

# ÍNDEX

---

## INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

<b>Introducció</b>	<b>1</b>
A. Quàdruplex de guanina	1
A.1 Introducció històrica	1
A.2 Estructura	1
A.2.1 Topologia	2
A.2.2 Importància dels ions	5
A.2.3 Tècniques usades per a l'estudi dels quàdruplex	7
A.2.4 Polimorfisme	9
A.3. Presència dels quàdruplex <i>in vivo</i>	10
A.3.1 Proteïnes que interaccionen amb quàdruplex	11
A.3.2 Possibles papers biològics dels quàdruplex	12
A.3.3 Implicacions dels quàdruplex de G en certes disfuncions	13
A.3.4 Quàdruplex de G com a agents terapèutics	14
A.4 Quàdruplex de G com a diana terapèutica	15
B. Telòmers, telomerasa i càncer	16
B.1 Telòmers	16
B.1.1 Constitució dels telòmers	16
B.1.2 Estructura i funció	17
B.1.3 Eскурçament	18
B.1.3.1 El problema de la replicació telomèrica	19
B.1.3.2 Senescència i mort cel·lular	20
B.2 La telomerasa	21
B.2.1 Mecanismes d'acció	21
B.2.2 Telomerasa com a diana terapèutica	22
B.3 Inhibidors de la telomerasa	23
B.3.1 Molècules que interaccionen amb els quàdruplex de G	24
C. Bibliografia	26
<b>Objectius</b>	<b>35</b>

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

<b>Capítol 1. Síntesi de conjugats acridina-oligonucleòtid</b>	<b>37</b>
1.1 Introducció	37
1.1.1 Objectius	37
1.1.2 Conjugats acridina-oligonucleòtid a la literatura	39
1.1.3 Disseny dels conjugats	39
1.2 Síntesi d'un derivat fosforamidit d'acridina	42
1.2.1 Intents d'obtenir el derivat 3-(4-hidroxi-butiramido)-6-(3- <i>N</i> -piperidino-propionamido)acridina <b>A5</b>	42
1.2.1.1 Síntesi del derivat 3-(3- <i>N</i> -piperidinopropionamido)-6-aminoacridina <b>A3</b>	43
1.2.1.1.1 Assaigs de monoacilació de la proflavina per reacció amb un clorur d'àcid	43
1.2.1.1.2 Intents d'hidròlisi parcial de la 3,6-bis(3- <i>N</i> -piperidino-propionamido)acridina <b>A7</b>	46
1.2.1.1.3 Síntesi del derivat monoacilat <b>A3</b> en fase sòlida	47
1.2.1.2 Intents d'acilació del derivat <b>A3</b> per tal d'obtenir el producte desitjat <b>A5</b>	51
1.2.1.2.1 Assaigs de la reacció del derivat <b>A3</b> amb l'àcid 4-hidroxi-butíric protegit	51
1.2.1.2.2 Intents d'obtenir el clorur de l'àcid 4-hidroxi-butíric	52
1.2.2 Síntesi del derivat 3-(3- <i>N</i> -(3-amino-1-propanol)propionamido)-6-(3-piperidinopropionamido)acridina <b>A19</b>	53
1.2.2.1 Síntesi de la 3,6-bis(acrilòilamido)acridina <b>A16</b>	55
1.2.2.2 Addició d'una molècula de piperidina al derivat <b>A16</b>	56
1.2.2.3 Síntesi de la 3-(3-( <i>N</i> -3-amino-1-propanol)propionamido)-6-(3-piperidinopropionamido)acridina <b>A19</b>	57
1.3 Replantejament de l'estratègia: conjugació a través de la formació d'un enllaç amida	58
1.3.1 Síntesi de derivats acridínics funcionalitzats amb un àcid carboxílic	58
1.4 Síntesi d'oligonucleòtids modificats amb un grup amino en 5'	61
1.4.1 Síntesi de l'espaiador <b>LN3</b>	63
1.4.2 Síntesi dels 5'-amino-oligonucleòtids	64
1.4.2.1 Obtenció de les resines DMT-T-succ-Ala-MBHA-PS i DMT-dA <sup>Bz</sup> -succ-Ala-MBHA-PS	65
1.4.2.2 Elongació de la cadena oligonucleotídica	67
1.5 Assaigs de conjugació	68
1.5.1 Assaigs sobre CPG-oligonucleotidil resines	69
1.5.2 Assaigs sobre PS-oligonucleotidil resines	70
1.6 Síntesi d'una primera família de conjugats acridina-oligonucleòtid	72
1.6.1 Síntesi del PFNB	72
1.6.2 Obtenció dels conjugats	73
1.6.2.1 Consideracions per a la síntesi de conjugats en 3'	77
1.6.2.2 Quantificació dels conjugats obtinguts	77
1.6.2.3 Càlcul del coeficient d'extinció molar de les acridines <b>A21</b> i <b>A22</b>	79
1.7 Bibliografia	81

<b>Capítol 2. Avaluació dels conjugats i les acridines per FRET i TRAP</b>	<b>83</b>
2.1 Introducció i objectius	83
2.2 Estudis d'estabilització de quàdruplex de G mitjançant FRET	84
2.2.1 Descripció de la tècnica FRET	84
2.2.1.1 Fonament teòric	84
2.2.1.2 Aplicacions a l'estudi de l'estructura dels àcids nucleics	87
2.2.1.3 Raons per l'elecció de la tècnica FRET	88
2.2.2 Avaluació de l'efecte estabilitzant de les acridines	90
2.2.2.1 Disseny dels experiments amb acridines	90
2.2.2.2 Primers experiments amb <b>HT4</b>	92
2.2.2.3 Experiments a diferents concentracions d'acridines	95
2.2.3 Avaluació dels conjugats	97
2.2.3.1 Disseny dels experiments amb conjugats	97
2.2.3.2 Estudis amb <b>HT5</b>	100
2.2.3.3 Estudis amb <b>HT6</b>	102
2.2.3.4 Estudis amb <b>HTmod</b>	104
2.3 Estudis d'inhibició de la telomerasa mitjançant l'experiment TRAP	106
2.3.1 L'experiment TRAP	106
2.3.1.1 Fonament de l'experiment	106
2.3.1.2 Millores introduïdes	108
2.3.1.3 Kits comercials	111
2.3.2 TRAPeZe XL Telomerase Detection Kit	113
2.3.2.1 Components del kit	113
2.3.3 Assaigs preliminars	115
2.3.3.1 Recta de calibratge	115
2.3.3.2 Assaig preliminar amb acridines	116
2.3.3.3 Estudi per electroforesi en gel de poliacrilamida	118
2.3.4 Assaigs amb acridines	119
2.3.5 Assaigs amb conjugats	122
2.4 Discussió dels resultats obtinguts i perspectives	124
2.5 Bibliografia	127
<b>Capítol 3. Estudi de quàdruplex de guanines en oligonucleòtids cíclics</b>	<b>129</b>
3.1 Introducció i objectius	129
3.2 Síntesi d'oligonucleòtids cíclics rics en G	130
3.2.1 Mètodes de síntesi d'oligonucleòtids cíclics	130
3.2.2 Disseny de les seqüències	131
3.2.3 Obtenció dels oligonucleòtids <b>d&lt;pTTGGTTGG&gt;</b> i <b>&lt;pTTAGGGTTAGGG&gt;</b>	132
3.2.3.1 Síntesi de la nucleotidil-resina	134
3.2.3.2 Elongació de la cadena nucleotídica i ciclació	135
3.2.3.3 Desprotecció, escissió i dessalatge del producte cíclic	136
3.2.3.4 Anàlisi i purificació	137
3.3 Estudi estructural dels oligonucleòtids <b>d&lt;pTTGGTTGG&gt;</b> i <b>&lt;pTTAGGGTTAGGG&gt;</b>	140
3.3.1 Tècniques emprades per a l'estudi estructural dels quàdruplex de G	140

3.3.1.1 Espectroscòpia ultravioleta	140
3.3.1.2 Dicroïsme circular	141
3.3.1.3 Ressonància magnètica nuclear	142
3.3.1.3.1 Experiments bidimensionals	143
3.3.1.3.2 Assignació de l'espectre	144
3.3.1.3.3 Informació estructural	146
3.3.2 Estudi estructural de <b>d&lt;pTTGGTTGG&gt;</b>	146
3.3.2.1 Estudi d'estabilitat tèrmica per UV	146
3.3.2.2 Estudi mitjançant DC	147
3.3.2.3 Estudi mitjançant RMN	150
3.3.3 Estudi estructural de <b>d&lt;pTTAGGGTTAGGG&gt;</b>	155
3.3.3.1 Estudi d'estabilitat tèrmica per UV	155
3.3.3.2 Estudi mitjançant DC	155
3.3.3.3 Estudi mitjançant RMN	159
3.3.3.4 Conclusió de l'estudi estructural	163
3.3.4 Discussió dels resultats obtinguts	165
3.4 Síntesi i estudi estructural mitjançant DC de <b>d&lt;pTTGGTTGGTTGGTTGG&gt;</b>	165
3.4.1 Obtenció de <b>d&lt;pTTGGTTGGTTGGTTGG&gt;</b>	166
3.4.2 Estudi per DC de <b>d&lt;pTTGGTTGGTTGGTTGG&gt;</b>	167
3.5 Estudi de la interacció dels oligonucleòtids cíclics obtinguts amb derivats acridínics	170
3.5.1 Interacció dels quàdruplex de G amb diferents molècules	170
3.5.2 Estudi de l'estabilització que produeixen alguns dels derivats acridínics obtinguts a les estructures adoptades pels oligonucleòtids cíclics <b>d&lt;pTTGGTTGG&gt;</b> i <b>d&lt;pTTAGGGTTAGGG&gt;</b>	171
3.5.2.1 Estudi de l'estabilització que produeixen certes acridines a l'estructura adoptada per <b>d&lt;pTTGGTTGG&gt;</b>	172
3.5.2.2 Estudi de l'estabilització que produeixen certes acridines a l'estructura quàdruplex adoptada per <b>d&lt;pTTAGGGTTAGGG&gt;</b>	176
3.6 Bibliografia	179

## PART EXPERIMENTAL

<b>Materials i mètodes</b>	<b>181</b>
A. Dissolvents, reactius generals i dissolucions tampó	181
A.1 Dissolvents i reactius generals	181
A.2 Preparació de dissolucions tampó	182
A.2.1 Acetat d'amoni (NH <sub>4</sub> OAc), 2 M, pH 7	182
A.2.2 Acetat de trietilamoni (TEAAc), 2 M, pH 7	182
A.2.3 Bicarbonat de trietilamoni (TEAB), 2 M, pH 7	182
A.2.4 Pipes, 100 mM, pH 7	182
B. Instrumentació i tècniques generals	182
B.1 Tècniques espectroscòpiques	182
B.1.1 Ressonància magnètica nuclear (RMN)	182
B.1.2 Espectroscòpia ultravioleta (UV)	183
B.2 Espectrometria de masses	183

B.2.1 Preparació de les matrius i co-matrius utilitzades	183
B.2.2 Preparació de les mostres per a MALDI-TOF	183
B.3 Tècniques cromatogràfiques	184
B.3.1 Cromatografia en capa fina (CCF)	184
B.3.2 Cromatografia en columna	184
B.3.3 Cromatografia líquida	185
B.3.3.1 Cromatografia líquida analítica	185
B.3.3.2 Cromatografia líquida preparativa	185
B.3.3.3 Cromatografia d'exclusió molecular	186
B.3.3.4 Cromatografia de bescanvi iònic	186
B.4 Altres tècniques	186
C. Síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida	187
C.1 Instrumentació i reactius generals	187
C.2 Càlcul de l'eficiència d'acoblament i rendiment global en la síntesi automàtica	187
C.3 Quantificació d'oligonucleòtids	188
C.4 Dessalatge d'oligonucleòtids	189
D. Mètodes analítics	189
D.1. Assaig qualitatiu de la ninhidrina	189
D.2 Determinació de la funcionalització de resines	190
D.2.1 Funcionalització d'Fmoc-resines	190
D.2.2 Funcionalització de DMT-resines	190
E. Pre-tractaments de les resines	191
E.1 Resina cloro-trítol	191
E.2 Resina MBHA	191
E.3 Resina TentaGel	192

## **Experimental capítol 1** **193**

1.1 Síntesi de derivats acridínics	193
1.1.1 Obtenció de la proflavina	193
1.1.2 Síntesi de la 3-(3-cloropropionamido)-6-aminoacridina <b>A2</b>	194
1.1.3 Síntesi de la 3-(3-piperidinopropionamido)-6-aminoacridina <b>A3</b>	194
1.1.4 Síntesi de l'àcid 4-O-trítol-hidroxibutíric <b>A4</b>	195
1.1.5 Síntesi de la 3,6-bis(3-cloropropionamido)acridina <b>A6</b>	195
1.1.6 Síntesi de la 3,6-bis(3-piperidinopropionamido)acridina <b>A7</b>	196
1.1.7 Síntesi de la 3-N-Fmoc-proflavina <b>A11</b>	197
1.1.8 Síntesi de la 3,6-bis(acriloilamido)acridina <b>A16</b>	197
1.1.9 Síntesi de la 3-(3-piperidinopropionamido)-6-acriloilamidoacridina <b>A17</b>	198
1.1.10 Síntesi de la 3-(3-pirrolidinopropionamido)-6-acriloilamidoacridina <b>A18</b>	198
1.1.11 Síntesi de la 3-(3-(N-3-amino-1-propanol)-propionamido)-6-(3-piperidinopropionamido)acridina <b>A19</b>	199
1.1.12 Síntesi de la 3-(3-N-(L-prolina)propionamido)-6-(3-piperidinopropionamido)acridina <b>A20</b>	200
1.1.13 Síntesi de la 3-(3-N-(L-prolina)propionamido)-6-(3-pirrolidinopropionamido)acridina <b>A21</b>	200
1.1.14 Síntesi de la 3-(3-N-(àcid isonipecòtic)propionamido)-6-(3-pirrolidino-	

propionamido)acridina <b>A22</b>	201
1.1.15 Síntesi de la 3-(3- <i>N</i> -(àcid isonipecòtic)propionamido)-6-(3-piperidino-propionamido)acridina <b>A23</b>	202
1.1.16 Síntesi de la 3,6-bis(3- <i>N</i> -(L-prolina)propionamido)acridina <b>A24</b>	202
1.1.17 Síntesi de la 3,6-bis(3- <i>N</i> -(L-prolinamida)propionamido)acridina <b>A25</b>	203
1.2 Síntesi de conjugats acridina-oligonucleòtid	204
1.2.1 Obtenció dels 5'-amino-oligonucleòtids <b>OL1-6</b>	204
1.2.1.1 Síntesi de l'espaiador <b>LN3</b>	204
1.2.1.1.1 Síntesi del 3- <i>N</i> -MMT-3-amino-1-propanol	204
1.2.1.1.2 Síntesi de l' <i>O</i> -fosforamidit del 3- <i>N</i> -MMT-3-amino-1-propanol <b>LN3</b>	204
1.2.1.2 Obtenció de les nucleotidil-resines DMT-T-succ-Ala-MBHA-PS i DMT-dA <sup>Bz</sup> -succ-Ala-MBHA-PS	205
1.2.1.2.1 Síntesi del nucleosil derivat DMT-T-succ	205
1.2.1.2.2 Síntesi del nucleosil derivat DMT-dA <sup>Bz</sup> -succ	206
1.2.1.2.3 Obtenció de la nucleotidil resina DMT-T-succ-Ala-MBHA-PS	206
1.2.1.2.4 Obtenció de la nucleotidil resina DMT-dA <sup>Bz</sup> -succ-Ala-MBHA-PS	207
1.2.1.3 Elongació de la cadena nucleotídica	208
1.2.2 Obtenció dels conjugats acridina-oligonucleòtid <b>C1-7</b>	209
1.2.3 Càlcul dels coeficients d'extinció molar de les acridines <b>A21 i A22</b>	210
<b>Experimental capítol 2</b>	<b>211</b>
2.1 <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (FRET)	211
2.2 <i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i> (TRAP)	212
2.2.1 Extracció de la telomerasa	212
2.2.2 Experiment TRAP	212
2.2.2.1 Preparació de mostres per a la generació de la recta de calibratge	212
2.2.2.2 Preparació de mostres per a analitzar capacitats d'inhibició de derivats acridínics	213
2.2.2.3 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	214
2.2.3 Anàlisi de l'experiment TRAP	215
2.2.3.1 Mesures de fluorescència	215
2.2.3.2 Electroforesi no desnaturalitzant en gel de poliacrilamida	215
2.2.3.2.1 Gel no desnaturalitzant	216
2.2.3.2.2. Tinció del gel no desnaturalitzant	216
2.2.3.2.3 Anàlisi quantitatiu del gel	216
<b>Experimental capítol 3</b>	<b>219</b>
3.1 Síntesi dels oligonucleòtids cíclics	219
3.1.1 Protocol general de síntesi d'oligodesoxiribonucleòtids cíclics	219
3.1.1.1 Obtenció del 3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-triclorofenil	219
3.1.1.2 Obtenció del nucleotidil-espaiador bifuncional (fosfat de 3'-(5'- <i>O</i> -DMT-timidinil), 2-cloro-4-(2,4,5-triclorofenoxycarbonilmetil)fenil i 2-cianoetil)	220
3.1.1.3 Ancoratge de l'àcid <i>N</i> -Fmoc-6-aminohexanòic sobre el suport polimèric	220

3.1.1.4 Acetilació dels grups amino lliures sobre la resina	221
3.1.1.5 Desprotecció de l'àcid <i>N</i> -Fmoc-6-aminohexanòic ancorat sobre el suport polimèric	221
3.1.1.6 Ancoratge del nucleotidil-espaiador bifuncional (fosfat de 3'-(5'-O-DMT-timidinil), 2-cloro-4-(2,4,5-triclorofenoxicarbonilmetil)fenil i 2-cianoetil) sobre el suport polimèric	221
3.1.1.7 Desprotecció del grup fosfat de l'extrem 3'-terminal	222
3.1.1.8 Elongació de la cadena oligonucleotídica	222
3.1.1.9 Etapa de ciclació	223
3.1.1.10 Desprotecció dels grups fosfat internucleosídics	224
3.1.1.11 Desancoratge de l'oligonucleòtid	224
3.1.1.12 Desprotecció de les nucleobases	224
3.1.1.13 Dessalatge del cru de síntesi	224
3.1.2 Obtenció dels oligonucleòtids cíclics	225
3.1.3 Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida	225
3.1.3.1 Gel analític	225
3.1.3.2 Tinció del gel analític	226
3.1.3.3 Gel preparatiu	226
3.1.3.4 Aïllament del producte purificat	226
3.1.4 Caracterització per digestió enzimàtica	227
3.2 Experiments de fusió per UV	227
3.3 Experiments de DC	227
3.4 Experiments d'RMN	228
3.4.1 Preparació de les mostres	228
3.4.2 Adquisició dels espectres	228

## CONCLUSIONS

<b>Conclusions</b>	<b>229</b>
--------------------	------------

## ANNEXES

<b>Abreviatures</b>	<b>233</b>
---------------------	------------

<b>Programes de síntesi d'oligonucleòtids</b>	<b>235</b>
---	------------

LDB01	235
-------	-----

MSPEGPSN	237
----------	-----

LSPEGPS	239
---------	-----