



# Nuove tecnologie Chimiche

a cura di Pierfausto Seneci

Director of Chemistry, NAP AG, Monaco, Germania

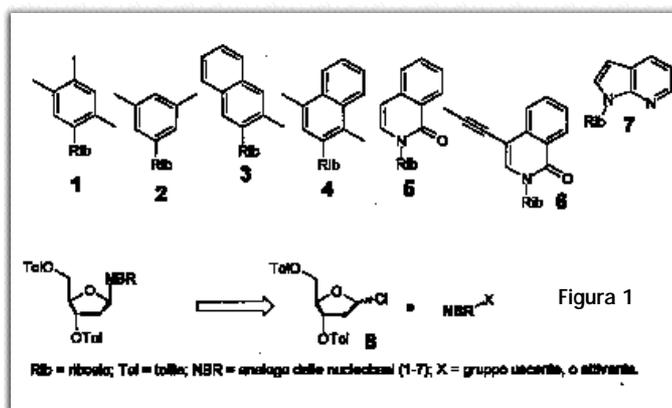
Lo scopo di questa rubrica, a mio avviso, è a volte anche di gettare un vero e proprio sguardo sul futuro esaminando lavori che, sebbene non prospettino alcuna applicazione immediata, appaiono essere potenziali *breakthrough*, cioè possibili fonti di innovazioni significative nel futuro, sebbene forse non prossimo.

Un esempio importante di questa categoria di lavori è rappresentato da due articoli apparsi recentemente (A.K. Ogawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 3274; Y. Wu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 7621) ed originati dal gruppo di Peter Schultz e Floyd Romesberg allo Scripps Research Institute di San Diego. Lo scopo di questi lavori è quello di identificare una terza coppia di basi azotate (oltre alle naturali adenina-timina (A-T) e citidina-guanina (C-G) da introdurre all'interno della doppia elica classica del DNA per espandere l'alfabeto genetico codificato dagli acidi nucleici stessi. Ciò significherebbe poter produrre in futuro doppie eliche di DNA contenenti nucleobasi artificiali che potrebbero impartire proprietà desiderate all'intera sequenza e permettere manipolazioni mirate delle stesse sequenze; si possono immaginare applicazioni di laboratorio (introduzione di *markers* in catena per ibridazione, facilitazione di selezione *in vitro* ecc.), ma anche pensare a futuribili doppie eliche semi-sintetiche per risolvere difetti genetici, o per costruire versioni più efficaci di sequenze note.

I ricercatori dello Scripps Institute hanno evidenziato con chiarezza i requisiti necessari ad una terza coppia di nucleobasi, riportati di seguito:

- una grande energia di ibridazione, che permetterebbe un *coupling* forte fra elementi complementari delle due catene formanti la doppia elica;
- un alto grado di selettività termodinamica fra *match* e *mismatch*, cioè una forte preferenza termodinamica per il base *pair* desiderato nei confronti di ogni altro possibile, per evitare la stabilizzazione di base *pair* anomali;
- un'efficiente incorporazione dei precursori monometrici trifosfati all'interno di catene di DNA nascenti da parte degli enzimi deputati alla sintesi del DNA;
- un alto grado di selettività cinetica fra *match* e *mismatch*, cioè una forte preferenza cinetica per il base *pair* desiderato nei confronti di ogni altro possibile, per evitare l'incorporazione di monomeri anomali e quindi la formazione di base *pair* anomali;
- una compatibilità completa per le catene contenenti il terzo base *pair* con l'estensione di catene nucleotidiche, senza interruzioni e senza formazione di sequenze di delezione.

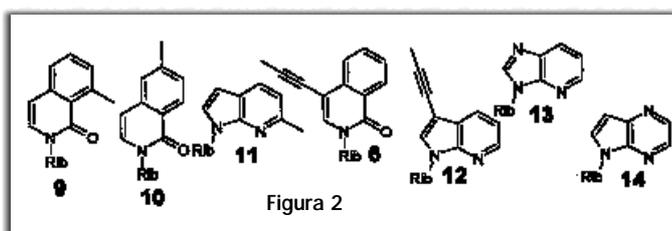
L'idea di partenza è stata diversa da quella di precedenti lavori, che avevano cercato di trovare una terza coppia di basi la cui interazione (*packing*) fosse sempre guidata dall'instaurarsi di legami ad idrogeno, come per A-T e C-G; questi sforzi precedenti non hanno mai potuto identificare un terzo base *pair* ortogonale (selettività completa) e compatibile con gli enzimi che formano catene di DNA, a causa probabilmente della similarità intrinseca fra base *pair* naturali ed artificiali considerati. Schultz e Romesberg hanno invece ipotizzato l'uso di forze di legame idrofobiche (Van der Waals ecc.) per ottenere interazioni forti e specifiche. Nel loro primo lavoro, alcuni nuclei idrofobici arilici sono stati considerati come candidati; le loro strutture sono riportate in Figura 1. Per la maggior parte di loro, la sintesi è avvenuta a partire dal derivato noto 8 e da un derivato attivato del nucleo arilico corrispondente (Figura 1).



La loro caratterizzazione ha mostrato che il base *pair* 5-7 (isocarbotirile-azaindolo, ICS-AI) possiede molte delle proprietà richieste. Infatti, l'energia di ibridazione è molto simile a quella della coppia naturale A-T; la selettività di ibridazione con nucleobasi naturali è (non a sorpresa, vista la natura diversa delle interazioni) molto elevata; la capacità di essere riconosciuto ed inserito in una catena nucleotidica in formazione è, seppur ridotta rispetto alle nucleobasi naturali, sufficiente e significativa. Purtroppo, la selettività rispetto a base *pair* anomali dimerici come AI-AI e soprattutto ICS-ICS si è rivelata negligibile sia termodinamicamente (stabilità del complesso) che cineticamente (velocità di incorporazione nei nucleotidi in formazione).

Nel secondo lavoro è stata effettuata un'ottimizzazione strutturale più focalizzata sui rimpiazzi 5 e 7; le strutture 9-14 sono state preparate (Figura 2) seguendo la stessa sintesi generale schematizzata in Figura 1. Tre diverse classi di modifiche possono essere evidenziate: la ricerca di maggiori interazioni di base *pair* idrofobici per introduzione di un metile nelle varie parti di ICS (9,10) o di AI (11); l'aumento della superficie idrofobica attraverso l'introduzione di un sostituito metilpropinilico su AI (12) e ICS (6, recuperato dalla serie precedente); e la sostituzione carbonio-azoto in AI (13, 14) per modificare le proprietà elettroniche senza toccare significativamente l'ingombro sterico.

Dopo la stessa caratterizzazione accurata eseguita nel primo lavoro, il complesso/base *pair* 9-14 (metillicarbotirile-pirazinpirrolo, MICS-PP) si è dimostrato più promettente di 5-7, poiché l'efficienza



di incorporazione della coppia è nettamente aumentata, arrivando ad una cinetica di solo 20 volte inferiore a quella delle nucleobasi naturali, e perché si è osservata selettività di incorporazione anche verso i base *pair* anomali dimerici, (4 volte migliore di MICS-MICS, 12 volte di PP-PP), seppure non sufficiente per una incorporazione di assoluta qualità.

