

## Xeno-Nükleik Asitler ve XNA Dünyası

### Xeno-Nucleic Acids and the World of XNA

Abdullah Ekmekçi

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

#### ÖZET

İnsan gereksinimlerini karşılamak için günümüzde yeni organizmalar ve biyolojik sistemler oluşturulmaktadır. Sentetik biyoloji, doğada var olmayan organizmaları, biyolojik bileşenleri ve işlevleri oluşturmak için ya da varolan biyolojik sistemlere yeni işlev yaptırabilmek için yeniden tasarlar ve modeller oluşturur. Sentetik biyoloji, biyolojinin mühendisliğidir, in vitro genetik olarak da tanımlanır. Sentetik genomik ise kimyasal sentezle tam bir genomu ya da genomun bir kısmını oluşturabilecek teknolojik çalışmaları kapsar. Santral dogma olarak bilinen evrensel genetik bilgi akışında hücrelerimiz doğal nükleik asit olan DNA'yı okuyarak işlevsel RNA ve protein oluşturur. Xeno nükleik asitler (XNA'lar) ilk kez Herdewijn ve Marlier tarafından kimyasal yolla ortaya çıkarılmış yeni bir türev nükleik asit sınıfıdır. XNA'lar, doğal olmayan nükleik asit omurgalı sentetik genetik polimerlerdir. Doğal genomlarda nükleik asiti oluşturan, replike olan ve sayısı dört olan (GACT) yapıtaşlarına, 1990'da kimyacıların başlattığı genişletilmiş yapay genetik bilgi sistemlerinde yeni yapıtaşları eklenmiştir. Baz çifti sayısı da üçten daha fazlasına çıkarılmıştır. Önceki genetik bilgilerin depolandığı GACT'den oluşan DNA kütüphaneleri, en azından DNA'da Z:P baz çifti şeklinde eşleşebilen GACTZP nükleotidleriyle zenginleştirilmiştir. Genetik kodun düzenlenmesi (genom editing) ve histon kodunun düzenlenmesi (epigenom editing) ile yeniden tasarlanan kromatinler, tıpta, biyoteknolojik ve temel biyolojik araştırmalarda şaşırtan sonuçlar vermiş ve pek çok sorunun çözümüne yönelik yeni ufuklar açmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Sentetik nükleik asitler, XNA'lar, terapötik aptamerler

**Geliş Tarihi:** 01.03.2016

**Kabul Tarihi:** 30.03.2016

#### ABSTRACT

Today, new organisms and biological systems have been formed to meet human needs. Synthetic biology creates and redesigns non-existent organisms in nature to make biological components and biological systems or to perform new functions in existing organisms. Synthetic biology which is an engineering of biology is also defined as in vitro genetics. Synthetic genomics covers the technological studies containing chemical synthesis of a portion of the genome or complete genome. In central dogma known as universal flow of genetic information, our cells use DNA, a natural nucleic acid, to make functional RNA and protein constructs. Xeno-nucleic acids (XNAs) are new nucleic acid derivatives and discovered chemically by Herdewijn and Marlier. XNAs are synthetic genetic polymers with unnatural nucleic acid backbone. New building blocks have been added to the four main building blocks (GATC) which constitutes natural genomes and replicates, in the extended artificial genetic information systems in 1990, started by chemists. The number of base pairs have been increased more than three. DNA libraries consisting of GACTs that store earlier genetic data have been enriched with GACTZP nucleotides which can at least pair within the DNA in form of Z:P. Redesigned chromatin by arranging of the genetic code (genome editing) and arranging of the histone code (epigenome editing) have produced surprising results and opened new horizons for the solution of many problems in medicine, biotechnology and basic biological researches.

**Key Words:** Synthetic nucleic acids, XNAs, therapeutic aptamers

**Received:** 03.01.2016

**Accepted:** 03.30.2016

#### GİRİŞ

Sentetik biyoloji, hücrelerin genlerine (genom ve plazmide), işlevi arttıracak genlerin sokulmasıyla insanlığın, yenilenebilir temiz enerji, biyomateryal, sağlık (başta kişisel tıp) ve gıda üretimi gibi acil sorunlarının bir kısmının çözümü için ortaya çıkmış yeni bir bilim alanıdır (1, 2, 3, 4). İnsanı da kapsayan memeli sentetik gen ağıyla günümüzde hastalıkların tanı ve tedavisi, farmasötikal bileşiklerin taranması, biyolojik-üretim (insülin, biyodizel, deterjan, antibiyotik, polimer, aşılarda ve antikolar, v.b ürünlerin sentezi) gibi insan yaşamını kolaylaştıracak ve sağlığını iyileştirecek alanlarda uygulamalar başlamıştır (2, 5).

Genom düzenlemesi (editing) ile, genomda kalıcı düzenlemeler oluşturulabilmektedir. Bildiğimiz eşdeğer eski bir tanımla genetik mühendislik, istenilen bir fenotipi oluşturan genotipi oluşturma sanatıdır (6). Genom editing çoğunlukla CRISPR/Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats), TALEN (transcription activator-like effector nucleases) ya da çinko parmak nükleazlar yoluyla ökaryotik organizmalara tek

mutasyonun sokulmasını tanımlar (7). Bilindiği gibi genetik mühendislikte DNA kesilip yapıştırılarak okunması sağlanırken, sentetik biyolojide gen sentezli tasarımlar yapılarak standardize edilir (6). Bu tür genomik manipülasyonları daha verimli hale getirmeye yönelik çalışmalar baş döndürücü hızla devam etmektedir. Örneğin *E.coli*'de DNA'da eş-anlamı TAA kodonlarıyla tüm TAG (mRNA'da UAG) stop kodonlarının yer-değiştirmesi ilkesine dayanan, MAGE (multiplex automated genome engineering) sistemi bunlardan biridir (8). Bakterial CRISPR/Cas sistemi bakteri ve bira-mayası hücrelerinde genom editing aracı olarak kullanılmaktadır. Bu sistemde hedef genom dizisini, değişime uğramış DNA dizisi ile değiştirmek için homolog rekombinasyonu kullanan hücrelerin seçilmesinde RNA-yöneltili CRISPR nükleazlarla DNA bölme tekniği kullanılmaktadır (9).

**Address for Correspondence / Yazışma Adresi:** Abdullah Ekmekçi, PhD, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. E-posta: aekmekci@gazi.edu.tr

©Telif Hakkı 2016 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/> web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2016 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/>

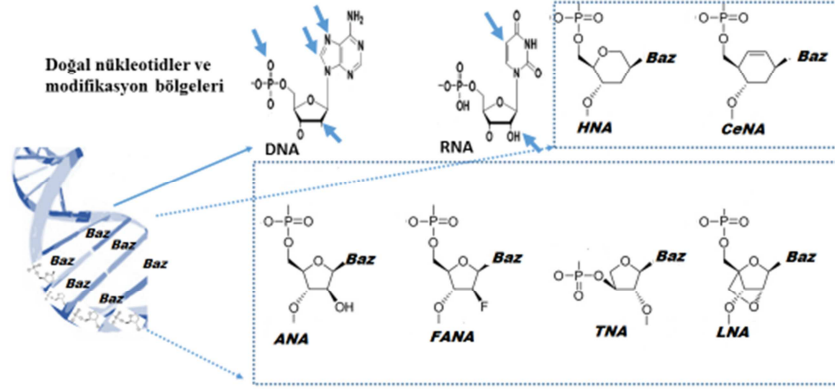
doi:<http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2016.56>

## XNA'lar

Yeryüzünde tüm canlılar genetik bilgilerini, DNA ya da RNA olarak taşırlar. İki polimer zincir molekülün omurgasındaki tek fark RNA'da riboz DNA'da deoksiriboz şeker biriminden gelir. Şimdi bilim insanları şeker birimleri farklı, en azından 6 nükleik asit omurgası sentezleyip genetik bilgiyi depolayabilmekte, bir jenerasyondan diğerine aktarabilmekte ve gerektiğinde kullanabilmektedir. İşlevsel moleküller olarak da tasarlanabilen bu sentetik genetik zincirler, XNA (Xeno-nükleik asitler) olarak tanımlanmıştır (10).

XNA'lar şeker birimleri ya da fosfo-diester omurga bağlantıları ve bazları (genellikle pirimidin bazlar N-7, pürinler C-5'den) farklı sentetik genetik polimerlerdir (Şekil:1). İlk kez Pinerio ve ekibi 6 farklı XNA'nın transkripsiyonunu ve ters transkripsiyonunu yapabilen *Tgo* DNA polimeraz varyantlarını geliştirmiştir (11).

XNA'lar kendisiyle XNA:XNA, doğal DNA/RNA ile XNA:DNA, XNA:RNA şeklinde sekonder (çift sarmal) yapı oluşturabilmektedir (12). FANA (Fluoro-arabino nükleik asit), ilk kez kendisini kalıp olarak kullanıp kopyasını çıkararak XNA tipidir (11). LNA (locked nucleic acids, metil köprüyle kilitli) olarak kısaltılan sentetik nükleik asitler, nükleaza dirençliliği ve oligonükleotidlerle kararlı komplementlerlik oluşturması nedeniyle antisens, antigen, siRNA ve miRNA'lara uygunluk gösteren nükleik asit ilaçları olarak kullanılmaya aday moleküllerdir (13).



Şekil:1 DNA/RNA'daki tekrarlanan doğal nükleotid birimlerin yapısı, modifikasyon bölgeleri ve XNA'lardaki tekrarlanan doğal olmayan 6 nükleotid örneği

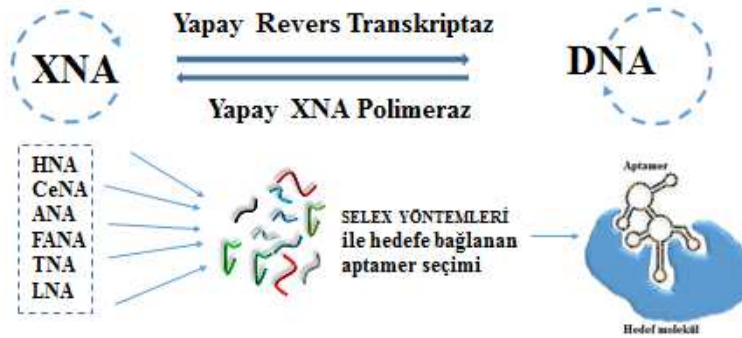
HNA (anhidrohexitol nükleik asit) ve TNA (threofuranozil nükleik asit), RNA'da bulunan doğal ribozun yerine riboz olmayan şeker birimi içeren XNA sistemleridir ve replikasyonları için yapay polimeraz enzimleri gereklidir. TNA, yapay 4 karbonlu throse şeker içeren ve sentetik genetik ilk oluşturulan genetik polimerdir (14). Sentetik genetikte çalışılan ikinci XNA polimeri, 6 üyeli piranozil halka yapılı bir omurga içeren ve DNA ya da RNA sarmalına komplementer olabilen HNA'dır (11). HNA, doğal nükleozid yerine hidroksimetilli –analog- nükleozid içermektedir.

Hücrelerde genetik alfabeyi oluşturan 4 bazdan (GACT)  $4^3 = 64$  kodon oluşturulabilmektedir. Watson-Crick'in baz eşleşme kuralına göre hidrojen bağıyla eşleşen A:T ve G:C baz çiftine eğer bir tane daha eklenseydi  $5^3 = 125$  kodon olasılığı vardı. Bu artık çok uzak bir olasılık değildir, çünkü hidrojen bağıyla olmasa da hidrofobik etkileşimlerle ve metal iyonlarla baz çiftleri oluşturan sentetik nükleotid içeren sentetik nükleik asitler (XNA'lar) ortaya konulmuştur (15,11). Kimoto ve arkadaşları, birbiriyle eşleşebilen ve doğal olmayan iki nükleotidi (Ds:Px) kullanarak DNA replikasyon sırasında DNA'ya

üçüncü baz çiftini yerleştirebilmiştir (16). Benzer şekilde Watson-Crick baz eşleşme kurallarına uygun Z:P baz çifti de DNA'ya sokulmuştur (17).

## Yapay XNA polimerazlar (XNAzimler)

XNA'lar, doğal polimeraz enzimlerince oluşturulamamakta ve kopyalanamamaktadır (bana göre hep böyle kalmalı). 2012'de P.Holliger ve arkadaşları, bir genetik mühendislik tekniği (compartmentalized self-tagging, CST) ile, ilk kez XNA'ları sentezleyebilen endonükleaz ve DNA ligaz aktiviteli yapay, mutant polimeraz enzimlerini oluşturmuştur (11). Bu mutant polimerazlar ile XNA'ları sentezleyerek önce bu bilgileri DNA'ya sonra tekrar XNA'ya aktararak (tıpkı bir retroviral döngü gibi) ilk yapay molekülleri (genleri) ortaya koymuşlardır (Şekil:2). Holliger'in ekibi rastgele XNA diziliimli büyük kütüphaneler oluşturmuş ve kimyasal tepkimeleri yürütebilen moleküller (XNAzimler) için bu kütüphaneleri taramışlardır. Yeni oluşturulan aktif XNAzimler, tıpkı günümüzün ribozimleri gibi mRNA'ların ve DNA'ların polimerize parçalarında çentik açabilmekte, ayırmakta ya da birleştirebilmektedir (18).



Şekil: 2 Enzimatik XNA sentezi (DNA → XNA), ters transkripsiyon (XNA → DNA) ve replikasyonu (XNA → XNA) sonucunda SELEX yöntemlerinden biriyle aptamer seçimi

Sentezlenmiş ilk yapay XNA tipi, omurgasında şeker içermeyen PNA'lardır (peptid nükleik asitler) (19). PNA'lar, DNA'dakine benzer baz kompozisyonu olan, ancak şeker fosfat omurga yerine amino etil glisinlerden oluşan peptid omurgalı nükleik asitlerdir. Bu özelliğiyle zardan çok kolay geçmekte ayrıca enzimatik parçalanmaya dirençli moleküller olarak tanı ve tedavide alternatif kimyasallar olarak değerlendirilmektedir (20, 21). PNA'lar kendisiyle (homodubleks), DNA ve RNA'lar ve diğer XNA'lar ile (heterodubleks) çift sarmal zincir oluşturabilmektedir.

#### Terapötik XNA'lar, aptamerler

Aptamerler, 1990'larda açıklanmış kısa, tek sarmal sentetik ribo ya da deoksiribonükleik asitlerdir (22, 23). Aptamerler SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) olarak tanımlanan bir oligonükleotid tarama tekniğinin gelişimiyle keşfedilmişlerdir. Bu teknikte hedefe yüksek özgünlük gösterip bağlanıncaya dek nükleotid liganın seçilmesi, yıkanarak hedeften uzaklaştırılması ve çoğaltılması döngüleri tekrarlanır (24).

Aptamerler, özgün katlanarak moleküler hedeflere yüksek bağlanma afinitesi için seçilmiş 30-70 nükleotid uzunlukta oligonükleotid liganlardır (Şekil:2). İmmünjeneteleri düşük ya da hiç yoktur. Ayrıca yapısında hücrenel nükleaz enzimleri için uygun sübstrat olma özelliğini değiştiren doğal olmayan nükleotidler varsa, tedavi için daha uygun ilaç olabilirler. Aptamerler için proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, antibiyotikler, küçük organik ya da inorganik moleküller hatta hücreler hedef olarak kullanılabilirlerdir (25). Kanseri tanı ve tedavilerinde kullanmak için insan EGF reseptörü-3, prostata özgü zar antijeni (PSMA) ve diğer bazı reseptörlere karşı aptamerler oluşturulmuştur (26, 27).

SELEX için oluşturulan kütüphanelerin kapasitesi önemlidir. XNAzimlerle oluşturulan XNA'ların her birinden çok sayıda kimyasal sentezle oligonükleotid havuzu oluşturularak aptamer seçiminde kullanılabilirlerdir. SELEX prosedüründe atomik kuvvet mikroskopu, otomatik SELEX (PCR kullanır), hücre SELEX'i, kapiller elektroforez, flumag (fluoresen işaretleme) gibi pek çok teknikten biri kullanılmaktadır (28).

Aptamerler, daha etkin hedefli tedaviler için nanopartiküller ve nükleik asitlerle konjuge edilebilmektedir (29). 2'-deoksi-2'-fluoro pirimidin nükleotidleri (U,C), yapısal kararlılığı ve nükleazlara direnci arttırmak için kullanılan terapötik RNA-bazlı modifiye aptamerlerdir. Örneğin pegaptanib sodium, MACUGEN, FDA tarafından onaylanmış, patolojik oküler anjiyogenez ve damar geçirgenliğinden sorumlu VEGF (vascular endothelial growth factor)'i baskılayan ilk RNA aptameridir (30). Oluşturulan diğer aptamerlere örnek olarak insan alfa trombinine afinite gösteren, HIV yanıt elementine ve yumurta lizozimine bağlanan TNA aptamerleri, ve HIV revers transkriptaza bağlanan FANA aptamerleri gösterilebilir (31, 32).

#### SONUÇ

Analog nükleik asitler (XNA'lar); alternatif nükleobaz, şeker ve farklı kimyasal yapıları omurga gibi doğal olmayan bileşenleri içeren yapay genetik polimerlerdir. Bir katalizör gibi işlev gören ve XNA'ları sentezleyen XNAzimler, yapay yapıtaşlarını zincire sokabilen, zinciri koparan endonükleaz aktivitesine ve oligomerleri birleştirebilen ligaz aktivitesine sahip moleküllerdir. Tanı ve hedefli tedavide gittikçe daha etkili olabilen XNA'lardan aptamerlerin geliştirilmesi sentetik biyolojinin insanlığa sunduğu en önemli katkılardan biri olabilecektir.

Alternatif nükleobazların oluşturulmasıyla bilinen santral dogma ve genetik kod genişlemekte, nükleotidler yapay da olsa genetik şifrede kodon sayısını artırarak farklı protein oluşturma potansiyelleri taşımaktadır. Farklı sentetik nükleik asitler arasında aracı ya da doğrudan bilgi aktarma yolları oluşturulmuştur. DNA ve RNA artık kimyasal genetik bilgi depolayan vazgeçilmez moleküller değildir. Bu gelişmelerle erken evrim döneminde "RNA dünyası"nın da öncesi açıklanabilecektir. Daha ilginç evrende farklı genomların da olabileceğini ve dahası doğal olmayan bir geleceği akla getirmektedir.

#### Çıkar Çatışması

Yazar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

#### KAYNAKLAR

- Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 2000; 403: 339–42.
- Weber W, Fussenegger M. Engineering of synthetic mammalian gene networks. *Chem. Biol.* 2009; 16: 287–97.
- Ruder WC, Lu T, Collins JJ. Synthetic biology moving into the clinic. *Science* 2011; 333: 1248–52.
- Bution ML, Molina G, Abrahão MR, Pastore GM. Genetic and metabolic engineering of microorganisms for the development of new flavor compounds from terpenic substrates. *Crit Rev Biotechnol* 2015;35: 313-25.
- Kis Z, Pereira HSA, Homma T, Pedrigi RM, Krams R. Mammalian synthetic biology: emerging medical applications. *J. R. Soc.* 2015; Interface 12: 20141000. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.1000>
- Esweld KM and Wang HH. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol Syst Biol* 2013; 9: 641
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; 31:397–405.
- Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* 2009; 460: 894–8.
- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F. & Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR–Cas systems. *Nature Biotech* 2013; 31: 233–9.
- Herdeewijn P, Marliere P. Toward safe genetically modified organisms through the chemicals diversification of nucleic acids. *Chem Biodivers* 2009; 6, 791-808.
- Pinheiro VB, Taylor AI, Cozens C, Abramov M, Renders M, Zhang S, et al. Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science* 2012; 336: 341–4.
- Anasova I, Kowal EA, Dunn MR, Chaput JC, Van Horn W D. The structural diversity of artificial genetic polymers, *Nucleic Acid Res* 2015;44:1007-21.
- Yamamoto T, Nakatani M, Narukawa K, Obika S. Antisense drug discovery and development. *Future Med Chem* 2011; 3: 339-65.
- Schöning K, Scholz P, Guntha S, Wu X, Krishnamurthy R., and Eschenmoser A. Chemical etiology of nucleic acid structure: the a-thiofuranosyl-(30→20) oligonucleotide system. *Science* 2000; 290: 1347–51.
- Holmberg RC, Henry AA, Romesberg FE. Directed evolution of novel polymerases, *Biomol Engineering* 2005; 22: 39-49.
- Kimoto M, Yamashige R, Matsunaga K-I, Yokoyama S, Hirao I. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 453–7.
- Georgiadis MM, Singh I, Kellett WF, Hoshika S, Benner SA, Richards NGJ. Structural Basis for a Six Nucleotide Genetic Alphabet. *J. Am. Chem. Soc.* 2015; 137: 6947–55.
- Taylor AI, Pinheiro VB, Smola MJ, Morgunov AS, Peak-Chew S, Cozens C et al. Catalysts from synthetic genetic polymers. *Nature*, 2015;518:427-30.
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH and Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991; 254: 1497–500.
- Nielsen PE. Sequence-selective targeting of duplex DNA by peptide nucleic acids. *Curr Opin Mol Ther* 2010; 12: 184–91.
- Gambari R. Peptide nucleic acids: a review on recent patents and technology transfer. *Expert Opin Ther Pat* 2014; 24: 267–94.
- Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249: 505–10.
- Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; 346: 818–22.
- Wilson DS, Szostak, JW. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem* 1999; 68: 611–47.
- Goringe H, Homann M, Lorger, M. In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules. *Int. J. Parasitol* 2003; 33: 1309–17.
- Cox JC, Hayhurst A, Hesselberth J, Bayer TS, Georgiou G, Ellington AD. Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: From gene to aptamer. *Nucleic Acids Res* 2002; 30, e108.
- Wang J, Li, G. Aptamers against cell surface receptors: Selection, modification and application. *Curr. Med. Chem* 2011; 18: 4107–16.
- McKeague M, DeRosa, MC. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *J. Nucleic Acids* 2012;2012:748913
- Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Del. Rev* 2012; 64: 206–12.
- Ng EW, Shima DYP, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR and Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2006; 5, 123.
- Pinheiro VB and Holliger P. Towards XNA nanotechnology: new materials from synthetic genetic polymers. *Trends Biotechnol* 2014; 32: 321–8.
- Yu H, Zhang S and Chaput JC. Darwinian evolution of an alternative genetic system provides support for TNA as an RNA progenitor. *Nat. Chem* 2012; 4: 183–7.