

CONCLUSIONS

- 1.- S'han dissenyat i avaluat diferents estratègies de síntesi de derivats de la 3,6-diaminoacridina (proflavina) susceptibles de ser conjugats a oligonucleòtids. S'ha comprovat que l'acilació selectiva d'un dels grups amino de la proflavina no resulta una opció adequada per obtenir derivats de la proflavina asimètricament disubstituïts. Tanmateix, l'addició de Michael d'amines secundàries sobre el diacriloil derivat de la proflavina permet trencar la simetria del sistema aromàtic i obtenir un conjunt de derivats acridínics funcionalitzats amb àcid carboxílic.

- 2.- La formació d'un enllaç amida entre els derivats acridínics i els 5'-amino-oligonucleòtids ancorats al suport polimèric ha conduït a l'obtenció d'una petita biblioteca de conjugats acridina-oligonucleòtid que incorpora diversitat estructural a nivell dels derivats acridínics, de les seqüències oligonucleotídiques i dels espaiadors (*linkers*) que uneixen els dos components anteriors. S'ha comprovat que per tal d'obtenir els conjugats és convenient:
 - Fer servir un suport de poliestirè-divinilbenzè (PS) per a la síntesi en fase sòlida, enlloc del convencional de boles de vidre (CPG)
 - Utilitzar els protectors de les nucleobases més làbils a l'amoniac.
 - Emprar *p*-nitrobenzensulfonat de pentafluorofenil (PFNB) com a agent de condensació per a la formació de l'amida.
 - Dur a terme l'etapa final de desprotecció del conjugat a temperatura ambient, per tal d'evitar una reacció secundària de tipus retro-Michael, que condueix a la descomposició del conjugat.

- 3.- La tècnica FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) s'ha mostrat molt eficient per a l'estudi de l'estabilització que produeixen les acridines i els conjugats en quàdruplex de guanines intramoleculares formats per la seqüència telomèrica humana, ja que és senzilla, ràpida i prou acurada.

Totes les acridines obtingudes que contenen almenys un braç format per una amina alifàtica terciària i cíclica separada d'un grup etilendiamina de l'anell

acridínic han mostrat una apreciable estabilització dels conjugats, àcids carboxílics o amides, no afavoreix a l'estabilització d'aquestes estructures. Les acridines que més estabilitzen els quàdruplex de G són l'**A7**, l'**A18**, l'**A19** i l'**A23**.

- 4.- Per dur a terme l'estudi dels conjugats mitjançant FRET s'han dissenyat i assajat diferents oligonucleòtids formadors de quàdruplex que permeten avaluar, no només l'estabilització dels quàdruplex produïda per la part acridínica, sinó també la formació de dúplex entre la part oligonucleotídica i l'extrem de la seqüència formadora de quàdruplex.

La majoria dels conjugats obtinguts estabilitzen quàdruplex de G, encara que en menor grau que les acridines, segurament per efectes de repulsió electrònica i/o estèrica. Per tal que l'estabilització sigui màxima, és necessari que la part oligonucleotídica del conjugat estigui suficientment allunyada de la part acridínica.

S'ha pogut observar que els conjugats que contenen una seqüència oligonucleotídica complementària a la telomèrica formen un dúplex amb el segment sobresortint del quàdruplex sempre que la longitud de l'espaiador sigui l'adequada. En aquest sentit, dos dels oligonucleòtids formadors de quàdruplex dissenyats, **HT5** i **HT6**, semblen adequats per a l'estudi d'ambdues interaccions.

- 5.- La capacitat inhibidora de la telomerasa que presenten les acridines i els seus conjugats s'ha avaluat mitjançant un assaig de TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*) modificat, fent ús del *kit* comercial anomenat TRAPeze XL (Chemicon) que incorpora la tecnologia Amplifluor[®]. La interferència entre la fluorescència de les acridines i la dels sistemes Amplifluor[®] impedeix determinar per espectroscòpia de fluorescència l'activitat de la telomerasa i, per tant, la capacitat inhibidora dels derivats acridínics. No obstant, l'electroforesi en gels de poliacrilamida posa clarament de manifest que la majoria d'acridines i de conjugats assajats provoquen una inhibició de la telomerasa. La magnitud d'aquesta inhibició es correlaciona força bé amb la capacitat d'estabilització de quàdruplex de G. Així, les acridines es comporten com a inhibidors més potents de la telomerasa que els conjugats que les contenen (les millors IC₅₀ són de 16 i 50 µM, respectivament).

- 6.- S'han obtingut tres oligonucleòtids cíclics rics en guanina i potencialment formadors de quàdruplex de G mitjançant un mètode de síntesi en fase sòlida. L'anàlisi i purificació per HPLC dels productes ha presentat més dificultats de les habituals, segurament degut a agregacions, que s'han pogut minimitzar usant tampons d'acetat de trietilamoni enlloc d'acetat d'amoni.

- 7.- Els espectres de diroïsmes circular (DC) de l'oligonucleòtid **d<pTTGGTTGG>**, tant en presència de Na⁺ com de K⁺, mostren un perfil que no es correspon amb

cap dels típics descrits per quàdruplex de G, i que podria reflectir la presència d'una mescla d'estructures, possiblement dimèriques, de baixa estabilitat. Per altra banda, la ressonància magnètica nuclear (RMN) mostra senyals característiques de quàdruplex, però confirma la presència en solució d'almenys dues estructures, que podrien correspondre a diferents quàdruplex bimoleculars amb una orientació relativa dels cicles diferent (paral.lela o antiparal.lela).

- 8.- L'espectre de DC que presenta l'oligonucleòtid **d<pTTAGGGTTAGGG>**, que conté dos repeticions telomèriques humanes, en presència de Na⁺ 100 mM, mostra el perfil típic dels quàdruplex de G antiparal.lels. L'estructura formada per aquest oligonucleòtid és sens dubte multimèrica i a una concentració de 50 µM mostra una apreciable estabilitat (T_m=44°C). L'anàlisi dels espectres d'RMN enregistrats en diferents condicions, tot i que no permet assignar completament les senyals i resoldre l'estructura, mostra que correspon a un quàdruplex de G dimèric, on els dos cicles que el formen es troben orientats de forma paral.lela entre sí i que, per tant, es pot assimilar a un quàdruplex de G dels anomenats de tipus cistella.
- 9.- L'oligonucleòtid **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>** mostra, en presència de K⁺ 100 mM, uns espectres de DC que corresponen als d'un quàdruplex de G antiparal.lel, molt probablement monomèric de tipus cadira.
- 10.- Totes les acridines assajades (**A7**, **A18**, **A21**) produeixen una notable estabilització del quàdruplex format per l'oligonucleòtid **d<pTTAGGGTTAGGG>**, que va dels 7°C als 15°C quan la relació molar quàdruplex/acridina es 1:2. L'efecte produït per les diferents acridines és consistent amb els resultats obtinguts en els experiments de FRET i posa de manifest que aquest oligonucleòtid cíclic pot ser un bon model per avaluar la capacitat de diferents molècules d'estabilitzar quàdruplex de G.
En el cas de **d<pTTGGTTGG>**, per DC s'observa que les acridines arriben a induir l'estructuració de l'oligonucleòtid en forma d'un quàdruplex ben definit, més en presència de K⁺ que de Na⁺. A les concentracions pròpies d'RMN, el quàdruplex format per **d<pTTGGTTGG>** en presència de l'acridina **A21** forma agregats ordenats d'alt pes molecular que segurament corresponen a estructures supramoleculars de l'estil de cables de G.