

# INTRODUCCIÓ

---

## A. Quàdruplex de guanina

### A.1 Introducció històrica

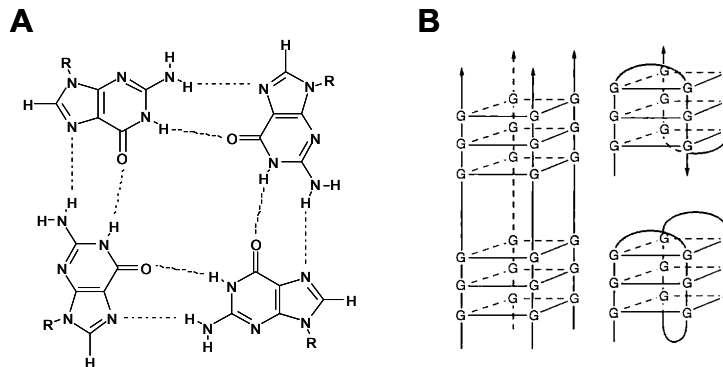
La major part del DNA present en les cèl·lules es troba estructurat en forma de doble hèlix (B-DNA). Tanmateix, el DNA és una molècula que presenta un cert grau de polimorfisme i que es pot trobar formant no només altres tipus de doble hèlix (A-DNA, Z-DNA), sinó també estructures multicadena, com ara tríplex o quàdruplex<sup>1</sup>. D'entre les estructures quàdruplex, les més estudiades són les anomenades *i-motif*<sup>2,3</sup>, *bi-loop*<sup>4</sup>, i sobretot, els quàdruplex de guanina<sup>5</sup> (quàdruplex de G).

La primera evidència d'estructures quàdruplex de G es remunta a la dècada dels '60, i prové de l'estudi estructural de gels de guanosina<sup>6</sup>. Des de llavors i fins a l'actualitat, aquestes estructures han anat adquirint cada cop més rellevància i el seu estudi ha anat despertant cada cop més interès, degut als possibles rols que sembla que poden jugar aquestes estructures *in vivo*. En els últims trenta anys s'han anat descobrint regions genòmiques molt importants que contenen seqüències riques en guanines i que, per tant, són susceptibles d'estructurar-se en forma de quàdruplex de G. Aquest tipus d'estructura secundària no només es exclusiva del DNA, sinó que també es pot presentar tant en molècules d'RNA<sup>7</sup>, com en àcids nucleics modificats tals com DNA amb esquelet fosforotioat, 2'-O-metil RNA<sup>8</sup>, LNA<sup>9,10</sup> o PNA<sup>11</sup>. Fins i tot s'han observat quàdruplex híbrids formats per 2 cadenes de DNA i 2 de PNA<sup>12</sup>.

### A.2 Estructura

El quàdruplex de G és una estructura tetracatenària que sorgeix de l'apilament espacial de dues o més tètredes de guanina. La tètreda n'és el motiu estructural bàsic i consisteix en la disposició planar de quatre guanines situades als vèrtexs d'un quadrat imaginari (fig. 1A). En ella, cada guanina forma 4 enllaços d'hidrogen, 2 amb cadascuna de les seves veïnes; d'aquesta manera cada guanina presenta dos grups

acceptors i dos grups donadors d'enllaç d'hidrogen. Finalment, la superposició de dues o més tètades és el que s'anomena quàdruplex de guanina<sup>13</sup> (fig. 1B).



**Figura 1** – Representació d'una tètada de guanines (A) i de tres tipus de quàdruplex de G (B): tetramolecular, bimolecular i unimolecular.

### A.2.1 Topologia

Els quàdruplex de G són estructures altament polimòrfiques. La gran diversitat estructural que presenten fa que per descriure un quàdruplex en concret siguin necessaris uns quants criteris de classificació. Aquests són bàsicament els següents:

- Molecularitat del quàdruplex.
- Orientació de les cadenes.
- Orientació dels bucles (*loops*).
- Conformació de les guanines.
- Presència d'altres tètades o estructures similars.

Segons el nombre de molècules de DNA que en formen part, els quàdruplex poden ser tetramoleculars (formats per quatre molècules de DNA), bimoleculars (dues molècules interaccionen entre elles, cadascuna de les quals forma una forqueta (*hairpin*) o unimoleculars (una sola molècula amb vàries regions riques en guanines es replega sobre sí mateixa donant lloc a una estructura tetracatenària). A la figura 1B es mostra un exemple de cada tipus de quàdruplex. Teòricament, també podrien existir quàdruplex trimoleculars (formats per tres molècules, una de les quals presentaria un *hairpin*), però fins ara no se n'ha observat cap.

Pel que fa referència a l'orientació relativa de les diferents cadenes que formen el quàdruplex, entenent per cadena el fragment de DNA que conté vàries guanines consecutives, aquesta pot ser paral·lela o antiparal·lela. Generalment s'ha vist que els quàdruplex tetramoleculars contenen les 4 cadenes paral·leles entre sí. Contràriament, la majoria de quàdruplex bi- i unimoleculars són antiparal·lels. L'orientació relativa de

les diferents cadenes ve determinada en última instància per l'orientació dels *loops*. En aquest context, s'entén per *loop* el fragment de DNA que uneix les diferents cadenes. Així, aquests poden trobar-se situats bé en un dels extrems del quàdruplex (superior o inferior) o bé en la zona externa d'aquest. En el primer cas es classifiquen en laterals (connecten cadenes adjacents en la tètada) i diagonals (connecten cadenes diagonalment oposades dins la tètada), podent-se trobar dos *loops* en extrems oposats o en el mateix extrem del quàdruplex. Pel que fa als *loops* externs, sempre connecten cadenes adjacents<sup>14</sup> (fig. 2).

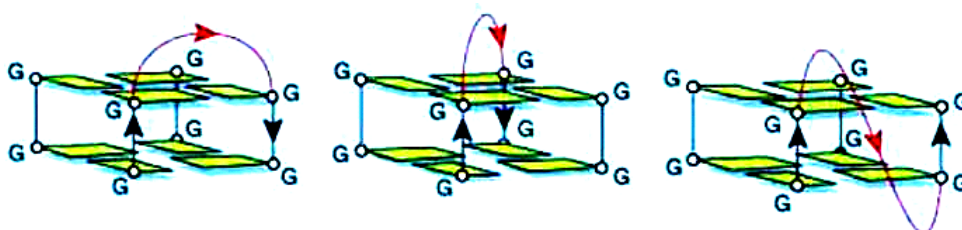


Figura 2 – Tres tipus de loops: lateral, diagonal i extern.

Respecte a la conformació de les guanines, aquestes poden ser *syn* o *anti*. Les dues conformacions difereixen en la disposició relativa de l'anell aromàtic de la guanina respecte a l'anell de desoxiribosa. En la conformació *syn*, el protó  $H_{1'}$  del sucre es troba molt pròxim en l'espai amb el protó  $H_8$  de la base nitrogenada. Per contra, en la conformació *anti* aquests dos àtoms es troben força més allunyats (fig. 3).

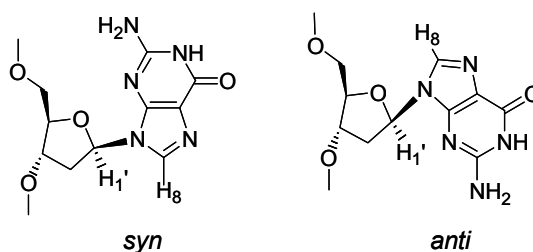
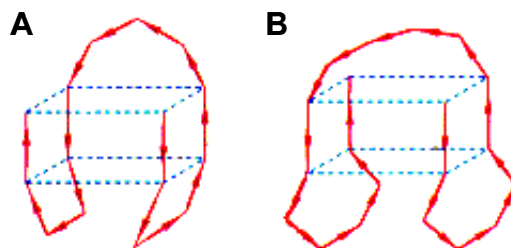


Figura 3 – Disposició relativa del sistema purínic respecte l'anell de desoxiribosa en les guanines *syn* i *anti*

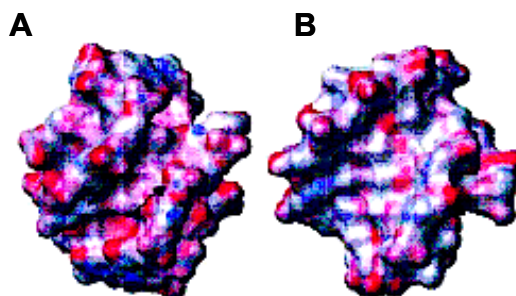
Hi ha dos tipus de quàdruplex intramoleculars força freqüents que han estat batejats amb noms concrets; aquests són el quàdruplex tipus cadira (*chair*) i el tipus cistella (*basket*) i bàsicament es diferencien entre ells per l'orientació del *loop*. Mentre que el quàdruplex tipus cadira presenta tres *loops* laterals, el tipus cistella en presenta un de diagonal. Aquest fet afecta a l'orientació relativa de les cadenes entre sí, així com també a la distribució de guanines *syn* i *anti* al llarg del quàdruplex. A la figura 4 es mostren esquemàticament aquests dos tipus de quàdruplex unimoleculars.



**Figura 4** – Esquelet de dos dels quàdruplex intramoleculars més típics: tipus cadira (A) i tipus cistella (B).

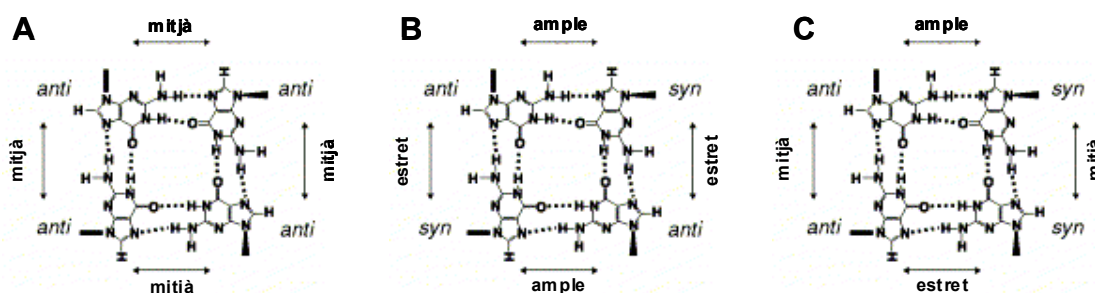
Finalment, cal comentar que les bases veïnes a les tètredes sovint s'apilen donant lloc a estructures planars inusuals per sí soles, com ara tríades, tètredes o fins i tot hèptades. Aquest fenomen ve induït per la gran estabilitat i planaritat de les tètredes de G. Així doncs s'han observat tètredes d'A<sup>15</sup>, de C<sup>16</sup>, d'U<sup>7</sup> i de T<sup>17</sup>, així com també mixtes G:C:G:C<sup>18</sup>. Algunes d'elles s'han observat apilades sobre la tètreda de G terminal d'un quàdruplex, mentre que d'altres s'han detectat també entre dues tètredes de G. És interessant veure com de vegades la formació d'aquestes altres tètredes pot dirigir la topologia general del quàdruplex. S'ha observat, per exemple, que la formació de tètredes G:C:G:C en l'oligonucleòtid **d(GCGGTGGAT)** és el que permet una associació de diferents quàdruplex al llarg d'un mateix eix, formant així una estructura supramolecular<sup>19</sup> basada en els quàdruplex de G. S'ha observat també l'existència d'estructures planars de major ordre com ara una hèptada G(:A):G(:A):G(:A):G, en l'estructura d'RMN de l'oligonucleòtid **d(GGA)<sub>4</sub>**<sup>20</sup>.

Els quàdruplex de G, igual que els dúplex i els tríplex, presenten un cert grau d'helicoïdalitat. Això obriria un nou criteri de classificació en el qual podria parlar-se de quàdruplex dextrògirs o levògirs. No obstant, tots els quàdruplex descrits fins el moment són dextrògirs. El fet de ser estructures tetracatenàries fa que els quàdruplex presentin 4 solcs, que poden ser de 3 tipus, anomenats solc ample, solc estret o solc mitjà. A diferència dels dúplex que sempre presenten un solc major i un de menor, els quàdruplex no sempre presenten els mateixos tipus solcs. A la figura 5, es mostra una imatge tridimensional d'un quàdruplex<sup>21</sup>, on s'observa la diferència existent entre els diferents solcs.



**Figura 5** – Representació del potencial electrostàtic a la superfície del quàdruplex format per **[d(G<sub>3</sub>T<sub>4</sub>G<sub>3</sub>)]<sub>2</sub>** on es pot observar el solc estret (A) i l' ample (B).

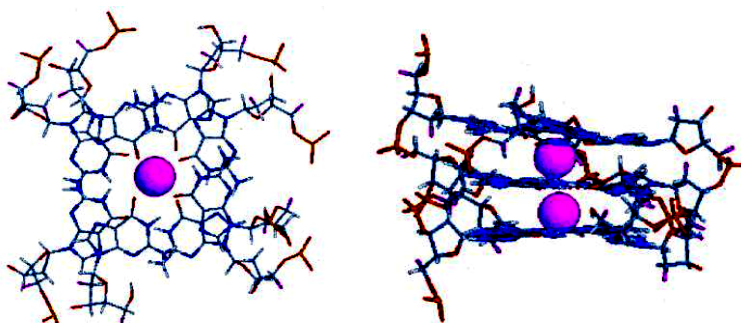
Quin tipus de solcs presenta cada quàdruplex en concret depèn bàsicament de la topologia general del quàdruplex, així com també de la conformació de les guanines que formen cada tètrada. Així per exemple, la majoria dels quàdruplex tetramoleculars, que són paral·lels i contenen totes les guanines en conformació *anti*, presenten quatre solcs mitjans equivalents entre ells. Tanmateix, els quàdruplex antiparal·lels tipus cadira solen presentar dos solcs estrets i dos d'amples situats de forma intercalada, i els quàdruplex tipus cistella dos de mitjans, un d'estret i un d'ample (fig. 6).



**Figura 6** – Distribució dels diferents solcs en funció del tipus de quàdruplex: paral·lel (A), cadira (B) i cistella (C).

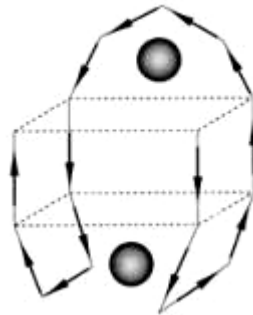
## A.2.2 Importància dels ions

En general, els quàdruplex de G són estructures força estables termodinàmicament i cinètica. Aquesta estabilitat és deguda en gran part a les interaccions  $\pi$ - $\pi$  existents entre les tètredes apilades, però també a la interacció que té lloc entre les tètredes i els cations presents en el medi. Així, per a la formació d'estructures quàdruplex sembla ser molt important la presència de cations metàl·lics. Aquests generalment se situen entre dues tètredes adjacents, interaccionant així amb els 8 oxígens de les guanines (O6) que formen les dues tètredes (fig. 7).



**Figura 7** – Localització típica dels ions en un quàdruplex de G.

Aquesta cavitat està considerada com el motiu més conservat entre els diferents tipus de quàdruplex. D'aquí que s'hagi dit que és la zona més important en la formació del quàdruplex, de manera que la disposició relativa entre les cadenes, els *loops* i la conformació de les guanines simplement responen a la creació d'aquesta cavitat perquè s'hi pugui col·locar un catió. S'ha observat últimament, però, que aquest no és l'únic lloc on es poden situar els cations, ja que alguns, com ara el  $\text{Na}^+$  (de radi iònic més petit que el  $\text{K}^+$ ), pot situar-se en diferents posicions al llarg de l'eix central del quàdruplex, per exemple en el mateix pla de la tètada<sup>22</sup>, coordinant-se així amb els quatre oxígens de les quatre guanines que la formen. També s'han observat ubicacions atípiques del catió  $\text{K}^+$ , com és el cas de l'estructura que forma la seqüència **d(GGTTGGTGTGGTTGG)**. En aquesta, la posició on es troben els ions no és entre les dues tètades sinó entre les tètades exteriors i els *loops*<sup>23</sup> (fig. 8).



**Figura 8** – Localització dels ions  $\text{K}^+$  en el quàdruplex tipus cadira format per la seqüència **d(GGTTGGTGTGGTTGG)**.

La posició que ocupen els ions en els quàdruplex és un tret diferencial d'aquests respecte altres estructures de DNA, ja que normalment els cations que interaccionen amb els àcid nucleics ho fan amb els grups fosfat que conformen l'esquelet nucleotídic. Una altra característica diferencial dels quàdruplex és la seva capacitat per discriminar entre els diferents cations. Així s'ha vist que, en general, el potassi estableix més aquestes estructures que el sodi o que l'amoni<sup>24</sup>. També s'ha observat que la formació de quàdruplex és possible en presència de cations divalents com ara el plom<sup>25</sup>, el calci<sup>26</sup> o l'estronci<sup>27</sup>. Els diferents cations no només confereixen a l'estructura més o menys estabilitat, sinó que molts cops s'ha observat que afavoreixen plegaments diferents o indueixen una transició entre diferents formes<sup>28</sup>. Per exemple, s'ha observat que l'addició de  $\text{Ca}^{2+}$  indueix la transició de quàdruplex antiparal·lel a quàdruplex paral·lel i la posterior estructuració d'aquests en forma de cables de  $\text{G}^5$  (superestructures formades per la superposició axial de diferents quàdruplex).

Hi ha hagut molts estudis enfocats a determinar els efectes que produeixen els diferents ions en les estructures quàdruplex. S'ha arribat a la conclusió general que la majoria de quàdruplex tetramoleculars i bimoleculars amb *loops* diagonals, es poden

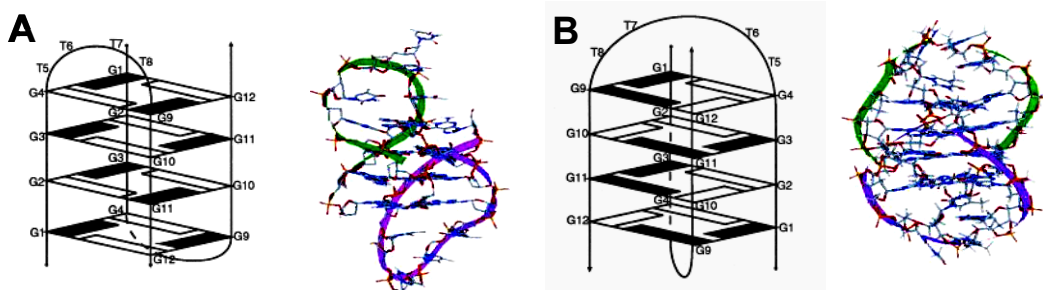
formar tant en presència de Na<sup>+</sup> com de K<sup>+</sup>. Tanmateix, els quàdruplex intramoleculars amb *loops* laterals es troben molt més afavorits en presència de potassi que en presència de sodi<sup>29</sup>. La majoria d'estudis realitzats fins el moment han estat duts a terme amb Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>, ja que són els cations més presents en el citosòl i en el medi cel·lular de molts organismes. Així, en molts dels casos s'han volgut reproduir o mimetitzar condicions fisiològiques iòniques per tal de poder demostrar la possible formació d'aquestes estructures *in vivo*.

### A.2.3 Tècniques usades per a l'estudi dels quàdruplex

Són moltes i força diverses les tècniques que s'utilitzen per a realitzar estudis estructurals i biofísics sobre quàdruplex de G. De totes maneres, per tal d'obtenir estructures tridimensionals d'alta resolució de molècules de DNA que formin quàdruplex, es pot recórrer únicament a dues d'elles: l'RMN o la difracció de raigs X. Actualment, mitjançant aquestes dues tècniques hi ha resoltes una cinquantena d'estructures quàdruplex, ja siguin de DNA (molt majoritàriament) o d'RNA. Aquestes es poden consultar tant al *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>) com al *Nucleic Acids Data Bank* (<http://ndbserver.rutgers.edu/>). Convé remarcar, no obstant, que encara que ambdues tècniques són molt potents per a la resolució d'estructures, de vegades els resultats que s'obtenen amb cadascuna d'elles són força diferents. Aquesta divergència és deguda principalment al fet que tot i estudiar la mateixa molècula, aquesta es troba en entorns molt diferents en funció de la tècnica emprada: en solució (RMN) o en cristalls (raigs X). Això comporta, de vegades, que algunes estructures puguin estar condicionades per forces d'empaquetament cristal·lí, o simplement que degut a aquestes forces, l'estructura cristal·lina més estable difereixi de l'estructura més estable en solució. També cal tenir en compte que les condicions experimentals usades en cada tècnica poden arribar a ser molt diferents, ja siguin la concentració salina, la força iònica, la concentració de DNA o la presència d'additius. Finalment, cal considerar que per raons tècniques tant en raigs X com en RMN, sovint s'usen substitucions puntuals de certes bases per anàlegs d'aquestes. Les més freqüents són les substitucions de T per U (uracil) o per <sup>Br</sup>U i les de G per I (inosina) o <sup>Br</sup>G. La presència de tals anàlegs pot, de vegades, afavorir una conformació diferent a la que formaria l'oligonucleòtid amb les bases naturals<sup>30</sup>.

Un exemple típic d'aquesta divergència entre els resultats obtinguts segons la tècnica usada es troba en el 12-mer **d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)**, l'estructura del qual ha estat resolta tant per raigs X<sup>31</sup> com per RMN<sup>32</sup> obtenint-se resultats diferents (fig. 9). En ambdós casos es tracta d'un quàdruplex bimolecular de quatre pisos. La diferència radica en els *loops*. En ambdues estructures els dos *loops* es troben situats en extrems oposats del quàdruplex, però mentre que en l'estructura de raigs X aquests són laterals, en la de RMN són diagonals. Això fa que les tètades de les dues estructures siguin diferents. En la de raigs X, les guanines estan disposades en cada tètada de la següent manera: G(*syn*)-G(*anti*)-G(*syn*)-G(*anti*). Contràriament, a la d'RMN la

disposició és  $G(\text{syn})\text{-}G(\text{syn})\text{-}G(\text{anti})\text{-}G(\text{anti})$ . Finalment, aquesta diferent disposició de les guanines dins les tètades fa que cada estructura tingui una diferent distribució de solcs (fig. 6). Recentment, ha estat resolta una altra estructura cristal·lina del mateix oligonucleòtid,  $d(\mathbf{G}_4\mathbf{T}_4\mathbf{G}_4)$ , que resulta ser pràcticament idèntica a l'obtinguda per RMN<sup>33</sup>.



**Figura 9** – Estructures quàdruplex resoltes mitjançant raigs X (A) i RMN (B) de l'oligonucleòtid  $[d(\mathbf{G}_4\mathbf{T}_4\mathbf{G}_4)]_2$ .

A part d'aquestes dues tècniques, n'hi ha també d'altres molt emprades en la detecció i l'estudi estructural dels quàdruplex. Aquestes són:

- Espectroscòpia UV: bàsicament s'usa per obtenir informació referent a l'estabilitat dels quàdruplex mitjançant experiments de fusió<sup>34,35</sup>.
- FRET: tècnica força recent pel que fa al seu ús en l'estudi dels quàdruplex. Permet extreure informació força similar a l'obtinguda mitjançant l'UV, però bé que aquesta és una tècnica molt més sensible i ràpida<sup>36,37,38</sup>.
- Dicroïsmes Circulars (DC): tècnica molt útil a nivell qualitatiu que no només permet posar de manifest la presència de quàdruplex en una mostra, sinó que a més a més, permet diferenciar entre estructures paral·leles i antiparal·leles<sup>39,40</sup>. Igual que l'UV i el FRET, el DC també permet realitzar estudis de fusió per tal d'obtenir informació sobre l'estabilitat dels quàdruplex.
- Electroforesi no desnaturant en gel de poliacrilamida (PAGE): permet detectar la presència de quàdruplex en una mostra de DNA i fer estudis comparatius sobre la tendència de certes molècules a facilitar la formació d'aquestes estructures<sup>41</sup>.
- Espectrometria de masses (MS): el seu ús en l'estudi estructural dels quàdruplex no està massa estès, però alguns cops s'ha usat per posar de manifest la presència de quàdruplex en una mostra de DNA<sup>42,43</sup>.

Hi ha també descrits a la literatura estudis estructurals concrets pels quals s'ha utilitzat la microscopia de força atòmica<sup>44</sup> o s'han realitzat experiments de *foot-printing*<sup>45</sup> o de platinació<sup>46,47</sup>.



## A.2.4 Polimorfisme

El terme quàdruplex de guanina no fa referència a una estructura concreta que poden adoptar una o varies molècules de DNA, sinó més aviat a una família d'estructures secundàries que presenten uns trets bàsics comuns, però que poden diferir força en l'estructura tridimensional global. Aquest alt grau de polimorfisme s'il·lustra a la taula 1, on es mostren esquemàticament les característiques d'algunes de les estructures quàdruplex resoltes fins al moment.

Seqüència	Catió	Polaritat	Conformació G <sup>a</sup>		Tècnica	ID <sup>b</sup>
			cadena	tètrada		
<b>d(TG<sub>4</sub>T)</b> <sup>48</sup>	Na <sup>+</sup>	↑↑↑↑	A-A-A-A	A/A/A/A	Raigs X	352d
<b>r(UG<sub>4</sub>U)</b> <sup>7</sup>	K <sup>+</sup>	↑↑↑↑	A-A-A-A	A/A/A/A	RMN	1 rau
<b>d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)</b> <sup>32</sup>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	↑↑↓↓	S-A-S-A	S/S/A/A	RMN	156d
<b>d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)</b> <sup>30</sup>	K <sup>+</sup>	↑↓↑↓	S-A-S-A	S/A/S/A	Raigs X	1d59
<b>d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)</b> <sup>31</sup>	K <sup>+</sup>	↑↑↓↓	S-A-S-A	S/S/A/A	RMN	1jrn
<b>d(G<sub>3</sub>T<sub>4</sub>G<sub>3</sub>)</b> <sup>49</sup>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	↑↑↓↓	S-S-A S-A-A	S/S/A/A	RMN	1fqp
<b>d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>)<sub>3</sub>G<sub>4</sub></b> <sup>50</sup>	Na <sup>+</sup>	↑↑↓↓	S-A-S-A	S/S/A/A	RMN	201d
<b>d(G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>TGTG<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>)</b> <sup>51</sup>	K <sup>+</sup>	↑↓↑↓	S-A	S/A/S/A	RMN	148d
<b>d(AG<sub>3</sub>(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)</b> <sup>52</sup>	Na <sup>+</sup>	↑↑↓↓	A-S-A S-A-S	S/S/A/A	RMN	143d
<b>d(T<sub>2</sub>G<sub>4</sub>)</b> <sup>53</sup>	Na <sup>+</sup>	↑↓↑↑	S-A-A S-S-A	S/S/S/A A/S/A/A	RMN	186d
<b>d(TAGGGTTAGGGT)</b> <sup>54</sup>	K <sup>+</sup>	↑↑↑↑	A-A-A	A/A/A/A	Raigs X	1k8p
<b>d(AG<sub>3</sub>(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)</b> <sup>51</sup>	K <sup>+</sup>	↑↑↑↑	A-A-A	A/A/A/A	Raigs X	1kf1

**Taula 1** – Característiques estructurals bàsiques de diversos quàdruplex de G descrites a la literatura. <sup>a</sup> S i A es refereixen a *syn* i *anti* respectivament. <sup>b</sup> ID és l'identificador de les estructures en el protein data bank.

Es fa molt difícil poder racionalitzar tot aquest polimorfisme, i és pràcticament impossible poder predir quin tipus de quàdruplex adoptarà una seqüència concreta de DNA. Això és degut als múltiples factors que influeixen en el procés de formació del quàdruplex i en la seva estabilització. Factors com ara la concentració de DNA, la concentració o el tipus de cations, el nombre de guanines consecutives que formen les diferents cadenes i el nombre de cadenes que es troben en una mateixa seqüència, la llargada i la seqüència dels *loops*, la possibilitat o no de formació de parells Watson-Crick entre bases no consecutives, ....

Un clar exemple el podem trobar en la seqüència **d(G<sub>3</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)**. L'estructura d'aquest oligonucleòtid ha estat resolta recentment per RMN<sup>55</sup> i presenta una estructura molt diferent a la que forma una seqüència molt similar: **d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>3</sub>)**<sup>56</sup>.

Això no obstant, sembla ser que existeixen certes tendències generals com ara que les estructures replegades (uni o bimoleculares) són més favorables cinèticament, i que altes concentracions de cations afavoreixen les estructures tetramoleculares, ja que desestabilitzen els *loops*. Tal i com seria d'esperar, altes concentracions de DNA també afavoreixen estructures tetramoleculares. Finalment, sembla ser també, que els *loops* paral·lels estan afavorits quan hi ha condicions que permeten la formació de *hairpins* (parells Watson-Crick intramoleculares) i que els *loops* diagonals es formen majoritàriament a concentracions elevades de DNA, tenint lloc en primera instància l'associació de cadenes diferents i posteriorment la formació d'aquests<sup>20</sup>.

### A.3 Presència dels quàdruplex *in vivo*

L'existència dels quàdruplex *de G in vivo* és una de les grans qüestions que encara queden per confirmar. Sobre aquest tema s'han de tenir en compte alguns factors que podrien dificultar la formació d'aquestes estructures dins la cèl·lula. Aquests bàsicament són<sup>57</sup>:

- La majoria del DNA es troba formant dúplex durant gran part del cicle cel·lular.
- El DNA genòmic es troba molt sovint unit a proteïnes, ja siguin no-específiques (histones) o específiques (factors de transcripció).
- La formació de quàdruplex és generalment de cinètica molt lenta.

Malgrat aquestes consideracions, existeixen múltiples evidències indirectes de la seva presència. Hi ha diversos grups de recerca treballant en el desenvolupament de nous sistemes de tinció per a la detecció de quàdruplex en cèl·lules i, per tant, per poder demostrar inequívocament la seva existència *in vivo*. En aquest sentit cal destacar experiments realitzats amb varies porfirines<sup>58</sup>, i amb un derivat de carbazole<sup>59</sup> demostrant *in vitro* la seva capacitat per tenyir específicament les estructures quàdruplex de G. Aquestes molècules interaccionen amb els quàdruplex produint-se un increment en la seva fluorescència. Així doncs, aquestes molècules no només podrien ser útils en la tinció de gels d'electroforesi, sinó també com a biosensors en microscopia de fluorescència, per tal d'observar la presència i la localització dels quàdruplex dins la cèl·lula. En ambdós casos l'especificitat no només resideix en el tipus d'estructura secundària, sinó també en la topologia, ja que en ambdós casos el tint pot discriminar entre quàdruplex paral·lels i antiparal·lels. Aquest diferent reconeixement segurament és possible, gràcies als diferents tipus de solcs que presenten els diferents tipus de quàdruplex.

S'ha dut a terme també, el desenvolupament de dos anticossos específics capaços de reconèixer quàdruplex de G<sup>60</sup>. Aquests han estat dirigits al reconeixement de quàdruplex formats per les seqüències telomèriques dels organismes ciliats *Oxytricha* i *Stylonychia* (**T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>**)<sub>n</sub> i s'ha observat que presenten unes afinitats de l'ordre

picomolar. Mentre que un dels anticossos presenta una alta selectivitat pels quàdruplex paral·lels, l'altre reconeix tots els quàdruplex amb la mateixa afinitat. Aquests anticossos han estat provats en cèl·lules d'*Stylonychia lemnae* observant-se reacció amb el macronucli, però no amb el micronucli. Aquests resultats suggereixen la presència de quàdruplex antiparal·lels en el macronucli, i més concretament en els extrems telomèrics. La reacció dels anticossos en els nuclis de *Stylonychia* ha estat detectada per estudis indirectes d'immunofluorescència.

Amb tots aquests estudis, la presència de quàdruplex de G *in vivo*, es considera actualment més que probable, i comença a ser força acceptada en el sí de la comunitat científica. Tanmateix és cert que encara falta una evidència directa i inequívoca que corrobori totes les especulacions realitzades.

### A.3.1 Proteïnes que interaccionen amb quàdruplex

En els últims anys, una de les evidències indirectes que més pes ha tingut a l'hora de fer especulacions sobre l'existència dels quàdruplex *in vivo*, ha estat el descobriment de proteïnes capaces d'interaccionar selectivament o específicament amb quàdruplex de guanina<sup>61</sup>. D'entre totes aquestes cal destacar:

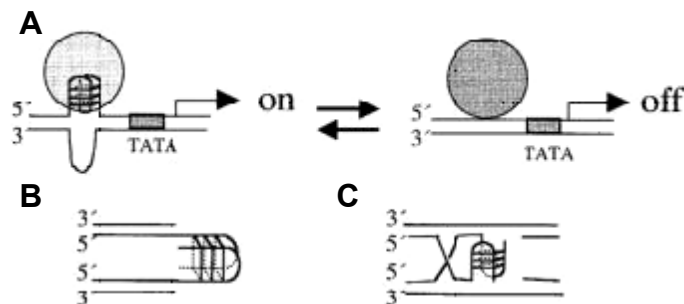
- Subunitat  $\beta$  de la proteïna d'unió al telòmer de l'*Oxytricha nova*<sup>62</sup>: promou *in vitro* la formació de quàdruplex, accelerant la cinètica del procés de l'ordre de  $10^4$  a  $10^6$ .
- Rap1<sup>63</sup>: proteïna telomèrica del llevat que no només reconeix i s'uneix als quàdruplex sinó que també n'afavoreix la seva formació.
- Helicasa codificada pel gen BLM<sup>64</sup>: desenrotlla estructures quàdruplex molt més ràpidament que estructures dúplex, de manera que fins i tot s'ha proposat que el seu substrat natural podrien ser els quàdruplex.
- Helicasa codificada pel gen WRN<sup>65</sup>: desenrotlla quàdruplex de G quan aquests presenten un fragment monocadena en algun dels extrems (3' o 5'). No actua sobre quàdruplex tetramoleculars.
- Sgs1<sup>66</sup>: proteïna del llevat que desenrotlla els quàdruplex (paral·lels o antiparal·lels) molt més eficientment que els dúplex.
- Helicasa del virus SV40 T-antigen<sup>67</sup>: enzim capaç de desenrotllar tant quàdruplex tetramoleculars com bimoleculars, formats en presència de  $\text{Na}^+$  però no de  $\text{K}^+$ .
- Topoisomerasa I<sup>68</sup>: proteïna humana que reconeix els quàdruplex i permet la seva formació en condicions en què aquesta no es troba afavorida.
- Hop1<sup>69</sup>: enzim del llevat involucrat en la formació del complex sinaptonemal durant la meiosi que s'uneix als quàdruplex amb una afinitat tres ordres de magnitud superior que als dúplex.

Com es pot observar, la majoria d'aquestes proteïnes interaccionen amb els quàdruplex *in vitro* facilitant-ne la seva formació o bé la seva resolució. La lenta cinètica d'ambdós processos quan no hi intervenen factors externs, havia fet qüestionar seriosament la possibilitat de que realment els quàdruplex poguessin existir *in vivo* i/o desenvolupar algun rol cel·lular important. Ara, però, després d'aquests descobriments, fins i tot s'ha especulat que els quàdruplex podrien formar-se i desenrotllar-se amb tota normalitat al llarg del cicle cel·lular.

### A.3.2 Possibles papers biològics dels quàdruplex

Descrits per primera vegada l'any 1962, els quàdruplex de guanina van romandre com una curiositat objecte d'estudi dels biofísics durant gairebé 25 anys. Fou ben entrada la dècada dels 80 quan es va començar a pensar que aquestes estructures podrien estar relacionades amb processos biològics i cel·lulars d'extrema importància. Aquestes especulacions van sorgir com a conseqüència del descobriment de l'existència de diverses regions no-codificants i altament riques en guanines en els genomes de diversos organismes. Aquestes regions són els telòmers (o extrems cromosòmics), regions promotores de certs oncogens, regions reguladores de les immunoglobulines i regions satèl·lits, entre d'altres. S'han publicat múltiples estudis estructurals sobre la majoria d'aquestes seqüències on es demostra que poden estructurar-se en forma de quàdruplex *in vitro*<sup>70</sup>. De fet, la majoria d'estructures quàdruplex resoltes, ja sigui per RMN o per raigs X, provenen de fragments d'aquestes seqüències, i majoritàriament de seqüències telomèriques de diversos organismes.

La formació de quàdruplex en els extrems cromosòmics podria formar part del mecanisme molecular a través del qual els telòmers asseguren l'estabilitat cromosòmica. Tanmateix, a part del paper que puguin desenvolupar els quàdruplex en el manteniment de la integritat telomèrica, s'han proposat altres processos biològics en els quals aquestes estructures podrien estar implicades, jugant-hi un paper rellevant (fig. 10).



**Figura 10** – Esquema de la possible formació de quàdruplex de G en els processos de regulació transcripcional (A), aparellament de cromàtides germanes (B) i recombinació (C).

Referent a la regulació transcripcional de cert gens, sembla ser que la presència de quàdruplex en la regió promotora podria servir com a senyal per tal d'iniciar la transcripció del gen en qüestió (fig.10A). D'aquesta manera els quàdruplex de G formarien part de sistemes de transducció de senyal. Finalment, s'ha proposat que la formació momentània de quàdruplex pot ser molt important en l'aparellament de cromàtides germanes durant la meiosi (fig. 10B) o en processos de recombinació (fig. 10C).

La presència de quàdruplex de G tant en els telòmers com en processos de recombinació pot venir facilitada per la presència momentània de fragments de DNA monocatenari. No obstant, la presència de quàdruplex en les regions promotores de cert gens no és gens trivial, ja que aquestes zones es troben generalment formant dúplex. Recentment, s'han realitzat molts estudis sobre la transició dúplex-quàdruplex per tal de veure en quines condicions pot tenir lloc<sup>71,72,73</sup>. En aquests estudis queda clar que és perfectament possible l'estructuració transitòria de certes seqüències en forma de quàdruplex fins i tot en presència de les seves seqüències complementàries. Aquest fet podria venir facilitat, en part, per l'estructuració de la cadena complementària (rica en C) en forma *d'i-motif*<sup>74</sup>. Així, les tres estructures (quàdruplex, *i-motif* i dúplex) es trobarien en un equilibri que pot desplaçar-se en funció de la temperatura, el pH o de la interacció específica amb molècules que estabilitzin alguna d'aquestes estructures, com ara certes proteïnes. Per tal de racionalitzar aquest equilibri, s'han arribat a elaborar uns diagrames de fases en funció de la temperatura i del pH, per a algunes de les seqüències estudiades<sup>69</sup>.

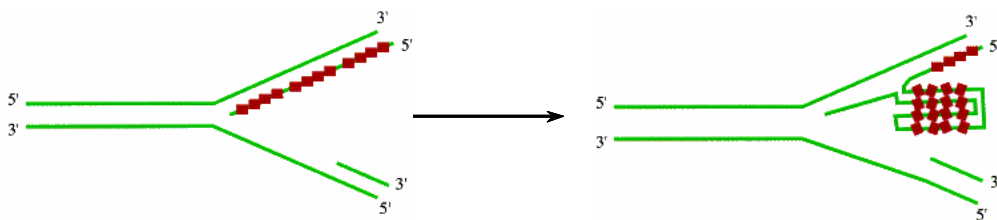
### A.3.3 Implicacions dels quàdruplex de G en certes disfuncions

A part de poder tenir papers biològics d'extrema importància per l'esdevenir de la cèl·lula, la formació de quàdruplex ha estat també relacionada amb el desenvolupament de vàries malalties<sup>75</sup>.

Els síndromes de Bloom i Werner són malalties degudes a defectes en proteïnes de la família de les helicases RecQ dependents d'ATP. Concretament el síndrome de Bloom està causat per defectes en el gen BLM i el de Werner en el WRN. Aquests síndromes estan associats a diversos símptomes, per bé que tots tenen en comú una alta inestabilitat genètica, que s'observa per defectes en els cromosomes i per deleció d'alguns gens<sup>76</sup>. La funció de les helicases RecQ és desenrotllar el DNA en la direcció 3' → 5' i s'ha proposat que poden jugar un paper important durant la replicació i transcripció, desenrotllant possibles estructures quàdruplex que poden formar-se al llarg d'aquests processos. La formació i no-resolució de quàdruplex podria conduir a errors tant en la replicació com en la transcripció. A la figura 11 es mostra esquemàticament com es podrien formar estructures quàdruplex durant la replicació. Aquest procés estaria afavorit per la presència momentània de DNA monocatenari.

El síndrome del cromosoma X fràgil és la causa més important del retràs mental hereditari. Aquesta malaltia està causada per l'expansió del triplet **d(CGG)** en

la regió no traduïda del gen FMR1. Mentre que en les persones sanes es troben entre 5 i 50 repeticions d'aquest triplet, en les portadores de la malaltia se n'hi poden trobar de l'ordre de 250 i en les malaltes fins a 2000. L'expansió d'aquest triplet comporta la metilació anormal del DNA, així com també la repressió de la transcripció de la proteïna codificada pel gen FMR, molt present en les neurones i que participa en el transport i en la traducció de l'RNA missatger (mRNA). S'han realitzat nombrosos estudis sobre les propietats del triplet **d(CGG)** i s'ha vist que pot estructurar-se en forma de quàdruplex de guanina en condicions fisiològiques. Així doncs, la formació de quàdruplex durant la transcripció i o replicació d'aquest gen, en un procés anomenat *slippage* (fig.11), seria la causa de l'expansió del triplet<sup>77,78,79</sup>.



**Figura 11** – Formació aberrant de quàdruplex durant la replicació del DNA: procés d'*slippage*.

S'ha comentat anteriorment que els quàdruplex de G poden intervenir en processos de recombinació, facilitant l'aparellament de cromàtides germanes per tal de formar el que s'anomena complex sinaptonemal. En aquest sentit, s'ha observat que varies de les proteïnes implicades en aquest procés (Hop1 o l'helicasa Sgs1) presenten una elevada afinitat per aquestes estructures. Tanmateix, la formació de quàdruplex no-desitjats com a conseqüència de defectes en aquestes proteïnes, podria comportar errors en el procés donant lloc a recombinacions il·legítimes o fins i tot formant cromosomes quadriradials.

Finalment, els quàdruplex de G han estat molt relacionats amb el càncer. No només degut al seu probable paper regulador en la transcripció de certs oncogens, com ara el *c-myc*<sup>80,81</sup>, sinó també per la seva participació en els processos biològics presents en els extrems telomèrics. D'aquesta qüestió se'n tractarà amb més profunditat més endavant, ja que forma part del tema principal de la present tesi.

### A.3.4 Quàdruplex de G com a agents terapèutics

En alguns casos s'ha trobat que els mateixos quàdruplex de G poden actuar com a agents terapèutics. Dins d'aquest camp cal mencionar dos exemples: els aptàmers<sup>82</sup> (molècules d'RNA o de DNA que s'uneixen específicament a una diana molecular) i els oligonucleòtids inhibidors del virus HIV.

Un dels primers quàdruplex estudiats va ser el format per la seqüència **d(G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>TGTG<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>)**. Aquest fragment de DNA és un aptàmer de la trombina i

s'anomena TBA (*Trombin Binding Aptamer*). Fou identificat en una selecció *in vitro* en busca de molècules que presentessin un alt grau de reconeixement per aquesta proteïna<sup>83</sup>. El TBA fou la molècula que presentà una afinitat més elevada (de l'ordre nanomolar) i s'uneix específicament a la trombina provocant-ne la seva inhibició. Aquest 15-mer s'estructura en presència de  $K^+$  formant un quàdruplex unimolecular de tipus cadira<sup>84</sup>. L'estructura terciària de l'aptàmer és la responsable de la seva capacitat de reconeixement i interacció amb la trombina, com s'ha pogut observar en l'estructura cristal·lina del complex TBA-trombina<sup>85</sup>.

Per altra banda, alguns oligonucleòtids rics en guanina són capaços d'inhibir certs processos biològics del virus HIV, responsable de la SIDA. Aquests oligonucleòtids es troben entre els inhibidors més potents del virus, presentant unes  $IC_{50}$  de l'ordre nanomolar. D'una banda l'oligonucleòtid **d(T<sub>2</sub>G<sub>4</sub>T<sub>2</sub>)** amb esquelet de fosforotioat és capaç d'inhibir el procés d'adsorció del virus sobre la cèl·lula hoste<sup>86</sup>. Per altra, els oligonucleòtids **d(GTG<sub>2</sub>TG<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>T)**, **d(G<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>T)** i **d(G<sub>4</sub>TG<sub>3</sub>AG<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>T)** inhibeixen la integrasa vírica<sup>87,88,89</sup>. S'ha analitzat la interacció del virus amb aquests oligonucleòtids i s'ha comprovat que l'estructuració d'aquests en forma de quàdruplex de G és molt important per tal de que es produeixi la inhibició<sup>90</sup>.

#### A.4 Quàdruplex de G com a diana terapèutica

S'ha comentat anteriorment l'elevat polimorfisme que exhibeix aquesta estructura secundària de DNA, podent presentar, en certes condicions, equilibris entre diversos tipus de quàdruplex. Per altra banda, també s'ha fet referència als equilibris dinàmics que poden tenir lloc dins la cèl·lula entre dúplex i quàdruplex, o fins i tot entre fragments de DNA monocadena i quàdruplex. Tots aquests equilibris, a més a més, es troben relacionats amb la possibilitat que els quàdruplex puguin intervenir *in vivo* en processos cel·lulars tan importants com ara la protecció cromosòmica i/o la transducció de certes senyals. Així doncs, s'ha despertat un enorme interès en la cerca de molècules que puguin no només interaccionar amb algun tipus de quàdruplex, sinó també afectar l'equilibri dúplex  $\rightleftharpoons$  quàdruplex  $\rightleftharpoons$  DNA monocadena. Així, els quàdruplex poden ser considerats com una nova diana terapèutica en la cerca de nous fàrmacs pel tractament de diverses malalties<sup>91,92</sup>. L'augment de l'interès pels quàdruplex i per la cerca de molècules que interaccionin amb ells, ha anat força lligada als descobriments que s'han anat realitzant en el camp de la biologia molecular amb el sistema biològic de protecció cromosòmica (telòmers-telomerasa). D'aquí que la gran majoria de molècules de les quals s'ha descrit una interacció amb els quàdruplex de G, s'han avaluat com a possibles inhibidors de la telomerasa.

## B. Telòmers, telomerasa i càncer

### B.1 Telòmers

#### B.1.1 Constitució dels telòmers

Els telòmers són els extrems lineals dels cromosomes en les cèl·lules eucariotes. Són regions no-codificants del genoma que estan unides a diverses proteïnes donant lloc a unes estructures nucleoprotèiques força complicades. La mida dels telòmers és variable, però en el cas de les cèl·lules humanes pot arribar als 25000 parells de bases. El DNA telomèric està format, en la direcció 5' → 3', per múltiples repeticions consecutives d'una seqüència curta (de 6 a 8 nucleòtids, depenent de l'espècie) i rica en guanines anomenada seqüència telomèrica<sup>93</sup>. En la majoria de casos els telòmers estan formats per perfectes repeticions de tal seqüència, com en el cas dels mamífers (TTAGGG)<sub>n</sub><sup>94,95</sup>. Hi ha organismes, però, en els quals els telòmers estan constituïts per repeticions irregulars, sense tenir una seqüència telomèrica invariable. Dins aquest segon grup s'hi troben bàsicament els llevats, com per exemple el *Saccharomyces cerevisiae* (TG<sub>1-3</sub>)<sub>n</sub><sup>96</sup>. A la taula 2 es mostren les seqüències telomèriques de diverses espècies<sup>97</sup>.

Com es pot observar, les seqüències telomèriques es troben força conservades entre espècies molt diferents, presentant com a característica comú la presència majoritària de guanines i, en menor mesura, de timines. La funció principal dels telòmers és la de mantenir l'estabilitat i la integritat dels cromosomes, protegint els seus extrems vers possibles recombinacions aberrants, així com també vers la possible degradació per part d'exonucleases<sup>98</sup>. El fet que els telòmers desenvolupin la mateixa funció en totes les espècies i que presentin un grau de conservació tan elevat entre totes elles, fa pensar que els mecanismes moleculars a través dels quals desenvolupen la seva funció haurien de ser també força similars<sup>99</sup>.

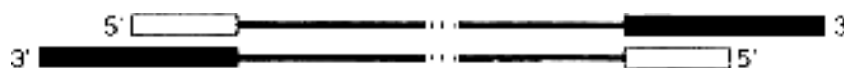
<b>Seqüències telomèriques</b>		
Mamífers:	<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG
Fongs:	<i>Neurospora</i>	
Mixomicets:	<i>Physarum, Didymium</i>	
Protozous:	<i>Trypanosoma, Crithida</i>	
Ciliats:	<i>Tetrahymena, Glaucoma</i>	TTGGGG
	<i>Paramecium</i>	TTGGG(G/T)
	<i>Oxytricha, Euplotes</i>	TTTTGGGG
Plantes superiors:	<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG
Algues:	<i>Chlamydomonas</i>	TTTTAGGG
Llevats:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TG <sub>(1-3)</sub>
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	TTAC(A)G <sub>(2-5)</sub>

**Taula 2** – Seqüències telomèriques de diverses espècies.



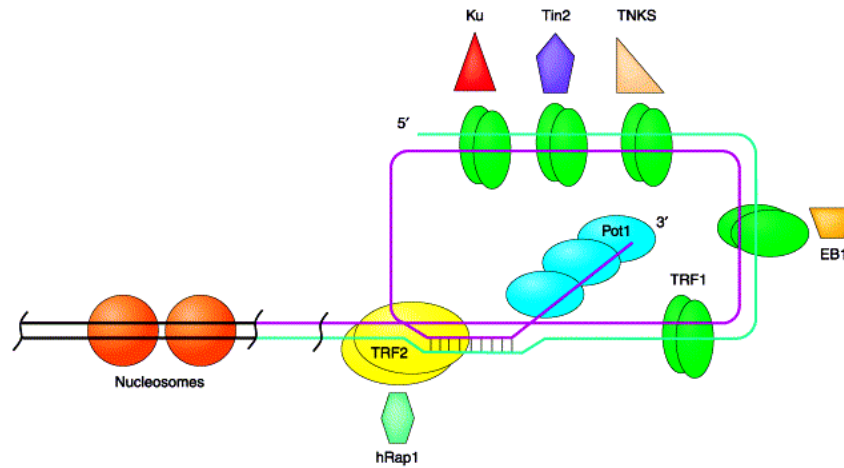
## B.1.2 Estructura i funció

Tot i que la major part del DNA telomèric es troba estructurat en la forma canònica de dúplex Watson-Crick, s'ha observat que sempre hi ha un fragment de DNA monocatenari en l'extrem 3' que sobresurt respecte la seva cadena complementària<sup>100</sup> (fig. 12). Aquest fragment pot constar des d'unes 12 o 16 nucleobases (un parell de repeticions telomèriques) fins a unes 200. Sembla ser que mantenir-ne la seva integritat és essencial per l'esdevenir de la cèl·lula, que altrament podria patir fusions entre diferents cromosomes, cosa que comportaria inestabilitat genòmica i acabaria conduint a la mort cel·lular<sup>101</sup>. Així doncs, la cèl·lula ha de tenir certs mecanismes pels quals els extrems telomèrics, i més concretament aquest fragment monocatenari, no siguin reconeguts com a molècules de DNA danyades per la maquinària cel·lular de reparació d'àcids nucleics.



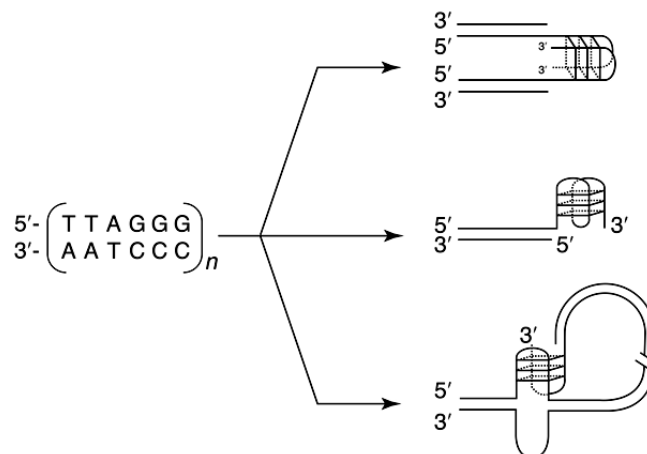
**Figura 12** – Esquema d'un cromosoma on les zones de caixes representen els telòmers.

S'ha observat mitjançant la microscopia electrònica, que *in vitro*, aquest fragment es replega sobre el sí del mateix telòmer desplaçant part del DNA telomèric bicatenari i introduint-se entre el dúplex. Un cop doblegat, certs experiments posen de manifest la formació d'un nou dúplex entre aquest fragment i la seva cadena complementària. La formació de tal estructura, anomenada *t-loop* (bucle-t), podria ser un dels mecanismes pels quals els telòmers actuen com a protectors cromosòmics<sup>102</sup>. D'aquesta manera, el fragment no quedaria exposat i per tant no podria ser reconegut ni per les exonucleases ni per la maquinària de reparació del DNA. Un altre factor que sembla ser també molt important en el manteniment de la integritat dels telòmers és la presència de tot un reguitzell de proteïnes (específiques i no-específiques) unides al DNA telomèric. D'entre elles cal destacar-ne algunes com ara TRF-1, TRF-2, Ku, TIN-2, Rap1 i Pot1<sup>103</sup>. A la figura 13 es mostra de forma esquemàtica la complexa estructura del telòmer humà formant un *t-loop*.



**Figura 13** – Representació esquemàtica de l'extrem del telòmer estructurat formant un *t-loop*.

Convé ressaltar però, que els telòmers són regions dinàmiques i que aquesta estructura de *t-loop* només es troba present en algunes fases del cicle cel·lular<sup>104</sup>. És per això que la presència del *t-loop* no és incompatible amb teories anteriors, en les quals es creia que la formació d'estructures quàdruplex de G en els extrems telomèrics era el mecanisme pel qual els telòmers exercien la funció de protecció cromosòmica. Tanmateix, no està gens clar que en la formació del mateix *t-loop* no hi participin, d'alguna manera, estructures quàdruplex. A la figura 14 es mostren algunes de les estructures quàdruplex que es poden formar en els telòmers.



**Figura 14** – Estructures quàdruplex de G als extrems telomèrics.

### B.1.3 Escurçament

Durant l'etapa de duplicació del DNA (abans de la divisió cel·lular), els cromosomes no poden ser replicats en la seva totalitat, de manera que els extrems telomèrics es van escurçant després de cada cicle cel·lular<sup>105</sup>. Aquest fenomen,

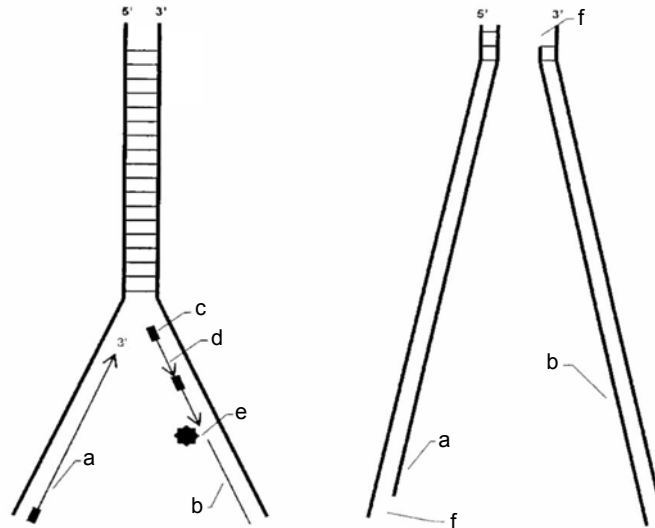
anomenat “problema de la replicació telomèrica”, és degut bàsicament a dues característiques intrínseques del mecanisme d'acció de les polimerases:

- La seva unidireccionalitat: només són capaces de sintetitzar una nova cadena de DNA en la direcció 5' → 3'.
- La necessitat d'un iniciador (*primer*): requereixen la presència d'una molècula de DNA aparellada amb la seva complementària a la qual anar afegint nucleòtids.

### B.1.3.1 El problema de la replicació telomèrica

La duplicació del DNA és un procés molt complex i d'extrema importància, ja que permet fer una còpia de tot el material genètic abans de procedir a la divisió cel·lular. Degut a la unidireccionalitat en la síntesi que presenten les polimerases, la duplicació es realitza de forma diferent per a cada cadena.

Per tal que es dugui a terme la síntesi de noves molècules de DNA, les dues cadenes que formen el cromosoma es van separant progressivament formant-se el que s'anomena forquilla de replicació. Aquesta separació permet a les polimerases actuar sintetitzant les dues noves cadenes oligonucleotídiques. A mesura que avança la replicació, la forquilla es va movent al llarg del cromosoma per tal de fer accessible tot el DNA a les polimerases. Un cop separades les dues cadenes, en primer lloc actua un enzim anomenat DNA primasa, que és el responsable de sintetitzar petits fragments d'RNA que actuaran d'iniciadors. Seguidament, les DNA polimerases comencen a sintetitzar les dues noves cadenes. Una d'aquestes, anomenada *leading*, és sintetitzada de forma continua en la direcció 5' → 3', i només requereix la presència d'un fragment d'RNA a l'inici de la replicació. Contràriament, per a la síntesi de l'altra, anomenada *lagging*, es necessiten múltiples fragments d'RNA que es van situant en intervals d'uns 200 nucleòtids. Cada iniciador és allargat per la polimerasa fins a trobar-se amb el següent, unit a l'extrem 5' de la cadena ja sintetitzada. En aquest moment, entren en acció mecanismes cel·lulars de reparació d'àcids nuclèics que eliminen els fragments d'RNA i els substitueixen per DNA. Finalment, i per acabar el procés, una DNA lligasa uneix els diferents fragments de DNA entre ells donant lloc a la nova cadena oligonucleotídica. Quan el fragment d'RNA de l'extrem 5' de cadascuna de les cadenes filles és eliminat, aquest no pot ser reemplaçat per DNA, produint-se, no només una pèrdua neta de nucleòtids a cada cicle de divisió cel·lular, sinó també l'aparició del fragment monocatenari a l'extrem 3' dels telòmers<sup>106,107</sup>. Tot aquest procés es mostra esquematitzat a la figura 15



**Figura 15** – Mecanisme de duplicació del DNA on s'observa les cadenes leading (a) i lagging (b), els iniciadors d'RNA (c), els fragments de DNA (d), que són units per la DNA lligasa (e) i els fragments monocadena que queden als extrems després de la duplicació (f).

### B.1.3.2 Senescència i mort cel·lular

L'escurçament telomèric es produeix a una velocitat d'unes 50-100 bases per cicle, i és directament proporcional a la longitud del fragment monocatenari<sup>108</sup>. Després de múltiples cicles cel·lulars, arriba un moment en que els cromosomes d'una cèl·lula tenen els telòmers extremadament curts i aquesta no pot continuar replicant-se. Llavors s'entra en un estat estacionari anomenat de senescència. Convé remarcar que en una mateixa cèl·lula la mida dels telòmers no és la mateixa entre els diferents cromosomes, així doncs, l'entrada a l'estat de senescència vindrà determinat per la mida del telòmer més curt de la cèl·lula. En aquest estadi, les cèl·lules han perdut ja la seva capacitat per duplicar-se i són molt susceptibles de patir el fenomen de l'apoptosi, altrament anomenat mort cel·lular programada. I és que si la cèl·lula es continués duplicant, al cap de pocs cicles s'acabarien d'erosionar completament els telòmers i, al mancar-li la protecció, els extrems dels cromosomes podrien bé experimentar reaccions de fusió els uns amb els altres, o bé ser reconeguts com a DNA danyat. Sigui com sigui, ambdós processos durien la cèl·lula a patir una gran inestabilitat genòmica que la conduiria a un estat de crisi, desembocant finalment a la mort cel·lular<sup>109</sup>. Així doncs, la longitud dels telòmers d'una cèl·lula, està molt relacionada amb la capacitat que té aquesta per anar-se duplicant. És per això, que molt sovint s'ha considerat que la mida dels telòmers és el rellotge biològic que dona idea de la longevitat d'una cèl·lula: les cèl·lules joves són les que tenen telòmers llargs i, per tant, poden duplicar-se un gran nombre de vegades, mentre que les cèl·lules velles són aquelles que tenen telòmers curts i estan pròximes a entrar en estat de

senescència<sup>110</sup>. Hi ha, però, un enzim especialitzat capaç de contrarestar aquest escurçament: la telomerasa.

## B.2 La telomerasa

Descoberta a la dècada dels 80 per Greider i Blackburn en l'organisme ciliat *Tetrahymena*, la telomerasa és una ribonucleoproteïna especialitzada que és responsable del manteniment de la mida dels telòmers<sup>111,112</sup>. Posteriorment, s'ha vist que la majoria d'espècies eucariotes contenen aquest enzim, que consta de diversos components: una subunitat catalítica (*hTERT*<sup>\*</sup>), una part nucleotídica d'RNA (*hTR*<sup>\*</sup>) i varies proteïnes associades (Hsp90, p23, ...). La seva funció és la d'allargar els telòmers per addició de repeticions telomèriques en el seu extrem 3', evitant així l'escurçament d'aquests després de cada cicle cel·lular. La subunitat catalítica *hTERT* presenta activitat de transcriptasa inversa i utilitza un fragment de la part ribonucleotídica *hTR* com a motlle. S'han realitzat estudis estructurals força complets sobre *hTR*<sup>113,114,115</sup> i s'ha observat que tot i que consta de més de 400 nucleòtids, només 11 (<sup>3'</sup>**CAAUCCCAAUC**<sup>5'</sup>) actuen com a motlle (fragment complementari a la seqüència telomèrica). Pel que fa a les altres proteïnes associades a l'enzim i presents en el complex, sembla ser que són necessàries per a la formació d'aquest<sup>116</sup>, tot i que la seva funció exacta és encara, en molts casos, desconeguda.

La telomerasa només es mostra activada en aquelles cèl·lules que necessiten mantenir intacte la longitud dels telòmers. Aquestes, bàsicament són les cèl·lules de la línia germinal, les embrionàries i les cèl·lules proliferatives de teixits renovables com ara els limfòcits o les cèl·lules hematopoietiques. Així doncs, aquestes cèl·lules es poden anar dividint il·limitadament sense patir inestabilitat genòmica, esdevenint així "immortals". Per contra, les cèl·lules somàtiques normals no presenten activitat telomerasa, cosa que implica que els seus telòmers es van erosionant fins a arribar a la longitud crítica en que aquestes cèl·lules entren en estat de senescència.

### B.2.1 Mecanisme d'acció

El mode d'acció a través del qual té lloc la síntesi *de novo* de múltiples repeticions telomèriques sembla ser que consta principalment de quatre etapes. (fig. 16). Primerament, té lloc la formació del complex enzimàtic (*hTERT*, *hTR* i proteïnes associades). Llavors, l'extrem 3' del telòmer reconeix els 5 nucleòtids situats a l'extrem 3' de la seqüència complementària present en *hTR*, donant lloc a un heterodúplex DNA-RNA. Seguidament, *hTERT* catalitza l'elongació de la cadena nucleotídica mitjançant l'addició de nucleòtids a l'extrem 3' del telòmer. Aquest procés és possible gràcies al fragment d'11 nucleòtids d'*hTR* que actua de motlle. Un cop incorporats 6 nucleòtids té lloc una translocació del DNA telomèric acabat de sintetitzar respecte el

<sup>\*</sup> *h* fa referència a l'enzim en l'espècie humana

motlle d'RNA, per tal que la telomerasa pugui continuar l'elongació. Aquestes dues últimes etapes d'elongació i translocació es van repetint fins que el telòmer assoleix la longitud adequada. Amb tot aquest procés només s'aconsegueix allargar l'extrem 3' del telòmer; posteriorment, la cadena complementària, de seqüència rica en citosines, serà allargada per les polimerases mitjançant el procés estàndard de duplicació del DNA.

La regulació de la síntesi telomèrica és força complicada<sup>117</sup> i es du a terme a través de múltiples mecanismes cel·lulars, un dels més importants dels quals és el control de l'expressió del gen que codifica per *hTERT*<sup>118</sup>. Així doncs, s'ha vist que en cèl·lules somàtiques normals, en les quals no s'observa activitat telomerasa, la proteïna *hTERT* no és expressada mentre que sí s'hi troben tant la part ribonuclèica com les altres proteïnes associades. En aquestes, es pot activar l'activitat telomerasa simplement per introducció de la subunitat catalítica *hTERT*<sup>119</sup>.

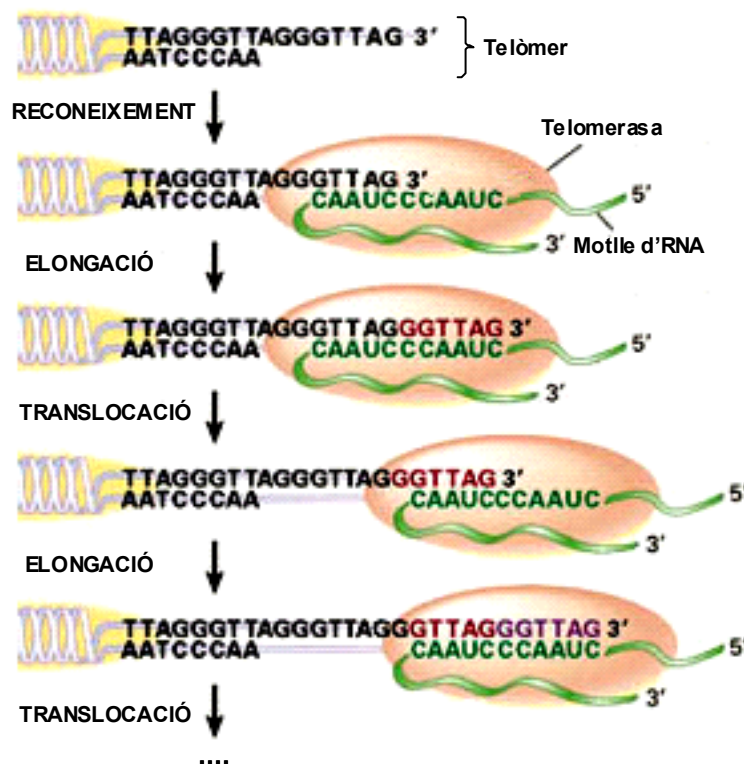


Figura 16 – Mecanisme d'acció de la telomerasa.

## B.2.2 Telomerasa com a diana terapèutica<sup>120,121,122,123</sup>

S'ha observat activitat telomerasa en el 90% de les cèl·lules tumorals. A més a més, els nivells d'activitat de l'enzim es poden correlacionar amb el nivell de progressió del càncer i amb la metastasi. Així, es pot concloure que la seva acció és vital en el procés de tumorigènesi<sup>124,125</sup>. Fins i tot, actualment es considera la telomerasa com un dels marcadors més importants en el diagnòstic i la detecció de la malaltia.

Tot això, conjuntament amb el fet que l'enzim en qüestió no s'expressa en les cèl·lules somàtiques normals, fan de la telomerasa una diana terapèutica molt atractiva pel desenvolupament de fàrmacs anticancerígens més potents, però sobretot més selectius i amb menys efectes secundaris<sup>126</sup>. La inhibició de la telomerasa comporta l'erosió dels telòmers en les cèl·lules cancerígenes<sup>127</sup> i atura, o alenteix, el creixement dels tumors<sup>128</sup>. En els últims anys molts grups de recerca s'han centrat en la cerca d'inhibidors de la telomerasa com potencials fàrmacs anticancerígens. De totes maneres cal tenir en compte certs aspectes que a hores d'ara encara romanen obscurs en totes aquestes consideracions:

- Hi ha certes línies cel·lulars "immortals" que són capaces de preservar la longitud dels telòmers sense necessitat d'expressar la telomerasa, sinó a través d'un mecanisme alternatiu anomenat ALT<sup>129,130</sup> (*Alternative Lengthening of Telomeres*).
- S'han realitzat experiments en ratolins *knockout* (als quals se'ls ha eliminat el gen que codifica per *mTR*<sup>\*</sup>) observant-se que els individus de la sisena generació presenten greus problemes d'inestabilitat genètica<sup>131</sup>.
- Hi ha cèl·lules humanes no tumorals que presenten activitat telomerasa, com ara les de la línia germinal.
- La inhibició de la telomerasa no produiria la mort immediata de les cèl·lules cancerígenes, sinó que s'hauria d'esperar un cert temps fins que els telòmers d'aquestes arribessin a la longitud crítica.

Curiosament, s'ha observat que les cèl·lules tumorals presenten generalment telòmers significativament més curts que les cèl·lules sanes, de manera que segurament només caldria inhibir la telomerasa durant pocs cicles cel·lulars per tal d'aturar la progressió del tumor i fer que les cèl·lules transformades entressin en estat de senescència. Així, seria d'esperar que les cèl·lules sanes que expressen l'enzim no es veiessin greument afectades. Està bastant acceptat, no obstant, que l'ús d'inhibidors de la telomerasa no hauria de ser una teràpia independent, sinó que hauria de formar part d'una estratègia conjunta amb altres fàrmacs anticancerígens.

### B.3 Inhibidors de la telomerasa<sup>132,133,134</sup>

En els últims anys s'han seguit diverses estratègies pel que fa al desenvolupament d'inhibidors de la telomerasa.

En alguns casos s'ha intentat incidir directament en el procés de síntesi telomèrica dut a terme per *hTERT*. Amb aquest propòsit, s'han avaluat inhibidors típics de transcriptases inverses com ara els nucleòtids AZT<sup>135</sup> o ddGTP, entre d'altres, observant-se en tots els casos una inhibició del procés. En altres, els esforços s'han

---

\* *m* fa referència a l'enzim en el ratolí

centrat en la cerca de molècules capaces d'estabilitzar l'heterodúplex RNA-DNA<sup>136</sup>. En aquest sentit la idea ha estat, bé evitar la dissociació de l'heterodúplex format durant la síntesi telomèrica, o bé conduir a la seva deformació. Ambdós processos impossibiliten que la telomerasa pugui actuar normalment<sup>137</sup>. S'han proposat també altres estratègies d'inhibició, com ara intentar evitar la formació correcta del complex enzimàtic<sup>138</sup>. En altres aproximacions, s'ha emprat la química combinatorial per tal de sintetitzar quimioteques de productes a avaluar<sup>139</sup> o s'han realitzat *screenings* massius, a través dels quals s'han identificat molècules actives derivades de l'isotiazolona<sup>140</sup>.

Cal destacar també l'ús d'oligonucleòtids com a agents terapèutics emmarcats en la teràpia antisentit. En la majoria d'aquests treballs s'han desenvolupat oligòmers dirigits principalment contra la seqüència d'11 nucleòtids que actua de motlle en la part ribonucleica de l'enzim (*hTR*). Els resultats més rellevants han estat amb oligonucleòtids modificats, com ara 2'-O-metil RNA<sup>141</sup>, oligonucleòtids units a 2',5'-oligoadenilat<sup>142</sup>, oligonucleòtids amb esquelet fosforotioat<sup>143</sup>, N3'→P5' fosforamidats<sup>144</sup> o tiofosforamidats<sup>145</sup>, PNAs<sup>146</sup> o ribozims *hammerhead*<sup>147</sup>. També s'han descrit conjugats d'oligonucleòtids amb esquelet modificat amb certs fluoròfors<sup>148</sup> i de PNAs amb pèptids catiónics<sup>149</sup>. Alguns d'aquests oligonucleòtids dissenyats per a la teràpia antisentit són els inhibidors més potents descrits fins al moment, presentant IC<sub>50</sub> de l'ordre nanomolar o fins i tot inferiors. No obstant, cal tenir present algunes de les limitacions que presenten aquests inhibidors en concret i la teràpia antisentit en general, com són els problemes d'internalització cel·lular o d'estabilitat en medi fisiològic.

Finalment, la majoria d'esforços en el desenvolupament d'inhibidors de la telomerasa han estat dirigits a la modulació de l'estructura secundària dels extrems telomèrics<sup>150</sup> i més concretament a la formació i estabilització d'estructures quàdruplex de G mitjançant l'ús de molècules petites<sup>151,152</sup>.

### B.3.1 Molècules que interaccionen amb els quàdruplex de G

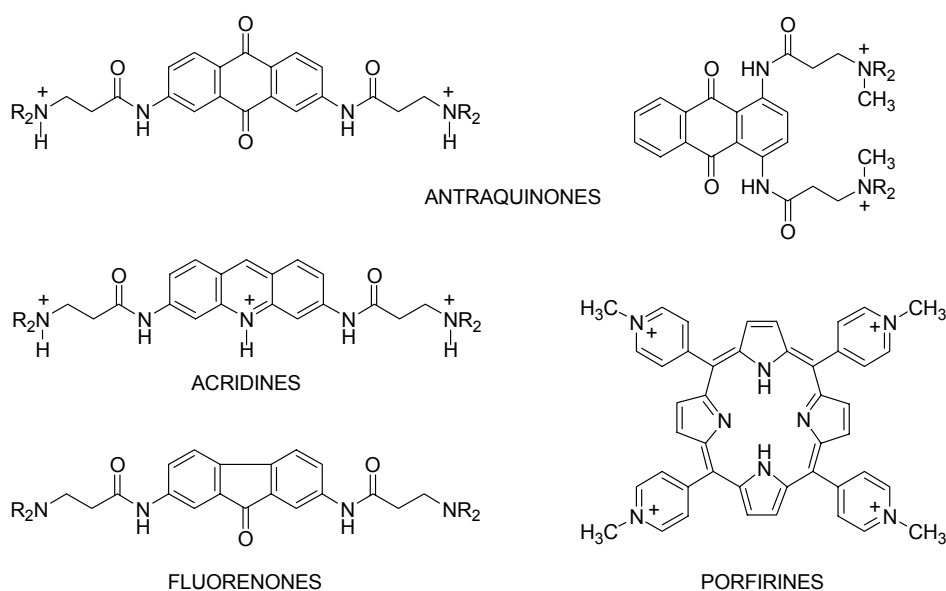
Com s'ha comentat anteriorment, els telòmers són una regió molt rica en guanines que presenta un fragment monocatenari en el seu extrem 3'. No només s'ha observat que aquest fragment pot estructurar-se en forma de quàdruplex de G *in vitro* en condicions semblants a les fisiològiques, sinó també que la formació d'aquestes estructures secundàries en els telòmers condueix a una inhibició de la telomerasa<sup>153</sup>. L'enzim, per a realitzar la seva funció correctament, necessita que l'extrem telomèric no presenti cap mena d'estructuració ja que aquest s'ha d'hibridar amb *hTR* per tal de començar el procés d'elongació. Actualment, no hi ha cap evidència directa de l'existència *in vivo* de quàdruplex de G en els telòmers durant alguna etapa del cicle cel·lular, però de totes maneres no és gens descartable el fet que aquestes estructures hi siguin presents. Fins i tot, la seva existència pot no ser incompatible amb el model acceptat de *t-loop* com a estructura que adopten els extrems telomèrics, ja que en el procés de desplaçament del dúplex pel fragment monocatenari es podrien formar



transitòriament estructures tetracatenàries. Així doncs, molècules estabilitzadores d'estructures quàdruplex de G, o molècules inductores de la formació d'aquestes estructures poden ser considerades com a potencials inhibidors de la telomerasa<sup>154</sup>.

En aquest sentit, la primera molècula descrita per la seva capacitat d'inhibir la telomerasa mitjançant l'estabilització de quàdruplex de G en els telòmers fou una antraquinona disubstituïda<sup>155,156</sup>. A partir d'aquí, són molts els treballs apareguts a la literatura descrivint molècules estabilitzadores de quàdruplex (fig. 17). D'entre aquestes cal destacar algunes porfirines<sup>157,158</sup>, sals d'acridines pentacíclics<sup>159,160,161</sup>, benzoindoloquinolines<sup>162</sup>, altres derivats d'antraquinones<sup>163</sup>, derivats de l'etidi<sup>164</sup>, tints carbocians<sup>165</sup>, triazines<sup>166</sup>, derivats de dibenzofenantrolina<sup>167</sup>, la trietilentetraamina (TETA)<sup>168</sup>, la naftidrina<sup>169</sup> derivats de la quindolina<sup>170</sup> o la telomestatina<sup>171,172</sup>, presentant aquesta última una IC<sub>50</sub> de les més baixes descrites fins el moment, de l'ordre nanomolar.

Un interès especial mereixen els treballs realitzats per Neidle i col·laboradors des de finals de la dècada dels '90 en el desenvolupament de molècules estabilitzadores de quàdruplex de G mitjançant el modelatge molecular i la posterior síntesi de derivats disubstituïts de sistemes aromàtics tricíclics com ara antraquinones<sup>173,174</sup>, fluorenones<sup>175</sup> i acridines<sup>176,177</sup> (fig. 17). D'entre totes aquestes molècules, cal destacar les acridines, les quals són les que presenten uns millors resultats en tests d'inhibició de la telomerasa. Posteriorment, s'ha vist que derivats d'acridines trisubstituïdes encara presenten uns millors resultats d'inhibició<sup>178,179,180</sup>.



**Figura 17** – Alguns inhibidors de la telomerasa.

## C. Bibliografia

- <sup>1</sup> Gilbert, D.E.; Feigon, J. **Multistranded DNA structures.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, *9*, 305-314
- <sup>2</sup> Mergny, J.L.; Lacroix, L.; Han, X.; Leroy, J.L.; Hélène, C. **Intramolecular Folding of Pyrimidine Oligodeoxynucleotides into an i-DNA Motif.** *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 8887-8898
- <sup>3</sup> Guéron, M.; Leroy, J.L. **The i-motif in nucleic acids.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, *10*, 326-331
- <sup>4</sup> Salisbury, S.A.; Wilson, S.E.; Powell, H.R.; Kennard, O.; Lubini, P.; Sheldrick, G.M.; Escaja, N.; Alazzouzi, E.; Grandas, A.; Pedroso, E. **The bi-loop, a new general four-stranded DNA motif.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**, *94*, 5515-5518
- <sup>5</sup> Davis, J.T. **G-Quartets 40 Years Later: From 5'-GMP to Molecular Biology and Supramolecular Chemistry.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 668-698
- <sup>6</sup> Guschlbauer, W.; Chantot, J.; Thiele, D. **Four-Stranded Nucleic Acid Structures 25 Years Later: From Guanosine Gels to Telomer DNA.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1990**, *8*, 491-511
- <sup>7</sup> Cheong, C.; Moore, P.B. **Solution Structure of an Unusually Stable RNA Tetraplex Containing G- and U-Quartet Structures.** *Biochemistry*, **1992**, *31*, 8406-8414
- <sup>8</sup> Dapié, V.; Bates, P.J.; Trent, J.O.; Rodger, A.; Thomas, S.D.; Miller, D.M. **Antiproliferative Activity of G-Quartet-Forming Oligonucleotides with Backbone and Sugar Modifications.** *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3676-3685
- <sup>9</sup> Randazzo, A.; Esposito, V.; Ohlenschläger, O.; Ramachandran, R.; Mayol, L. **NMR solution structure of a parallel LNA quadruplex.** *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 3083-3092
- <sup>10</sup> Dominick, P.K.; Jarstfer, M.B. **A Conformationally Constrained Nucleotide Analogue Controls the Folding Topology of a DNA G-Quadruplex.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5050-5051
- <sup>11</sup> Krishnan-Ghosh, Y.; Stephens, E.; Balasubramanian, S. **A PNA<sub>4</sub> Quadruplex.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5944-5945
- <sup>12</sup> Datta, B.; Schmitt, C.; Armitage, B.A. **Formation of a PNA<sub>2</sub>-DNA<sub>2</sub> Hybrid Quadruplex.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4111-4118
- <sup>13</sup> Williamson, J.R. **Guanine quartets.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1993**, *3*, 357-62
- <sup>14</sup> Patel, D.J. **A molecular propeller.** *Nature*, **2002**, *417*, 807-808
- <sup>15</sup> Gavathiotis, E.; Searle, M.S. **Structure of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)<sub>4</sub> containing the human telomeric repeat: evidence for A-tetrad formation from NMR and molecular dynamics simulations.** *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 1650-1656
- <sup>16</sup> Patel, P.K.; Bhavesh, N.S.; Hosur, R.V. **NMR Observation of a Novel C-Tetrad in the Structure of the SV40 Repeat Sequence GGGCGG.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, *270*, 967-971
- <sup>17</sup> Patel, P.K.; Hosur, R.V. **NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats.** *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 2457-2464
- <sup>18</sup> Kettani, A.; Bouaziz, S.; Gorin, A.; Zhao, H.; Jones, R.A.; Patel, D.J. **Solution Structure of a Na<sup>+</sup> Cation Stabilized DNA Quadruplex Containing G·G·G·G and G·C·G·C Tetrads Formed by G·G·G·C Repeats Observed in Adeno-associated Viral DNA.** *J. Mol. Biol.*, **1998**, *282*, 619-636
- <sup>19</sup> Webba da Silva, M. **Association of DNA Quadruplex through G:C:G:C Tetrads. Solution Structure of d(GCGGTGGAT).** *Biochemistry*, **2003**, *42*, 14356-14365

- 20 Matsugami, A.; Ouhashi, K.; Kanagawa, M.; Liu, H.; Kanagawa, S.; Uesugi, S.; Katahira, M. **An Intramolecular Quadruplex of (GGA)<sub>4</sub> Triplet Repeat DNA with a G:G:G:G Tetrad and a G(:A):G(:A):G(:A):G Heptad, and its Dimeric Interaction.** *J. Mol. Biol.*, **2001**, *313*, 255-269
- 21 Keniry, M.A. **Quadruplex Structures in Nucleic Acids.** *Biopolymers*, **2001**, *56*, 123-146
- 22 Phillips, K.; Dauter, Z.; Murchie, A.I.H.; Lilley, D.M.J.; Luisi, B. **The Crystal Structure of Parallel-stranded Guanine Tetraplex at 0.95 Å Resolution.** *J. Mol. Biol.*, **1997**, *273*, 171-182
- 23 Marathias, V.M.; Bolton, P.H. **Structures of the potassium-saturated, 2:1, and intermediate, 1:1, forms of a quadruplex DNA.** *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 1969-1977
- 24 Nagesh, N.; Chatterji, D. **Ammonium ion at low concentration stabilizes the G-quadruplex formation by telomeric sequence.** *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **1995**, *30*, 1-8
- 25 Smirnov, I.; Shafer, R.H. **Lead is Unusually Effective in Sequence-specific Folding of DNA.** *J. Mol. Biol.*, **2000**, *296*, 1-5
- 26 Miyoshi, D.; Nakao, A.; Sugimoto, N. **Structural transition from antiparallel to parallel G-quadruplex of d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>) induced by Ca<sup>2+</sup>.** *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 1156-1163
- 27 Kankia, B.; Marky, L.A. **Folding of the Thrombin Aptamer into a G-Quadruplex with Sr<sup>2+</sup>: Stability, Heat and Hydration.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 10799-10804
- 28 Sen, D.; Gilbert, W. **A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G<sub>4</sub>-DNA.** *Nature*, **1990**, *344*, 410-414
- 29 Marathias, V.M.; Bolton, P.H. **Determinants of DNA Quadruplex Structural Type: Sequence and Potassium Binding.** *Biochemistry*, **1999**, *38*, 4355-4364
- 30 Phan, A.T.; Patel, D.J. **Two-Repeat Human Telomeric d(TAGGGTTAGGGT) Sequence Forms Interconverting Parallel and Antiparallel G-Quadruplexes in Solution: Distinct Topologies, Thermodynamic Properties, and Folding/Unfolding Kinetics.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 15021-15027
- 31 Hang, C.; Zhang, X.; Ratliff, R.; Moyzis, R.; Rich, A. **Crystal structure of four-stranded *Oxytricha* telomeric DNA.** *Nature*, **1992**, *356*, 126-131
- 32 Smith, F.W.; Feigon, J. **Quadruplex structure of *Oxytricha* telomeric DNA oligonucleotides.** *Nature*, **1992**, *356*, 164-168
- 33 Haider, S.; Parkinson, G.N.; Neidle, S. **Crystal Structure of the Potassium Form of an *Oxytricha nova* G-quadruplex.** *J. Mol. Biol.*, **2002**, *320*, 189-200
- 34 Mergny, J.L.; Phan, A.T.; Lacroix, L. **Following G-quartet formation by UV-spectroscopy.** *FEBS Lett.*, **1998**, *435*, 74-78
- 35 Saccà, B.; Lacroix, L.; Mergny, J.L. **The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides.** *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, 1182-1192
- 36 Mergny, J.L.; Maurizot, J.C. **Fluorescence Resonance Energy Transfer as a Probe for G-Quartet Formation by a Telomeric Repeat.** *Chembiochem*, **2001**, *2*, 124-132
- 37 Darby, R.A.J.; Sollogoub, M.; McKeen, C.; Brown, L.; Risitano, A.; Brown, N.; Barton, C.; Brown, T.; Fox, K.R. **High throughput measurements of duplex, triplex and quadruplex melting curves using molecular beacons and a LightCycler.** *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *30*, e39
- 38 Risitano, A.; Fox, K.R. **The stability of intramolecular DNA quadruplexes with extended loops forming inter- and intra-loop duplexes.** *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 1852-1855
- 39 Balagurumoorthy, P.; Bramachari, S.K.; Mohanty, D.; Bansal, M.; Sasisekharan, V. **Hairpin and parallel quartet structures for telomeric sequences.** *Nucleic Acids Res.*, **1992**, *20*, 4061-4067
- 40 Giraldo, R.; Suzuki, M.; Chapman, L.; Rhodes, D. **Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: A circular dichroism study.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, *91*, 7658-7662
- 41 Rangan, A.; Fedoroff, O.Y.; Hurley, L.H. **Induction of Duplex to G-quadruplex Transition in the *c-myc* Promoter Region by a Small Molecule.** *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 4640-4646

- 42 David, W.M.; Brodbelt, J.; Kerwin, S.M.; Thomas, P.W. **Investigation of Quadruplex Oligonucleotide-Drug Interactions by Electrospray Ionization Mass Spectrometry.** *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 2029-2033
- 43 Vairamani, M.; Gross, M.L. **G-Quadruplex Formation of Thrombin-Binding Aptamer Detected by Electrospray Ionization Mass Spectrometry.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 42-43
- 44 Costa, L.T.; Kerkmann, M.; Hartmann, G.; Endres, S.; Bisch, P.M.; Heckl, W.M.; Thalhammer, S. **Structural studies of oligonucleotides containing G-quadruplex motifs using AFM.** *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*, **2003**, *313*, 1065-1072
- 45 Vialas, C.; Pratviel, G.; Meunier, B. **Oxidative Damage Generated by an Oxo-Metalloporphyrin onto the Human Telomeric Sequence.** *Biochemistry*, **2000**, *39*, 9514-9522
- 46 Redon, S.; Bombard, S.; Elizondo-Riojas, M.A.; Chottard, J.C. **Platination of the (T<sub>2</sub>G<sub>4</sub>)<sub>4</sub> Telomeric Sequence: A Structural and Cross-Linking Study.** *Biochemistry*, **2001**, *40*, 8463-8470
- 47 Redon, S.; Bombard, S.; Elizondo-Rojas, M.A.; Chottard, J.C. **Platinum cross-linking of adenines and guanines on the quadruplex structures of the AG<sub>3</sub>(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>4</sub> human telomere sequences in Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> solutions.** *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 1605-1613
- 48 Laughlan, G.; Murchie, A.I.H.; Norman, D.G.; Moore, M.H.; Moody, P.C.E.; Lilley, D.M.J.; Luisi, B. **The High-Resolution Crystal Structure of a Parallel-Stranded Guanine Tetraplex.** *Science*, **1994**, *265*, 520-524
- 49 Keniry, M.A.; Strahan, G.D.; Owen, E.A.; Shafer, R.H. **Solution structure of the Na<sup>+</sup> form of the dimeric guanine quadruplex [d(G<sub>3</sub>T<sub>4</sub>G<sub>3</sub>)]<sub>2</sub>.** *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *233*, 631-643
- 50 Wang, Y.; Patel, D.J. **Solution structure of the *Oxytricha* Telomeric Repeat d[G<sub>4</sub>(T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)<sub>3</sub>] G-tetraplex.** *J. Mol. Biol.*, **1995**, *251*, 76-94
- 51 Schultze, P.; Macaya, R.F.; Feigon, J. **Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG).** *J. Mol. Biol.*, **1993**, *235*, 1532-1547
- 52 Wang, Y.; Patel, D.J. **Solution structure of the human telomeric repeat d[AG<sub>3</sub>(TAG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] G-tetraplex.** *Structure*, **1993**, *1*, 263-282
- 53 Wang, Y.; Patel, D.J. **Solution structure of the *Tetrahymena* telomeric repeat d(T<sub>2</sub>G<sub>4</sub>)<sub>4</sub> G-tetraplex.** *Structure*, **1994**, *2*, 1141-1156
- 54 Parkinson, G.N.; Lee, M.P.H.; Neidle, S. **Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA.** *Nature*, **2002**, *417*, 876-880
- 55 Crnugelj, M.; Sket, P.; Plavec, J. **Small Change in a G-Rich Sequence, a Dramatic Change in Topology: New Dimeric G-Quadruplex Folding Motif with Unique Loop Orientations.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7866-7871
- 56 Crnugelj, M.; Hud, N.V.; Plavec, J. **The Solution Structure of d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>3</sub>): a Bimolecular G-quadruplex with a Novel Fold.** *J. Mol. Biol.*, **2002**, *320*, 911-924
- 57 Han, H.; Hurley, L.H. **G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design.** *TIPS*, **2000**, *21*, 136-141
- 58 Arthanari, H.; Basu, S.; Kawano, T.L.; Bolton, P.H. **Fluorescent dyes specific for quadruplex DNA.** *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 3724-3728
- 59 Chang, C.; Wu, J.; Chien, C.; Wu, W.; Liu, H.; Kang, C.; Yu, L.; Chang, T. **A Fluorescent Carbazole Derivative: High Sensitivity for Quadruplex DNA.** *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 6177-6183
- 60 Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H.J.; Plückthun, A. **In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylynychia lemmane* macronuclei.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *98*, 8572-8577
- 61 Shafer, R.H.; Smirnov, I. **Biological Aspects of DNA/RNA Quadruplexes.** *Biopolymers*, **2001**, *56*, 209-227
- 62 Fang, G.; Cech, T.R. **The β Subunit of *Oxytricha* Telomere-Binding Protein Promotes G-Quartet Formation by Telomeric DNA.** *Cell*, **1993**, *74*, 875-885

- 63 Giraldo, R.; Rhodes, D. **The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA.** *EMBO J.*, **1994**, *13*, 2411-2420
- 64 Sun, H.; Karow, J.K.; Hickson, I.D.; Maizels, N. **The Bloom's Syndrome Helicase Unwinds G4 DNA.** *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 27587-27592
- 65 Fry, M.; Loeb, L.A. **Human Werner Syndrome DNA Helicase Unwinds Tetrahelical Structures of the Fragile X Syndrome Repeat Sequence d(CGG)<sub>n</sub>.** *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 12797-12802
- 66 Sun, H.; Bennett, R.J.; Maizels, N. **The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs.** *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 1978-1984
- 67 Baran, N.; Pucshansky, L.; Marco, Y.; Benjamin, S.; Manor, H. **The SV40 large T-antigen helicase can unwind four stranded DNA structures linked by G-quartets.** *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 297-303
- 68 Arimondo, P.B.; Riou, J.F.; Mergny, J.L.; Tazi, J.; Sun, J.S.; Garestier, T.; Helene, C. **Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures.** *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 4832-4838
- 69 Muniyappa, K.; Anuradha, S.; Byers, B. **Yeast Meiosis-Specific Protein Hop1 Binds to G4 DNA and Promotes Its Formation.** *Mol. Cell Biol.*, **2000**, *20*, 1361-1369
- 70 Henderson, E.; Hardin, C.C.; Walk, S.K.; Tinoco, I. Jr.; Blackburn, E.H. **Telomeric DNA Oligonucleotides Form Intramolecular Structures Containing Guanine-Guanine Base Pairs.** *Cell*, **1987**, *51*, 899-908
- 71 Phan, A.T.; Mergny, J.L. **Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix.** *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 4618-4625
- 72 Li, W.; Wu, P.; Ohmichi, T.; Sugimoto, N. **Characterization and thermodynamic properties of quadruplex/duplex competition.** *FEBS Lett.*, **2002**, *526*, 77-81
- 73 Risitano, A.; Fox, K.R. **Stability of Intramolecular DNA Quadruplexes: Comparison with DNA Duplexes.** *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6507-6513
- 74 Kanaori, K.; Shibayama, N.; Gohda, K.; Tajima, K.; Makino, K. **Multiple four-stranded conformations of human telomere sequence d(CCCTAA) in solution.** *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, 831-840
- 75 Arthanari, H.; Bolton, P.H. **Functional and dysfunctional roles of quadruplex DNA in cells.** *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 221-230
- 76 Chakraverty, R.K.; Hickson, I.D. **Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases.** *Bioessays*, **1999**, *21*, 286-294
- 77 Wells, R.D. **Molecular Basis of Genetic Instability of Triplet Repeats.** *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 2875-2878
- 78 Moine, H.; Mandel, J.L. **Do G Quartets Orchestrate Fragile X Pathology?** *Science*, **2001**, *294*, 2487-2488
- 79 Sutherland, G.R.; Richards, R.I. **Simple tandem DNA repeats and human genetic disease.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**, *92*, 3636-3641
- 80 Phan, A.T.; Modi, Y.S.; Patel, D.J. **Propeller-Type Parallel-Stranded G-Quadruplexes in the Human *c-myc* Promoter.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8710-8716
- 81 Seenisamy, J.; Rezler, E.M.; Powell, T.J.; Tye, D.; Gokhale, V.; Joshi, C.S.; Siddiqui-Jain, A.; Hurley, L.H. **The Dynamic Character of the G-Quadruplex Element in the *c-MYC* Promoter and Modification by TMPyP4.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8702-8709
- 82 Hermann, T.; Patel, D.J. **Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers.** *Science*, **2000**, *287*, 820-825
- 83 Bock, L.; Griffin, L.C.; Latham, J.A.; Vermaas, E.H.; Toole, J.J. **Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin.** *Nature*, **1992**, *355*, 564-566
- 84 Wang, K.Y.; McCurdy, S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S.; Bolton, P.H. **A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA.** *Biochemistry*, **1993**, *32*, 1899-1904

- 85 Padmanabhan, K.; Padmanabhan, K.P.; Ferrara, J.D.; Sadler, J.E.; Tulinsky, A. **The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer.** *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 17651-17654
- 86 Wyatt, J.R.; Vickers, T.A.; Roberson, J.L.; Buckheit, R.W.; Klimkait, T.; DeBaets, E.; Davis, P.W.; Rayner, B.; Imbach, J.L.; Ecker, D.J. **Combinatorially selected guanosine-quartet structure is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus envelope-mediated cell fusion.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, *91*, 1356-1360
- 87 Mazumder, A.; Neamati, N.; Ojwang, J.O.; Sunder, S.; Rando, R.F.; Pommier, Y. **Inhibition of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase by Guanosine Quartet Structures.** *Biochemistry*, **1996**, *35*, 13762-13771
- 88 Jing, N.; Rando, R.F.; Pommier, Y.; Hogan, M.E. **Ion Selective Folding of Loop Domains in a Potent anti-HIV Oligonucleotide.** *Biochemistry*, **1997**, *36*, 12498-12505
- 89 Phan, A.T.; Kuryavyi, V.; Ma, J.B.; Faure, A.; Andréola, M.L.; Patel, D.J. **An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: A potent inhibitor of HIV-1 integrase.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, *102*, 634-639
- 90 Cherepanov, P.; Esté, J.A.; Rando, R.F.; Ojwang, J.O.; Reekmans, G.; Steinfeld, R.; David, G.; de Clercq, E.; Debyser, Z. **Mode of Interaction of G-Quartets with the Integrase of Human Immunodeficiency Virus Type 1.** *Mol. Pharm.*, **1997**, *52*, 771-780
- 91 Hurley, L.H. **Secondary DNA structures as molecular targets for cancer therapeutics.** *Biochem. Soc. Trans.*, **2001**, *29*, 692-696
- 92 Neidle, S.; Read, M.A. **G-Quadruplexes as Therapeutics Targets.** *Biopolymers*, **2001**, *56*, 195-208
- 93 Blackburn, E.H. **Structure and function of telomeres.** *Nature*, **1991**, *350*, 569-573
- 94 Moyzis, R.K.; Buckingham, J.M.; Scott Cram, L.; Dani, M.; Deaven, L.L.; Jones, M.D.; Meyne, J.; Ratliff, R.L.; Wu, J. **A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*, 6622-6626
- 95 Meyne, J.; Ratliff, R.L.; Moyzis, R.K. **Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1989**, *86*, 7049-7053
- 96 Shampay, J.; Szostak, J.W.; Blackburn, E.H. **DNA sequences of telomeres maintained in yeast.** *Nature*, **1984**, *310*, 154-157
- 97 Blackburn, E.H. **Telomeres: Structure and Synthesis.** *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 5919-5921
- 98 van Steensel, B.; Smogorzewska, A.; de Lange, T. **TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions.** *Cell*, **1998**, *92*, 401-413
- 99 Bears, D.J.; Hurley, L.H.; Von Hoff, D.D. **Telomere maintenance mechanisms as a target for drug development.** *Oncogene*, **2000**, *19*, 6632-41
- 100 Wright, W.E.; Tesmer, V.M.; Huffman, K.E.; Levene, S.D.; Shay, J.W. **Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end.** *Genes & Development*, **1997**, *11*, 2801-2809
- 101 Sandell, L.L.; Zakian, V.A. **Loss of a Yeast Telomere: Arrest, Recovery, and Chromosome Loss.** *Cell*, **1993**, *75*, 729-739
- 102 Griffith, J.D.; Comeau, L.; Rosenfield, S.; Stansel, R.M.; Bianchi, A.; Moss, H.; de Lange, T. **Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop.** *Cell*, **1999**, *97*, 503-514
- 103 Blackburn, E.H. **Switching and Signaling at the Telomere.** *Cell*, **2001**, *106*, 661-673
- 104 Neidle, S.; Parkinson, G.N. **The structure of telomeric DNA.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2003**, *13*, 275-283
- 105 Harley, C.B.; Futcher, A.B.; Greider, C.W. **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** *Nature*, **1990**, *345*, 458-460
- 106 Urquidi, V.; Tarin, D.; Goodison, S. **Role of Telomerase in Cell Senescence and Oncogenesis.** *Ann. Rev. Med.* **2000**, *51*, 65-79
- 107 Wynford-Thomas, D.; Kipling, D. **Cancer and the knockout mouse.** *Nature*, **1997**, *389*, 551-552

- 108 Huffman, K.E.; Levenet, S.D.; Tesmer, V.M.; Shay, J.W.; Wright, W.E. **Telomere Shortening Is Proportional to the Size of the G-rich Telomeric 3'-Overhang.** *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 19719-19722
- 109 Counter, C.M.; Avilion, A.A.; LeFeuvre, C.E.; Stewart, N.G.; Greider, C.W.; Harley, C.B.; Bacchetti, S. **Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.** *The EMBO Journal*, **1992**, *11*, 1921-1929
- 110 Dhaene, K.; Van Marck, E.; Parwaresch, R. **Telomeres, telomerase and cancer: an update.** *Virchows Arch.*, **2000**, *437*, 1-16
- 111 Greider, C.W.; Blackburn, E.H. **Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts.** *Cell*, **1985**, *43*, 405-413
- 112 Greider, C.W.; Blackburn, E.H. **A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis.** *Nature*, **1989**, *337*, 331-337
- 113 Feng, J.; Funk, W.D.; Wang, S.S.; Weinrich, S.L.; Avilion, A.A.; Chiu, C.P.; Adams, R.R.; Chang, E.; Allsopp, R.C.; Yu, J.; Le, S.; West, M.D.; Harley, C.B.; Andrews, W.H.; Greider, C.W.; Villeponteau, B. **The RNA Component of Human Telomerase.** *Science*, **1995**, *269*, 1236-1241
- 114 Cheng, J.L.; Blasco, M.A.; Greider, C.W. **Secondary Structure of Vertebrate Telomerase RNA.** *Cell*, **2000**, *100*, 503-514
- 115 Antal, M.; Boros, É.; Solymosy, F.; Kiss, T. **Analysis of the structure of human telomerase RNA *in vivo*.** *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 912-920
- 116 Holt, S.E.; Aisner, D.L.; Baur, J.; Tesmer, V.M.; Dy, M.; Oullette, M.; Trager, J.B.; Morin, G.B.; Toft, D.O.; Shay, J.W.; Wright, W.E.; White, M.A. **Functional requirements of p23 and Hsp90 in telomerase complexes.** *Genes & Development*, **1999**, *13*, 817-826
- 117 Greider, C.W. **Telomere length regulation.** *Ann. Rev. Biochem.*, **1996**, *65*, 337-365
- 118 Mergny, J.L.; Riou, J.F.; Teulade-Fichou, M.P.; Gilson, E. **Natural and pharmacological regulation of telomerase.** *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 839-865
- 119 Cech, T.R. **Life at the End of the Chromosome: Telomeres and Telomerase.** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 34-43
- 120 Pitts, A.E.; Corey, D.R. **The telomerase challenge – an unusual problem in drug discovery.** *Drug Discovery Today*, **1999**, *4*, 155-161
- 121 Kelland, L.R. **Telomerase inhibitors: targeting the vulnerable end of cancer.** *Anti-Cancer Drugs*, **2000**, *11*, 503-513
- 122 Perry, P.J.; Kelland, L.R. **Telomeres and telomerase: targets for cancer chemotherapy?** *Exp. Opin. Ther. Pat.* **1998**, *8*, 1567-86
- 123 Keith, W.N.; Bilsland, A.; Hardie, M.; Evans, T.R.J. **Drug Insight: cancer cell immortality-telomerase as a target for novel cancer gene therapies.** *Nature Clin. Pract. Onc.*, **2004**, *1*, 88-96
- 124 Greider, C.W. **Telomerase activity, cell proliferation, and cancer.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, *95*, 90-92
- 125 Maser, R.S.; DePinho, R.A. **Connecting Chromosomes, Crisis, and Cancer.** *Science*, **2002**, *297*, 565-569
- 126 Hodes, R. **Molecular targeting of cancer: Telomeres as targets.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *98*, 7649-51
- 127 Herbert, B.S.; Pitts, A.E.; Baker, S.I.; Hamilton, S.E.; Wright, W.E.; Shay, J.W.; Corey, D.R. **Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1999**, *96*, 14276-14281
- 128 Hahn, W.C.; Stewart, S.A.; Brooks, M.W.; York, S.G.; Eaton, E.; Kurachi, A.; Beijersbergen, R.L.; Knoll, J.H.M.; Meyerson, M.; Weinberg, R.A. **Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells.** *Nature Med.*, **1999**, *5*, 1164-1170
- 129 Smith, S. **Recombination: a means to an end in human cells.** *Nature Gen.*, **2000**, *26*, 388-389
- 130 Neumann, A.A.; Reddel, R.R. **Telomere maintenance and cancer – look, no telomerase.** *Nature Rev.*, **2002**, *2*, 879-884

- 131 de Lange, T.; Jacks, T. **For Better or Worse? Telomerase Inhibition and Cancer.** *Cell* **1999**, *98*, 273-275
- 132 Mokbel, K. **The evolving role of telomerase inhibitors in the treatment of cancer.** *Curr. Med. Res. Opin.*, **2003**, *19*, 470-472
- 133 Rowley, P.T.; Tabler, M. **Telomerase Inhibitors.** *Anti-Cancer Res.*, **2000**, *20*, 4419-30
- 134 White, L.K.; Wright, W.E.; Shay, J.W. **Telomerase inhibitors.** *Trends in Biotech.*, **2001**, *19*, 114-120
- 135 Strahl, Catherine; Blackburn, Elizabeth H. **Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines.** *Mol. Cell Biol.*, **1996**, *16*, 53-65
- 136 Ren, J.; Qu, X.; Dattagupta, N.; Chaires, J.B. **Molecular Recognition of a RNA:DNA Hybrid Structure.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 6742-6743
- 137 West, C.; Francis, R.; Friedman, S.H. **Small Molecule/Nucleic Acid Affinity Chromatography: Application for the Identification of Telomerase Inhibitors Which Target Its Key RNA/DNA Heteroduplex.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2727-2730
- 138 Keppler, B.R.; Jarstfer, M.B. **Inhibition of Telomerase Activity by Preventing Proper Assemblage.** *Biochemistry*, **2004**, *43*, 334-343
- 139 Sasaki, S.; Ehara, T.; Alam, R.; Fujino, Y.; Harada, N.; Kimura, J.; Nakamura, H.; Maeda, M. **Solid-Phase Synthesis of a Library Constructed of Aromatic Phosphate, Long Alkyl Chains and Tryptophane Components, and Identification of Potent Dipeptide Telomerase Inhibitors.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2581-2584
- 140 Hayakawa, N.; Nozawa, K.; Ogawa, A.; Kato, N.; Yoshida, K.; Akamatsu, K.; Tsuchiya, M.; Nagasaka, A.; Yoshiyda, S. **Isothiazolone Derivatives Selectively Inhibit Telomerase from Human and Rat Cancer Cells *in Vitro*.** *Biochemistry*, **1999**, *38*, 11501-11507
- 141 Pitts, A.E.; Corey, D.R. **Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, *95*, 11549-11554
- 142 Kondo, S.; Kondo, Y.; Li, G.; Silverman, R.H.; Cowell, J.K. **Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA.** *Oncogene*, **1998**, *16*, 3323-3330
- 143 Matthes, E.; Lehmann, C. **Telomerase protein rather than its RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides.** *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 1152-1158
- 144 Pruzan, R.; Pongracz, K.; Gietzen, K.; Walleber, G.; Gryaznov, S. **Allosteric inhibitors of telomerase: oligonucleotides N3'→P5' phosphoramidates.** *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 559-568
- 145 Gryaznov, S.; Asai, A.; Oshima, Y.; Yamamoto, Y.; Pongracz, K.; Pruzan, R.; Wunder, E.; Piatyszek, M.; Li, S.; Chin, A.; Harley, C.; Akinaga, S.; Yamashita, Y. **Oligonucleotide N3'→P5' Thio-phosphoramidate Telomerase Template Antagonists as Potential Anticancer Agents.** *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2003**, *22*, 577-581
- 146 Hamilton, S.E.; Pitts, A.E.; Katipally, R.R.; Jia, X.; Rutter, J.P.; Davies, B.A.; Shay, J.W.; Wright, W.E.; Corey, D.R. **Identification of Determinants for Inhibitor Binding within the RNA Active Site of Human Telomerase Using PNA Scanning.** *Biochemistry*, **1997**, *36*, 11873-11880
- 147 Yokoyama, Yasuhiro; Takahashi, Yuichiro; Shinohara, Ariyoshi; Lian, Zenglin; Wan, Xiaoyun; Niwa, Kenji; Tamaya, Teruhiko. **Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells.** *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 5406-5410
- 148 Pongracz, K.; Li, S.; Herbert, B.; Pruzan, R.; Wunder, E.; Chin, A.; Piatyszek, M.; Shay, J.; Gryaznov, S.M. **Novel Short Oligonucleotide Conjugates as Inhibitors of Human Telomerase.** *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2003**, *22*, 1627-1629
- 149 Harrison, J.G.; Frier, C.; Laurant, R.; Dennis, R.; Raney, K.D.; Balasubramanian, S. **Inhibition of human telomerase by PNA-cationic peptide conjugates.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 1273-1278



- 150 Fletcher, T.M.; Sun, D.; Salazar, M.; Hurley, L.H. **Effect of DNA Secondary Structure on Human Telomerase Activity.** *Biochemistry*, **1998**, *37*, 5536-5541
- 151 Han, H.; Cliff, C.L.; Hurley, L.H. **Accelerated Assembly of G-Quadruplex Structures by a Small Molecule.** *Biochemistry*, **1999**, *38*, 6981-6986
- 152 Fedoroff, O.Y.; Salazar, M.; Han, H.; Chemeris, V.V.; Kerwin, S.M.; Hurley, L.H. **NMR-Based Model of a Telomerase-Inhibiting Compound Bound to G-Quadruplex DNA.** *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12368-12374
- 153 Zahler, A.M.; Williamson, J.R.; Cech, T.R.; Prescott, D.M. **Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures.** *Nature*, **1991**, *350*, 718-720
- 154 Mergny, J.L.; Hélène, C. **G-quadruplex DNA: A target for drug design.** *Nature Medicine*, **1998**, *4*, 1366-7
- 155 Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B.E.; Salazar, M.; Kerwin, S.M.; Trent, J.O.; Jenkins, T.C.; Neidle, S.; Hurley, L.H. **Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound.** *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2113-2116
- 156 Han, H.; Hurley, L.H.; Salazar, M. **A DNA polymerase stop assay for G-quadruplex-interactive compounds.** *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 537-542
- 157 Wheelhouse, R.T.; Sun, D.; Han, H.; Han, F.X.; Hurley, L.H. **Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(*N*-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA.** *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 3261-3262
- 158 Han, H.; Langley, D.R.; Rangan, A.; Hurley, L.H. **Selective Interactions of Cationic Porphyrins with G-Quadruplex Structures.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 8902-8913
- 159 Gavathiotis, E.; Heald, R.A.; Stevens, M.F.G.; Searle, M.S. **Recognition and Stabilization of Quadruplex DNA by a Potent New Telomerase Inhibitor: NMR Studies of the 2:1 Complex of a Pentacyclic Methylacridinium Cation with d(TTAGGGT)<sub>4</sub>.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4749-4751
- 160 Gowan, S.M.; Heald, R.; Stevens, M.F.G.; Kelland, L.R. **Potent Inhibition of Telomerase by Small-Molecule Pentacyclic Acridines Capable of Interacting with G-Quadruplexes.** *Mol. Pharm.*, **2001**, *60*, 981-988
- 161 Heald, R.A.; Modi, C.; Cookson, J.C.; Hutchinson, I.; Laughton, C.A.; Gowan, S.M.; Kelland, L.R.; Stevens, M.F.G. **Antitumor Polycyclic Acridines. Synthesis and Telomerase-Inhibitory Activity of Methylated Pentacyclic Acridinium Salts.** *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 590-597
- 162 Alberti, P.; Schmitt, P.; Nguyen, C.H.; Rivalle, C.; Hoarau, M.; Grierson, D.S.; Mergny, J.L. **Benzoindoloquinolines Interact with DNA Tetraplexes and Inhibit Telomerase.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 1071-1074
- 163 Cairns, D.; Michalisti, E.; Jenkins, T.C.; Mackay, S.P. **Molecular Modelling and Cytotoxicity of Substituted Anthraquinones as Inhibitors of Human Telomerase.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2002**, *10*, 803-807
- 164 Koepfel, F.; Riou, J.F.; Laoui, A.; Mailliet, P.; Arimondo, P.B.; Labit, D.; Petitgenet, O.; Hélène, C.; Mergny, J.L. **Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes.** *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, 1087-1096
- 165 Kerwin, S.M.; Sun, D.; Kern, J.T.; Rangan, A.; Thomas, P.W. **G-Quadruplex DNA Binding by a Series of Carbocyanine Dyes.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2411-2414
- 166 Riou, J.F.; Guittat, L.; Mailliet, P.; Laoui, A.; Renou, E.; Petitgenet, O.; Méglin-Chanet, F.; Hélène, C.; Mergny, J.L. **Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, *99*, 2672-2677
- 167 Mergny, J.L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M.P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P.B.; Vigneron, J.P.; Lehn, J.M.; Riou, J.F.; Garestier, T.; Hélène, C. **Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *98*, 3062-3067
- 168 Yin, F.; Liu, J.; Peng, X. **Triethylene Tetraamine: A Novel Telomerase Inhibitor.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 3923-3926

- 169 Nakatani, K.; Hagihara, S.; Sando, S.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Maesawa, C.; Saito, I. **Induction of a Remarkable Conformational Change in a Human Telomeric Sequence by the Binding of Naphthridine Dimer: Inhibition of the Elongation of a Telomeric Repeats by Telomerase.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 662-666
- 170 Guyen, B.; Schultes, C.M.; Hazel, P.; Mann, J.; Neidle, S. **Synthesis and evaluation of analogues of 10H-indolo[3,2-b]-quinoline as G-quadruplex stabilising ligands and potential inhibitors of the enzyme telomerase.** *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 981-988
- 171 Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. **Telomestatin, a Novel telomerase Inhibitor from *Streptomyces anulatus*.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1262-1263
- 172 Kim, M.; Vankayalapati, H.; Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Hurley, L.H. **Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular G-Quadruplex.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2098-2099
- 173 Perry, P.J.; Gowan, S.M.; Reszka, A.P.; Polucci, P.; Jenkins, T.C.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **1,4- and 2,6-Disubstitued Amidoanthracene-9,10-dione Derivatives as Inhibitors of Human Telomerase.** *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 3253-3260
- 174 Perry, P.J.; Reszka, A.P.; Wood, A.A.; Read, M.A.; Gowan, S.M.; Dosanjh, H.S.; Trent, J.O.; Jenkins, T.C.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **Human Telomerase Inhibitors by Regioisomeric Disubstituted Amidoanthracene-9,10-diones.** *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4873-4884
- 175 Perry, P.J.; Read, M.A.; Davies, R.T.; Gowan, S.M.; Reszka, A.P.; Wood, A.A.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **2,7-Disubstituted Amidofluorenone Derivatives as Inhibitors of Human Telomerase.** *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 2679-2684
- 176 Read, M.A.; Wood, A.A.; Harrison, J.R.; Gowan, S.M.; Kelland, L.R.; Dosanjh, H.S.; Neidle, S. **Molecular Modeling Studies on G-Quadruplex Complexes of Telomerase Inhibitors: Structure-Activity Relationships.** *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4538-4546
- 177 Harrison, R.J.; Gowan, S.M.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **Human Telomerase Inhibition by Substituted Acridine Derivatives.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2463-2468
- 178 Read, M.; Harrison, R.J.; Romagnoli, B.; Tanious, F.A.; Gowan, S.H.; Reszka, A.P.; Wilson, W.D.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *98*, 4844-4849
- 179 Gowan, S.H.; Harrison, R.J.; Patterson, L.; Valenti, M.; Read, M.A.; Neidle, S. Kelland, L.R. **A G-Quadruplex-Interactive Potent Small-Molecule Inhibitor of Telomerase Exhibiting in Vitro and in Vivo Antitumor Activity.** *Mol. Pharm.*, **2002**, *61*, 1154-1162
- 180 Harrison, R.J.; Cuesta, J.; Chessari, G.; Read, M. A.; Basra, S.K.; Reszka, A.P.; Morrell, J.; Gowan, S.H.; Incles, C.M.; Tanious, F.A.; Wilson, W.D.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **Trisubstituted Acridine Derivatives as Potent and Selective Telomerase Inhibitors.** *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4463-4476

## OBJECTIUS

---

En la present tesi s'han plantejat dues línies principals de recerca:

### **1.- Obtenció de conjugats acridina-oligonucleòtid i la seva avaluació com a estabilitzadors d'estructures quàdruplex i com a inhibidors de la telomerasa.**

Com s'ha comentat anteriorment, en els últims anys s'han descrit varies molècules que produeixen una inhibició de la telomerasa com a conseqüència de l'estabilització d'estructures quàdruplex de G als extrems telomèrics. Aquest tipus d'inhibidors, generalment sistemes heteroaromàtics policíclics amb diferents patrons de substitució (fig. 17), havien despertat enormes esperances per tal de desenvolupar nous fàrmacs anticancerígens selectius, sense pràcticament efectes secundaris. Desafortunadament, però, la majoria d'aquests compostos presenten una citotoxicitat inespecífica força elevada. Aquesta és deguda a que la major part d'ells (antraquinones, porfirines, derivats d'etidi, acridines, ...), pertanyen a famílies de compostos que són coneguts, des de ja fa temps, com a intercaladors de DNA. Així doncs, la interacció d'aquestes molècules amb els extrems telomèrics competeix amb la intercalació en altres zones del cromosoma. Aquesta interacció inespecífica és la responsable de la toxicitat generalitzada manifestada fins ara. En aquest context, va sorgir la idea d'intentar minimitzar aquesta toxicitat mitjançant la conjugació d'alguna d'aquestes molècules a un oligonucleòtid de seqüència complementària a la del DNA telomèric o a la de l'RNA de la telomerasa. D'aquesta manera, i aprofitant les característiques de reconeixement molecular dels àcids nuclèics, cal esperar que l'oligonucleòtid del conjugat s'hibridi amb la seva seqüència complementària situada als extrems cromosòmics, dirigint així la molècula estabilitzadora de quàdruplex de G cap a la zona telomèrica. Com a resultat, s'aconseguiria dotar de selectivitat aquestes molècules, minimitzant la seva intercalació en altres zones del cromosoma. D'entre tots els sistemes aromàtics descrits, s'ha decidit començar a treballar amb les acridines disubstituídes, ja que al moment de començar el present treball era una de les famílies que més bones perspectives presentava. Així doncs, l'objectiu de la primera part de la tesi ha estat desenvolupar una metodologia sintètica general per tal

d'obtenir conjugats acridina-oligonucleòtid i sintetitzar una primera família de conjugats. Finalment, s'ha volgut estudiar i avaluar la seva capacitat d'estabilització d'estructures quàdruplex de G, així com també la seva activitat biològica en assaigs d'inhibició de la telomerasa.

## **2.- Estudi del motiu quàdruplex de G en oligonucleòtids cíclics rics en guanines.**

El segon objectiu d'aquesta tesi s'emmarca en un context més estructuralista. En els últims anys s'ha despertat un gran interès en l'estudi estructural dels quàdruplex de G. Aquest fet ha estat degut a la més que probable formació d'aquestes estructures en diferents zones del genoma i a la seva participació en diversos processos biològics, esdevenint així una diana terapèutica de singular importància. Per altra banda, en el nostre grup de recerca fa temps que es treballa en la síntesi d'oligonucleòtids cíclics i en el seu estudi estructural, basant-se sobretot en el motiu anomenat *bi-loop*. Tenint en compte que no hi ha realitzat cap estudi estructural de quàdruplex de guanina en oligonucleòtids cíclics, ha semblat interessant aprofitar l'experiència del grup per a sintetitzar oligonucleòtids cíclics rics en guanines i estudiar-ne la seva estructura. A més a més, convé recordar que els derivats acridínics que s'ha plantejat sintetitzar en la primera part del treball interaccionen amb estructures quàdruplex de G. És per això que l'objectiu d'aquesta segona part de la tesi ha estat el disseny i la síntesi d'oligonucleòtids cíclics rics en guanines per tal de realitzar un estudi detallat de la seva estructura. Posteriorment, s'han estudiat els efectes que produeixen els derivats acridínics sintetitzats sobre les estructures quàdruplex que formen els oligonucleòtids cíclics en qüestió.