

Termodynamiczne aspekty powstawania oligonukleotydowych struktur dwuniciowych i ich wpływ na selektywność hybrydyzacji w strategii antysensowej

Małgorzata Boczkowska

Piotr Guga

Centrum Badań Molekularnych

i Makromolekularnych PAN

Łódź

Podstawową właściwością oligonukleotydów, decydującą o ich wykorzystaniu w strategii antysensowej jest ich zdolność do specyficznego rozpoznawania komplementarnej sekwencji mRNA i asocjacji. Skuteczność rozpoznania określonej sekwencji oraz trwałość utworzonego kompleksu mają w tym procesie zasadnicze znaczenie. Ocena stabilności kompleksu, jaki powstanie w wyniku oddziaływania danego oligonukleotydu z docelową matrycą, wiąże się z koniecznością uzyskania informacji o parametrach termodynamicznych dla przejścia fazowego typu dupleks — pojedyncze nici, takich jak: zmiany standardowej energii swobodnej ΔG° , standardowej entalpii ΔH° oraz standardowej entropii ΔS° . Pierwsza z nich, ΔG° , jest bezpośrednią miarą stabilności kompleksu, im mniejsze przyjmuje wartości tym łatwiej zachodzi jego rozpad. Zmiana standardowej entalpii, ΔH° , niesie informację jak kosztowny energetycznie jest proces, zaś zmiana standardowej entropii, ΔS° , jak dalece zmieniła się struktura przy przejściu od kompleksu do pojedynczych jego składowych.

Wymienione parametry termodynamiczne mogą być uzyskane dwiema drogami: bezpośrednią, opartą na pomiarach kalorymetrycznych oraz pośrednią, polegającą na analizie kształtu profili mięknienia (1).

Ze względu na łatwość otrzymania danych eksperymentalnych w postaci niekalorymetrycznych krzywych mięknienia podejście pośrednie wydaje się szczególnie atrakcyjne. Narzuca ono jednak konieczność stosowania określonego modelu przejścia fazowego. Najprostszym i najczęściej stosowanym jest tzw. model dwustanowy, oparty na trzech podstawowych założeniach. Po pierwsze, zakłada się, że przejście ma charakter dwustanowy, tzn. w roztworze znajdują się albo pojedyncze nici albo kompleksy, a nie ma stanów przejściowych typu częściowo rozdysocjowany dupleks. Założenie to jest bliskie rzeczywistości, gdy mamy do czynienia z krótkimi oligonukleotydami. Po drugie, przyjmuje się, że zmiany entalpii, ΔH° , i entropii, ΔS° , nie zależą w trakcie przejścia od temperatury. W związku z tym, że obserwowana przy denaturacji kwasów nukleinowych zmiana pojemności cieplnej jest niewielka (2) to warunek ten także jest spełniony. Po trzecie, zakłada się, że przejście ma cha-

rakter quasi-stacjonarny. Założenie to umożliwia posługiwanie się klasyczną termodynamiką. W praktyce zaś oznacza to konieczność stosowania odpowiednio powolnego tempa narastania temperatury.

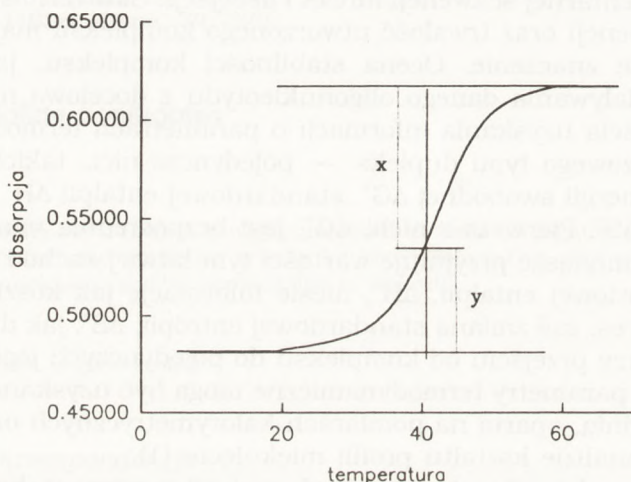
Przy tak spełnionych warunkach przejście można opisać jako proces równowagowy:



gdzie S_1 i S_2 są komplementarnymi niciami.

Podstawową formę niekalorymetrycznych profili mięknięcia stanowi krzywa zależności absorpcji od temperatury. W oparciu o taką postać danych można zdefiniować wielkość α , określającą frakcję nici w stanie duplesku, jako stosunek odległości między górną linią podstawową a krzywą eksperymentalną (x), do odległości między dolną a górną linią podstawową ($x + y$), (rys. 1).

$$\alpha = x/(x + y).$$



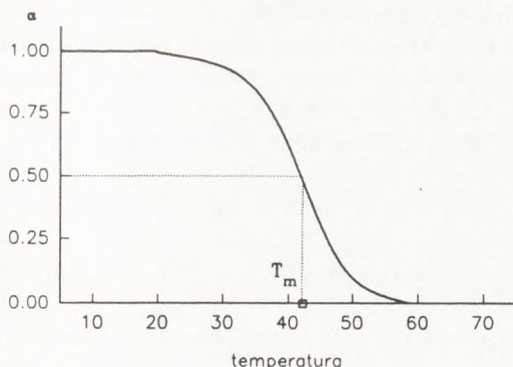
Rys. 1. Krzywa mięknięcia duplesku oligonukleotydowego — zależność absorpcji od temperatury, $A = f(T)$.

Krzywa typu $A = f(T)$ przekształcona zostaje w krzywą $\alpha = f(T)$, (rys. 2). Temperatura mięknięcia, odpowiadająca punktowi przegięcia na wykresie absorpcji, odpowiada teraz wartości $\alpha = 1/2$. Taka konwersja danych umożliwia wyrażenie stałej równowagi przejścia w postaci zależnej od temperatury.

$K = [S_1S_2]/[S_1][S_2] = \alpha(c_T/2)/[(1 - \alpha)c_T/2]^2 = \alpha/[(1 - \alpha)^2(c_T/2)]$,
gdzie c_T oznacza całkowite stężenie nici.

Dla $T = T_m$ ($\alpha = 1/2$)

$$K(T_m) = 4/c_T.$$



Rys. 2. Wykres udziału dupleksu w roztworze w zależności od temperatury, $\alpha = f(T)$.

Znajomość temperaturowej zależności stałej równowagi pozwala, w oparciu o równanie van't Hoffa, obliczyć zmianę standardowej entalpii.

$$\Delta H^\circ = RT^2(d\ln K/dT).$$

Wprowadzając K do tego równania i wykonując różniczkowanie w punkcie $T = T_m$, otrzymujemy ostateczną postać wyrażenia na entalpię przejścia:

$$\Delta H^\circ = 6RT_m^2(\delta\alpha/\delta T)_{T=T_m}.$$

Wielkość $(\delta\alpha/\delta T)_{T=T_m}$ oznacza nachylenie stycznej do krzywej $\alpha = f(T)$ w punkcie jej przegięcia.

Znając wartość entalpii można, w oparciu o całkowitą postać równania van't Hoffa

$$\ln[K(T_m)/K(T)] = \Delta H^\circ(1/T - 1/T_m)/R,$$

policzyć wartość stałej równowagi w danej temperaturze, $K(T)$, a następnie z wyrażenia:

$$\Delta G^\circ = -RT\ln K(T)$$

otrzymać zmianę standardowej energii swobodnej, ΔG° . Odpowiednia zmiana standardowej entropii, ΔS° , wynika ostatecznie z podstawowego równania:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ.$$

Opisana procedura umożliwia uzyskanie parametrów termodynamicznych na podstawie pojedynczej krzywej dysocjacji dupleksu, $A = f(T)$. Dysponując

zbiorem takich krzywych dla różnych stężeń nici możemy uzyskać wszystkie trzy parametry z równania prostej opisującej zależność temperatury mięknięcia od stężenia nici. Punktem wyjścia dla otrzymania równania tej prostej są wyrażenia:

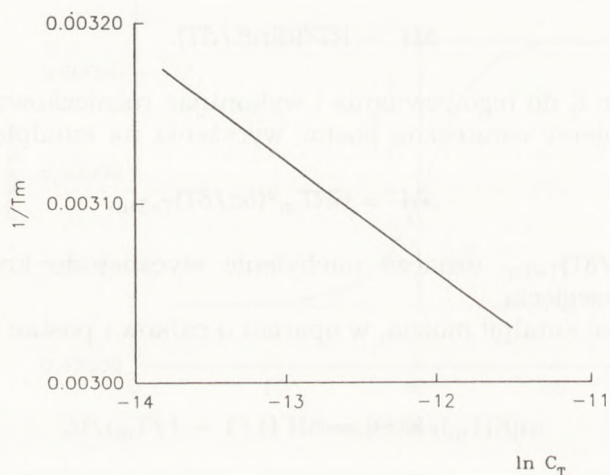
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \text{ oraz } \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ.$$

Porównując je stronami, a następnie rozwiązując dla $T = T_m$, otrzymujemy:

$$1/T_m = R/\Delta H^\circ \cdot \ln c_T + (\Delta S^\circ - R \ln 4)/\Delta H^\circ.$$

Na wykresie zależności $1/T_m = f(\ln c_T)$ wyraz $R/\Delta H^\circ$ odpowiada nachyleniu prostej, zaś wyrażenie $(\Delta S^\circ - R \ln 4)/\Delta H^\circ$ — punktowi jej przecięcia z osią y (rys. 3). W ten sposób, uzyskujemy wartości ΔH° i ΔS° , a następnie ΔG° ze związku

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ.$$



Rys. 3. Wykres zależności odwrotności parametru T_M od całkowitego stężenia oligonukleotydu, $[T_M^{-1} = f(c_T)]$.

Parametry termodynamiczne ΔG° , ΔH° , ΔS° , charakteryzują przejście fazowe znacznie pełniej niż stosowana powszechnie do oceny stabilności struktury temperatura mięknięcia. Konieczność obliczania wartości wymienionych wielkości można łatwo zrozumieć jeśli rozważy się przypadek różnych struktur o identycznej temperaturze mięknięcia. Nie jest to bynajmniej sytuacja hipotetyczna. Odpowiedni przykład można znaleźć wśród danych przedstawionych w pracy Ratmeyer i współl. (3). Autorzy wymieniają w niej między innymi dwa dupleksy RNA-RNA (dodekamery) o identycznym składzie zasad, lecz jeden

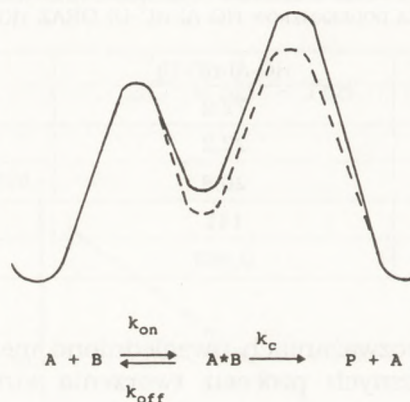
z nich składa się z nici czysto purynowej, sparowanej z nicią czysto pirymidynową (r(G-A)-r(C-U)), a drugi ma obie nici mieszane (r(G-U)-r(C-A)). Na widmach CD tych dwóch kompleksów wyraźnie widać, że są to zasadniczo różne struktury. Dla dupleksu r(G-U)-r(C-A) pojawia się pozytywne maksimum (efekt Cottona) przy ok. 225 nm i negatywne przy ok. 240 nm, podczas gdy dla r(G-A)-r(C-U) w tych samych długościach fali wartości eliptyczności molarowej są bliskie zeru. Różnicy tej nie ujawnia porównanie temperatur mięknienia, są one bowiem w tym wypadku identyczne. Przejścia fazowe mają jednak odmienny charakter co można zobaczyć na podstawie przytoczonych danych (tab.). Dopiero one pozwalają ocenić, że struktura r(G-A)-r(C-U) jest bardziej stabilna niż r(G-U)-r(C-A).

TABELA
PARAMETRY TERMODYNAMICZNE PRZEJŚCIA FAZOWEGO DUPEKS-POJEDYNCZE NICI
WYZNACZONE DLA DODEKAMERÓW r(G-A)-r(C-U) ORAZ r(G-U)-r(C-A)

	r(G-A)-r(C-U)	r(G-U)-r(C-A)
T_m (°C)	72,2	72,1
$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	22,2	19,3
$-\Delta G^{\circ}_{25}$ (kcal/mol)	26,8	22,9
$-\Delta H^{\circ}$ (kcal/mol)	141	112
$-\Delta S^{\circ}$ (kcal/mol-deg)	0,383	0,299

W dotychczasowych rozważaniach uwzględniono metody wyznaczenia parametrów termodynamicznych procesu tworzenia struktur dwuniciowych. Utworzenie dupleksu jest etapem koniecznym dla licznych dalszych przemian enzymatycznych. Dla wielu enzymów forma dwuniciowa DNA lub kompleks DNA/RNA są jedynymi akceptowanymi substratami. Reakcja enzymatyczna składa się wtedy z dwóch etapów: a) utworzenie dupleksu, b) właściwa reakcja z udziałem centrum aktywnego (np. reakcja hydrolizy jednej z nici kompleksu). Pierwszy etap — to rozpoznawanie i wychwycenie obiektu. Jest to proces odwracalny, co chroni przed „przypadkowym” wychwyceniem obiektu o strukturze podobnej, lecz nie identycznej z zadaną. Trwałość kompleksu utworzonego z nici niecałkowicie komplementarnych (zawierającego tzw. *mismatches*, miejsca niezgodności) jest mniejsza niż trwałość kompleksu zbudowanego z nici idealnie sparowanych. Dlatego też im więcej punktów niezgodności, tym wyżej położone jest minimum energetyczne utworzonego kompleksu (rys. 4). Kompleks utworzony na drodze przedstawionej linią ciągłą ulega wtedy łatwiejszemu rozpadowi niż jego trwalszy odpowiednik. W przypadku najtrwalszego kompleksu zawierającego nici idealnie sparowane jego rozpad jest najtrudniejszy, wzrasta zatem szansa na zaistnienie drugiego etapu reakcji — przemiany chemicznej. Strategie antygeny lub antysensu, w których celem ataku jest odpowiednio cząsteczka DNA lub mRNA, zakładają wykorzystanie krótkich syntetycznych oligonukleotydów (lub ich analogów) jako

sondy hybrydyzacyjne rozpoznające odpowiednie sekwencje DNA lub RNA w obrębie cząsteczki-celu. Utworzony w ten sposób kompleks staje się obiektem ataku enzymu degradującego. Sprawą ogromnej wagi jest, aby podawane sondy hybrydyzacyjne tworzyły kompleksy wyłącznie z fragmentami DNA lub RNA, które chcemy wyeliminować. Czy taka selektywność jest możliwa? Ze statystycznego punktu widzenia sekwencja oligonukleotydoma o długości 15 – 18 nukleotydów jest unikatowa w obrębie większości genomów, w tym nawet w tak dużym genomie jak ludzki. Jednakże genom człowieka jest systematycznie badany dopiero od niedawna i nie wiadomo, w jakim stopniu stosuje się on do reguł kombinatoryki. Zatem dla zwiększenia marginesu bezpieczeństwa można rozważyć wydłużenie sekwencji sondy o kilka nukleotydów, co z syntetycznego punktu widzenia nie przedstawia trudności.



Rys. 4. Hipotetyczny profil zmiany energii swobodnej dla dwuetapowej reakcji tworzenia/rozpadu dupletu (I etap) i jego chemicznej hydrolizy (II etap).

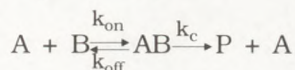
Czy jednak wydłużenie sondy hybrydyzacyjnej zawsze prowadzi do poprawienia selektywności? Intuicyjna odpowiedź brzmiałaby: TAK. Im dłuższa sekwencja, tym większa pewność, że utworzy ona duplet tylko z cząsteczką DNA (lub RNA), dla której została zaprojektowana. Poza tym duplet taki będzie bardziej trwały (więcej oddziaływań wiążących pomiędzy zasadami purynowymi i pirymidynowymi). Byłoby jednak rzeczą nieodpowiedzialną pozostawiać tak ważną kwestię, jak selektywność działania sondy hybrydyzacyjnej jedynie intuicji. Skutki przypadkowego zniszczenia ważnego genu, czy zahamowania biosyntezy ważnego białka mogą być poważne. Próbę odpowiedzi na pytanie o optymalną długość sondy hybrydyzacyjnej przedstawił Daniel Herschlag posługując się modelem rybozymu (4). Rybozym-cząsteczka RNA — zawiera dwa obszary, z których jeden odpowiedzialny jest za rozpoznanie sekwencji do hydrolizy, a drugi jest domeną katalityczną. Proces enzymatyczny składa się z dwóch etapów: a) rozpoznawania (proces odwracalny) i b) hydrolizy (proces nieodwracalny). Analiza dokonana przez Herschlagę poka-

zuje, że wydłużanie sekwencji rozpoznającej rybozemu ponad pewną wartość optymalną prowadzi w rzeczywistości raczej do zmniejszenia selektywności działania rybozemu, niż do jej zwiększenia. Ten raczej nieoczekiwany rezultat bierze się z intuicyjnego niedoceniań wpływu oddziaływań sondy z niecałkowicie komplementarnymi fragmentami DNA (RNA) na sumaryczny wynik reakcji enzymatycznej.

W swojej analizie Herschlag przyjął kilka uproszczeń, które chociaż na pewno wpłynęły na uzyskane wartości liczbowe, to jednak nie zmieniły jakościowego obrazu rozpatrywanego procesu. Herschlag założył, że każda komplementarna para zasad wnosi energię stabilizacji kompleksu $E=2$ kcal/mol oraz, że energia potrzebna do zainicjowania tworzenia się helisy wynosi $E_H=3,5$ kcal/mol. Przy założeniu długości sondy n nukleotydów oraz idealnej jej komplementarności do stanowiącej cel cząsteczki RNA, zmiana energii swobodnej dupleksu wynosi $\Delta G^\circ_n = -nE + E_H$. Jeżeli jednak istnieje x punktów niezgodności pomiędzy sekwencjami sondy i celu ($x < n$), to

$$\Delta G^\circ_{n,x} = -(n-x)E + E_H.$$

Dla procesu tworzenia i rozpadu dupleksu



stała równowagi $K_D = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$, zatem $k_{\text{off}} = k_{\text{on}}/K_D$. Wartość k_{on} wyznaczona eksperymentalnie wynosi ok. $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Z drugiej strony

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

zatem

$$\ln K = -\Delta G^\circ/RT \text{ i } K = \exp(-\Delta G^\circ/RT).$$

Ostatecznie

$$k_{\text{off}} = k_{\text{on}} \exp(\Delta G^\circ/RT).$$

Z wzoru tego wynika, że stała szybkości rozpadu dupleksu (k_{off}) zmienia się wykładniczo w zależności od zmiany energii swobodnej podczas tworzenia dupleksu. Jest to czynnik, który bierzemy pod uwagę przewidując intuicyjnie poprawę selektywności procesu chemicznego (k_c) w miarę wydłużania sondy oligonukleotydowej. Rozważmy jednak sytuację, gdy proces chemiczny (k_c) może mieć miejsce również przy niecałkowitej komplementarności cząsteczek sondy i celu. Stała szybkości K łącznego procesu $A + B \rightleftharpoons A * B \rightarrow P + A$ wyraża się wzorem

$$K = k_{\text{on}} k_c / (k_c + k_{\text{off}})$$

i jest równa k_{cat}/K_M , gdzie k_{cat} jest stałą katalizy, natomiast K_M jest stałą Michaelisa. Jeżeli substratem dla rybozomu jest mieszanina oligonukleotydów składająca się z i form, to dla każdej formy współczynnik $(k_{\text{cat}}/K_M)_i$ pomnożony przez stężenie danej formy opisuje szybkość zaniku substratu B_i . Przyjmując, że w mieszaninie randomalnej stężenie każdej formy B_i jest jednakowe, to do opisu zaniku i -tego oligonukleotydu wystarczy znać współczynniki $(k_{\text{cat}}/K_M)_i$. Zależą one od długości sekwencji rozpoznającej rybozomu n , jak również od liczby punktów niezgodności. Rozpatrzmy statystyczną mieszaninę wszystkich możliwych oligonukleotydów o długości m , przy czym $n < m$. W mieszaninie tej będzie

$$N = [n!/x!(n-x)!]3^x 4^{m-n}$$

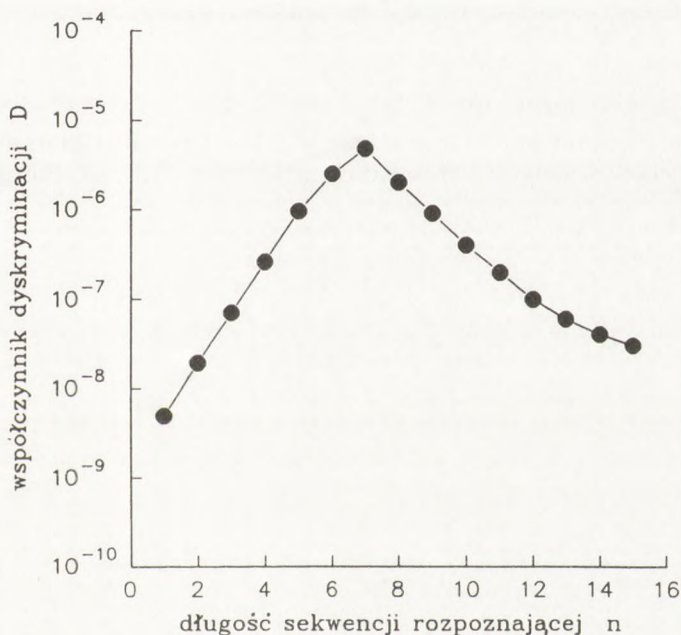
cząsteczek zawierających w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez rybozym x punktów niezgodności z sekwencją cząsteczki celu ($0 < x < n$).

Wartość $n!/x!(n-x)!$ to czynnik znany z kombinatoryki, opisujący na ile sposobów można rozmieścić x punktów niezgodności w sekwencji o długości n . Wartość 3^x odzwierciedla fakt, że każdy *mismatch* może występować w trzech formach (np. trzy nukleotydy A, G lub C, zamiast pożądanego U). Z kolei 4^{m-n} opisuje liczbę form różniących się budową poza sekwencją rozpoznającą o długości n . Obszar ten składa się z $(m-n)$ centrów, z których każde może być jednym z czterech nukleotydów. Gdy $x=0$, to liczba N wynosi po prostu $4^{m-n}-1$, gdzie liczba 1 odpowiada strukturze tego jednego jedyne go celu, jaki chcemy wyeliminować. Powstaje zatem pytanie jak wyglądałaby selektywność degradacji wybranego celu przez rybozym o długości sekwencji rozpoznającej n w zależności od długości m oligonukleotydów występujących jako mieszanina statystyczna wszystkich możliwych form? Herschlag wprowadził tzw. współczynnik dyskryminacji

$$D = K_{n,0} / \sum_{x=0}^n N K_{n,x}$$

pokazujący, ile razy częściej degradowana jest cząsteczka całkowicie komple mentarna w obrębie sekwencji rozpoznającej w porównaniu do wszystkich pozostałych cząsteczek, zawierających od 1 do n punktów niezgodności. Trzeba zauważyć, że we wzorze tym występuje wartość k_c , stała szybkości reakcji chemicznej, która nie jest znana. Herschlag przyjął dla niej wartość 1 min^{-1} , co jest kolejnym uproszczeniem, nie zmieniającym jednak jakościowego charakteru analizy. Ponieważ k_{on} jest wartością zmierzoną, a k_{off} daje się obliczyć z wykorzystaniem parametru $\Delta G^\circ_{n,x}$, to możliwe jest wyliczenie wartości współczynnika dyskryminacji D w funkcji n przy założonej wartości m . Przebieg uzyskanego wykresu $D=f(n)$ jest zaskakujący (rys. 5). Dla $m=15$ i $E=2 \text{ kcal/mol}$ współczynnik D osiąga wartość maksymalną dla $n=7$. Oznacza to, że dla mieszaniny wszystkich możliwych 15-merów najbardziej selektywny jest rybozym o długości sekwencji rozpoznającej $n=7$. Trzeba przy tym zwrócić uwagę na fakt, że D_{max} w tym przypadku wynosi 10^{-5} , co oznacza, że degradacja

cząsteczki celu ma miejsce tylko raz na 10^5 wszystkich aktów degradacji. Dla sekwencji rozpoznającej o długości $n=2$ $D=10^{-8}$, a dla $n=12$ $D=10^{-7}$. Wartość $D_{\max}=10^{-5}$ jest i tak bardzo duża, biorąc pod uwagę, że statystyczna mieszanina 15-merów składa się z $4^{15}=1\ 073\ 741\ 824$ form. Oczywiście uproszczenia przyjęte przez Herschlagą powodują, że $n=7$ odpowiadające D_{\max} nie jest wartością pewną, niemniej jednak charakter otrzymanego wykresu $D=f(n)$ jednoznacznie wskazuje na fakt, że zbyt długa sekwencja rozpoznająca prowadzi w efekcie do zmniejszenia selektywności działania rybozymu. Ma to miejsce, wtedy gdy rozpad nieprawidłowo utworzonego dupleksu jest na tyle trudny, że proces chemicznego cięcia przestaje być czynnikiem determinującym szybkość reakcji. Wówczas gdy sekwencja rozpoznająca jest zbyt długa pojedyncze, izolowane od siebie punkty niezgodności nie są w stanie wymusić szybkiej dysocjacji dupleksu utworzonego przez dwie cząsteczki nie w pełni komplementarne. Analogiczne zjawisko musi być rozpatrywane przy projektowaniu strategii antysensu. W tym przypadku zbyt długa sonda oligonukleotydowa może nieselektywnie tworzyć dupлексы również z innymi fragmentami DNA lub RNA, wykazującymi podobieństwo do cząsteczki stanowiącej w założeniu cel ataku. Powstały wtedy zbyt trwały dupлекс, zanim ulegnie rozpadowi może zostać zaatakowany przez np. RNazę H dając w efekcie niezamierzone hamowanie ważnych procesów biosyntezy.



Rys. 5. Zależność współczynnika dyskryminacji od długości sekwencji rozpoznającej, $D = f(n)$.

Literatura

1. Breslauer K.J., (1994), *Extracting Thermodynamic Data From Equilibrium Melting Curves for Oligonucleotide Order-Disorder Transitions*, in: *Methods in molecular biology*, 26, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
2. Vesnaver G., Breslauer K.J., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3569 – 3573.
3. Ratmeyer L., Vinayak R., Zhong Y.Y., Zon G., Wilson W.D., (1994), *Biochemistry*, 33, 5298 – 5304.
4. Herschlag D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6921 – 6925.

Thermodynamic aspects of oligonucleotide duplex formation and their effect on selectivity of hybridization in antisense strategy**Summary**

The methods of evaluation of thermodynamic parameters for oligonucleotide order-disorder transitions are presented. These parameters are useful for the prediction of stability of duplexes formed by these oligonucleotides with RNA matrix. The common opinion, that better antisense properties can be achieved by the increase of oligonucleotide length is critically evaluated. The problem of optimal length of oligonucleotide for antisense purposes is discussed by taking into account the selectivity of hybridization.

Key words:

thermodynamic parameters, duplex stability, antisense strategy.

Adres dla korespondencji:

Małgorzata Boczkowska, Piotr Guga, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź.