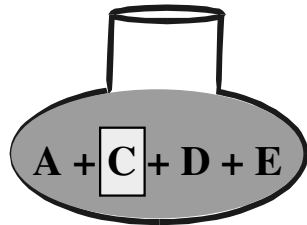
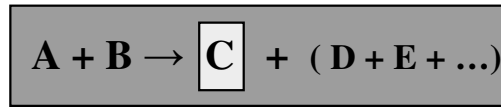
Ar = 2-klorofenil

Biopolimerek szintézise

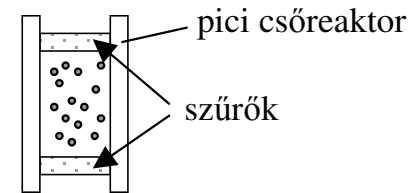
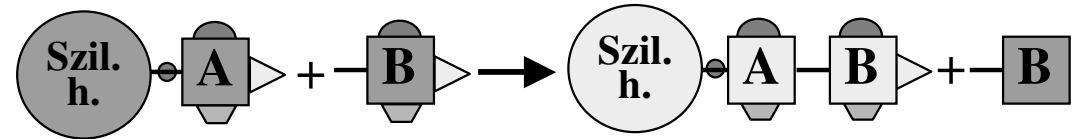
Célmolekula:



Oldat fázisú reakciók



Szilárd-fázisú megközelítés



Reaktorok

Méretek

mmol - mol (0,1-100g)

Tisztítás/lépés

óra – nap

Termelés/lépés

50-80%

nmol – mmol (µg-mg)

másodperc-perc (Mosás)

> 90 %

Lépésenkénti termelés	Termelés a teljes polimer szintézisére	
	20-mer	50-mer
80 %	1.4 %	0.002 %
90 %	14 %	0.6 %
98 %	68 %	37 %
99 %	83 %	61 %

DNS szintézis

3.d Szilárd fázisú szintézisek kezdete (1965, Letsinger)

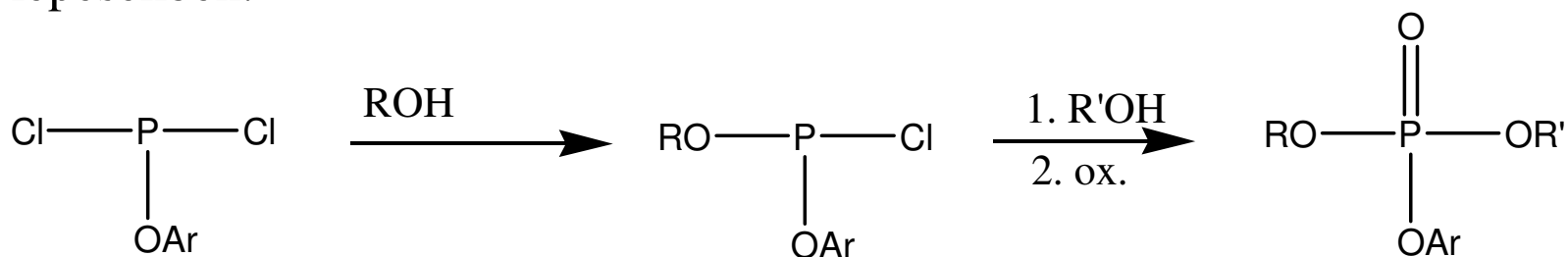
- Merrifield peptidszintézisének mintájára indult.
- Eleinte foszfodiészter kémiával, ami nem működött, ezért foszfortriészterre tértek át, amivel megjavultak a lépésenkénti kapcsolási hatékonyságok és a ciklusidő is lecsökkent. Több laborban megindult az automatizálása a szintézisnek (Gait, Itakura, Köster).
- HPLC tisztítási eljárások lettek kifejlesztve kifejezetten oligonukleotidokra.
- Innentől az oligonukleotidok már könnyebben elérhetőek voltak a biológiai alkalmazásokhoz primereknek, próbáknak, irányított mutagenézishez, génszintézishez, fehérje-nukleinsav kölcsönhatások vizsgálatához...

- blokkszintézisek kontra lépésenkénti szintézisek (egyszerűen 4 építőelem, mosások)
- ~95% kapcsolat elegendő volt, ezért dimer/trimer blokkok használata nem terjedt el.

DNS szintézis

3.e FOSZFIT-TRIÉSZTER módszer (Letsinger 1976.)

- korábban ismert tény volt, hogy a P(III) vegyületek jóval reakcióképesebbek, mint a P(V) (Pl. PCl_3 – POCl_3)
- Ezért a kapcsolási idő csökkentése és jobb hozam érdekében kezdte el használni a P(III) vegyületeket Letsinger 1976-ban. Ez egy módosított foszfotriészter módszer, ezért foszfit-triészternek tekinthető, ahol 2-klorofenil foszfodikloridit használtak két alkohollal egymás utáni lépésekben.



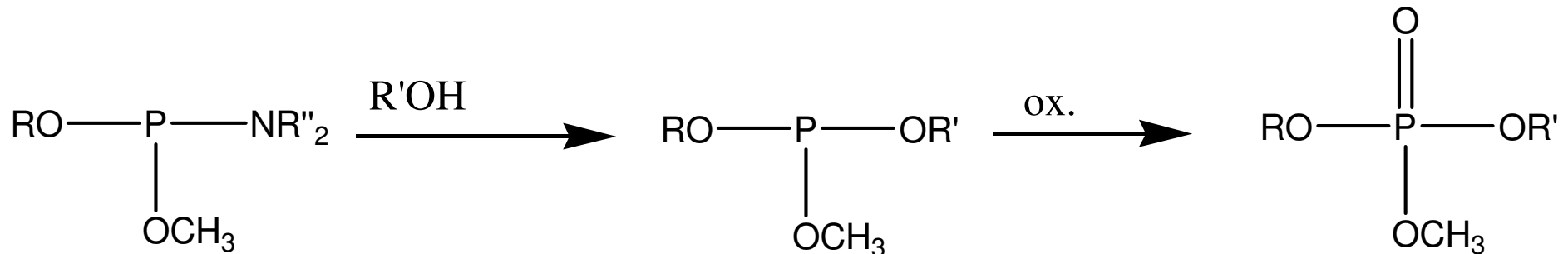
Ar = 2-klorofenil

- hátránya, hogy a foszforossavkloridok túl reaktívak, bomlékonyak, nehezen kezelhetők

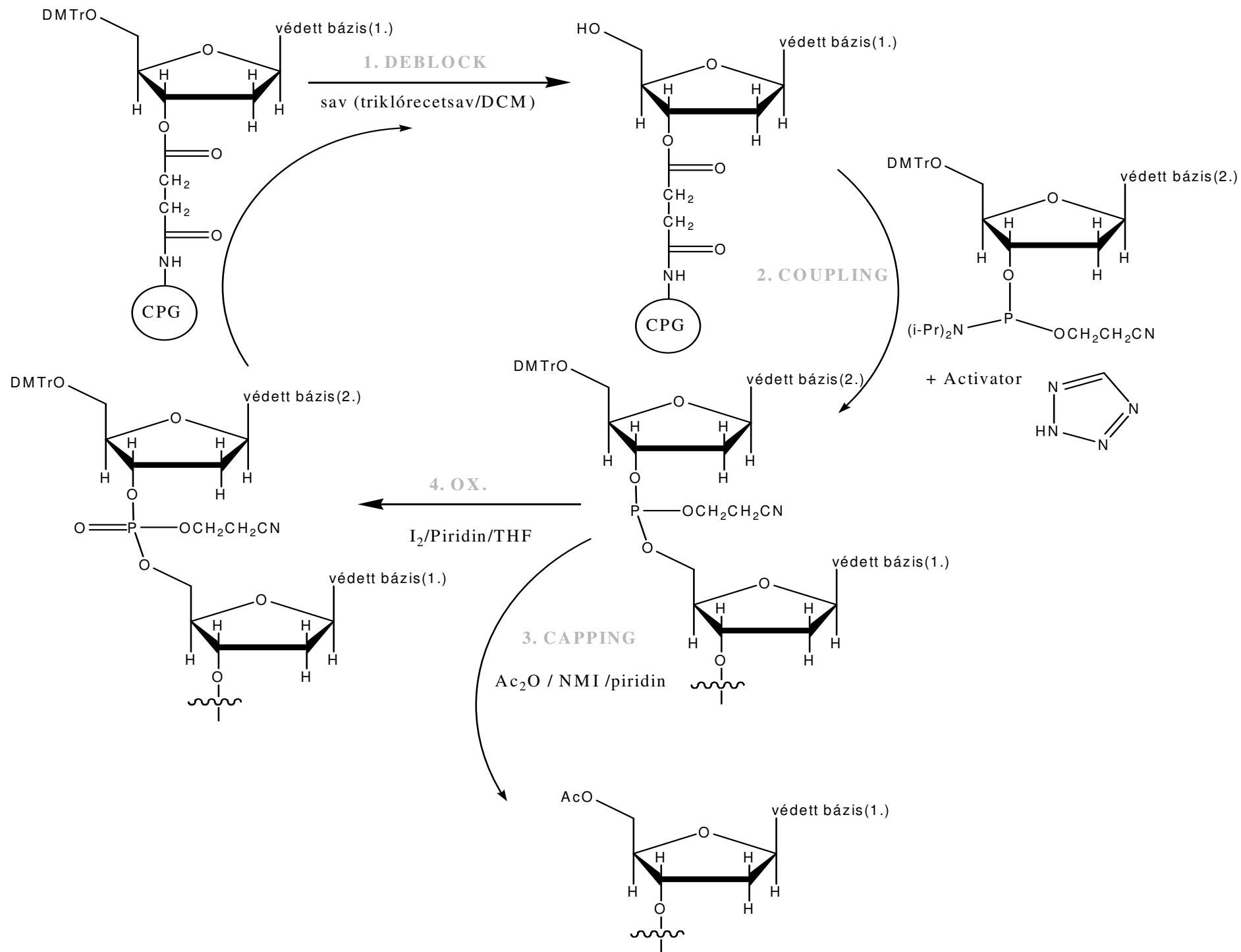
DNS szintézis

3.e FOSZFORAMIDIT módszer (Caruthers, Beaucage)

- Foszforamiditeket használtak, amik relatíve stabilak, de aktiválva igen jó hatékonyságú és gyors kapcsolásokat lehet velük elérni. (10-25sec, >99% hozam)
- aktivátor: tetrazol



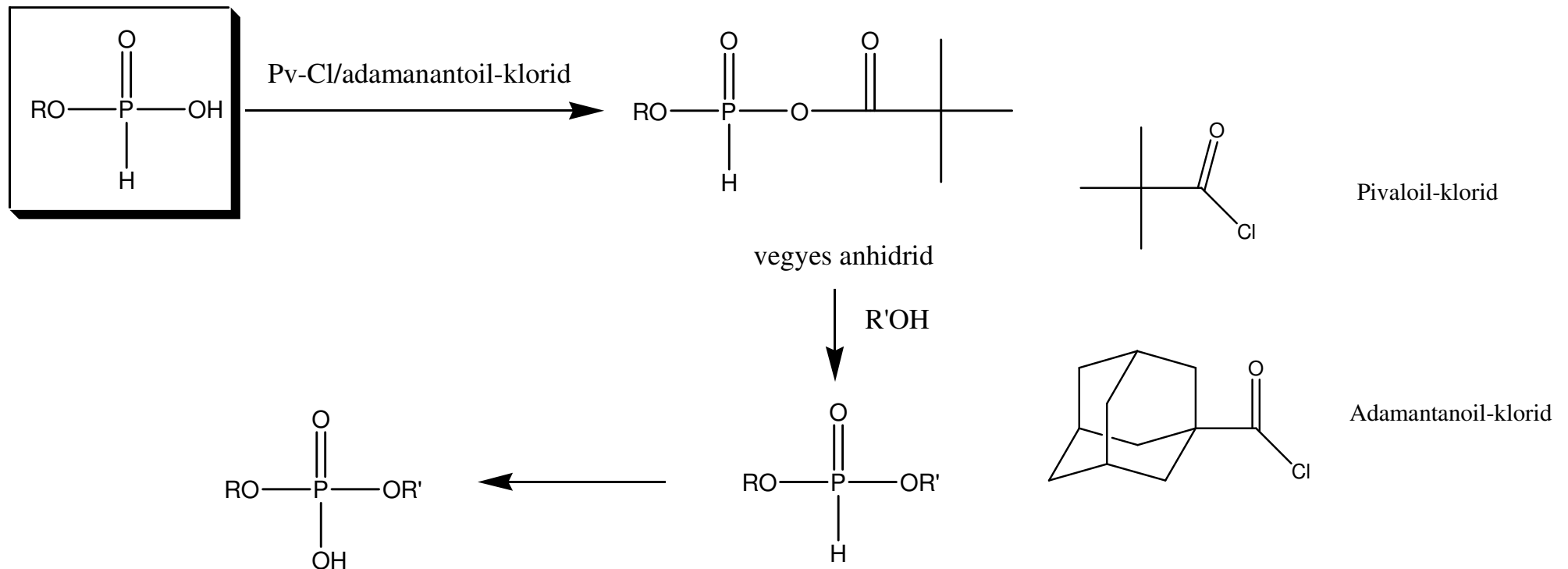
Későbbi fejlesztések: 2'-cianoetil a foszforon, diizopropilamidit, szilárd hordozó CPG a korábbi HPLC szilikagél helyett, capping, új aktivátorok, optimalizált automatizált szintézisek (szintetizátorok), foszforotioátok...



DNS szintézis

3.f H-FOSZFONÁT módszer (Froehler, Stawinski, Matteucci)

- H-foszfónatok, mint P(III) vegyületek szintén használhatók gyors és hatékony kapcsolásra a megfelelő aktiválószerrel. Sztérikusan gátolt savkloridok: pivaloil, adamantoil. Oxidáció itt lassúbb, ezért egyben a végén, mivel stabil az átmeneti foszfónát.
- Manapság nem olyan elterjedt, mert az amidit egyszerűbb és talán magasabbak a hozamok.
- Speciális célokra hasznos lehet, mert sok felé alakítható a H-foszfónát...



DNS szintézis

(jelenlegi problémák - további lehetőségek)

- Módosított DNS molekulák (biológiai alkalmazások)
 - LNA-PNA → ANA
 - konjugátumok, kapcsolóelemek (linkerek)
- DNS chipek szintézisének problémái (biológiai alkalmazások)
 - két-lépéses szintézis
 - teljesen új szintetikus módszerek
- Nagy skálájú szintézisek (gyógyászati alkalmazásokhoz)