

2. AVALUACIÓ DELS CONJUGATS I LES ACRIDINES PER FRET I TRAP

2.1 Introducció i objectius

Un cop obtinguts els conjugats, el següent pas ha estat avaluar-ne les seves propietats tant d'estabilització d'estructures quàdruplex de G, com d'inhibició de la telomerasa. En el procés d'obtenció dels conjugats, han estat moltes les acridines sintetitzades que han servit com a intermedis de síntesi de cara a l'obtenció dels conjugats. En aquest sentit, s'ha considerat interessant també l'avaluació d'aquestes molècules per tal d'intentar extreure algunes conclusions sobre la relació existent entre l'estructura d'aquestes i la seva capacitat per establir quàdruplex de G i/o inhibir la telomerasa.

L'objectiu que es persegueix amb la síntesi dels conjugats és minimitzar la citotoxicitat de certes acridines que havien estat descrites a la literatura com a inhibidors de la telomerasa. Aquesta inhibició es produeix a través de l'estabilització d'estructures quàdruplex de G als extrems telomèrics dels cromosomes. Així doncs, el primer que s'ha cregut convenient de fer amb els conjugats ha estat avaluar-ne aquesta capacitat d'estabilització.

Per tal d'estudiar l'estabilitat d'una estructura secundària de DNA, habitualment es duen a terme estudis de desnaturalització tèrmica, els quals es poden realitzar mitjançant un gran nombre de tècniques diferents com ara espectroscòpia UV, DC, calorimetria, o RMN entre d'altres. En el nostre cas s'ha plantejat com a primer objectiu realitzar estudis de l'estabilització de quàdruplex de G formats per seqüències telomèriques humanes que produeixen tant les acridines com els conjugats mitjançant la tècnica de *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET).

Per altra banda, s'ha cregut convenient realitzar estudis d'inhibició de la telomerasa, ja que la finalitat última dels conjugats obtinguts és que siguin capaços d'inhibir l'enzim en qüestió. L'experiment que s'utilitza habitualment per tal d'avaluar la capacitat de certes molècules d'inhibir la telomerasa s'anomena *Telomeric Repeat Amplification Protocol* (TRAP). Així doncs, el segon objectiu que s'ha plantejat ha estat l'estudi de la inhibició de la telomerasa que produeixen tant els conjugats com també

les acridines. Igualment que en l'apartat d'estabilització, l'objectiu final és poder extreure conclusions referents a les característiques estructurals òptimes per tal de produir l'inhibició de l'enzim en qüestió.

Finalment, serà també interessant poder comparar els resultats d'estabilització de quàdruplex de G amb els d'inhibició de la telomerasa i intentar veure si hi ha alguna correlació entre ambdós.

2.2 Estudis d'estabilització de quàdruplex de G mitjançant FRET

2.2.1 Descripció de la tècnica FRET

2.2.1.1 Fonament teòric

La tècnica FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) es basa en un procés fotofísic que consisteix en la transferència d'energia entre estats singlet des d'un fluoròfor (donador d'energia, D) a un altre cromòfor (acceptor d'energia, A). L'energia és transmesa a través d'una interacció dipol-dipol entre ambdues molècules, sense que es produeixi l'emissió de cap foto¹.

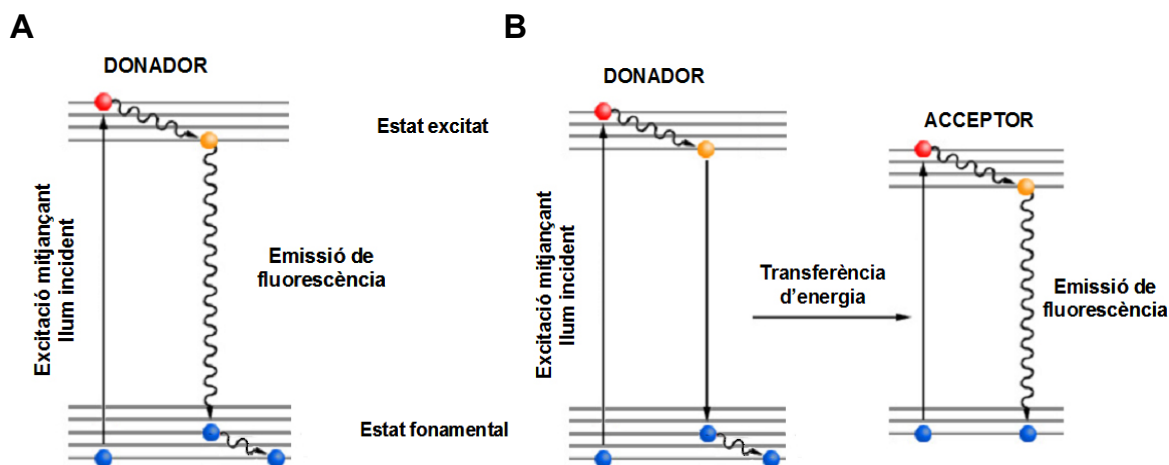


Figura 2.1 – Transicions electròniques que intervenen en un procés normal d'emissió de fluorescència (A) i en un procés de FRET (B).

Perquè aquest procés tingui lloc, primerament el donador s'ha d'excitar, i això s'aconsegueix irradiant la mostra a analitzar amb llum d'una certa longitud d'ona (llum incident). Aquesta excitació normalment es manifesta en forma d'emissió de fluorescència per part del donador (fig. 2.1A). No obstant, si aquest té algun acceptor

suficientment a prop, pot tenir lloc una transferència d'energia d'excitació des del donador a l'acceptor (fig. 2.1B). L'acceptor llavors, pot perdre aquesta energia mitjançant diversos mecanismes, d'entre els quals convé destacar l'emissió de fluorescència.

A la figura 2.2 es mostra un esquema del fenomen de FRET. Aquest es tradueix en una disminució de la intensitat de la fluorescència emesa pel donador (color verd), altrament anomenat *quenching*, i sovint, en un increment de la intensitat de la fluorescència emesa per l'acceptor (color vermell), anomenada emissió sensibilitzada. Així doncs, en un experiment de FRET, tant es pot mesurar la disminució de fluorescència emesa pel donador en presència de l'acceptor, com l'increment de fluorescència d'aquest últim en presència del donador.

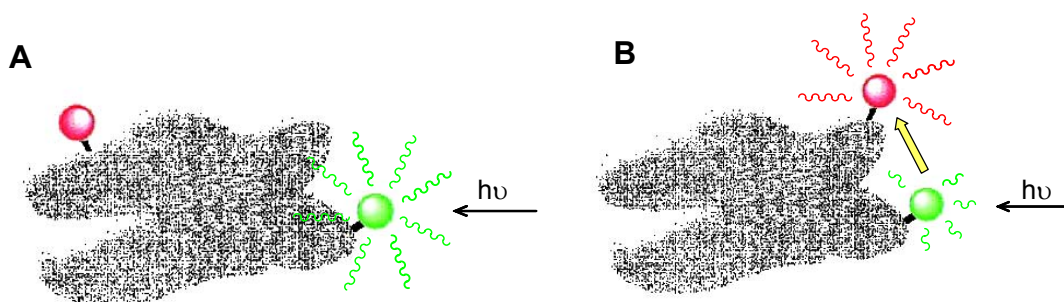


Figura 2.2 – Representació esquemàtica del procés d'emissió de fluorescència per part d'un fluoròfor quan no en té cap altre a prop (A) i del procés de FRET en el qual té lloc una transferència d'energia entre fluoròfors pròxims en l'espai (B).

La velocitat d'aquesta transferència d'energia des del donador en estat excitat a l'acceptor en estat fonamental depèn de diversos factors, com ara de la distància a la que es troben ambdós fluoròfors (R), de l'índex de refracció del medi (n), o de la integral de superposició espectral (J)². Perquè el fenomen de FRET tingui lloc, l'espectre d'emissió del donador ha de superposar-se parcialment amb l'espectre d'absorció de l'acceptor (fig. 2.3). Aquest és un requisit indispensable, i és per això que molt sovint tant el donador com l'acceptor són molècules fluorescents. Finalment, aquesta velocitat també depèn de l'orientació relativa d'ambdós fluoròfors (κ). Ambdós molècules són descrites, segons la teoria de Förster, com a oscil·ladors dipolars acoblats. Així, la probabilitat de transferència d'energia és màxima quan els dipols d'ambdós fluoròfors tenen orientacions paral·leles. Altrament, aquesta probabilitat tendeix a zero quan estan orientats perpendicularment. El valor de κ es troba comprès entre 0 i 4, utilitzant-se normalment 2/3 en els casos d'orientació aleatòria dels dipols.

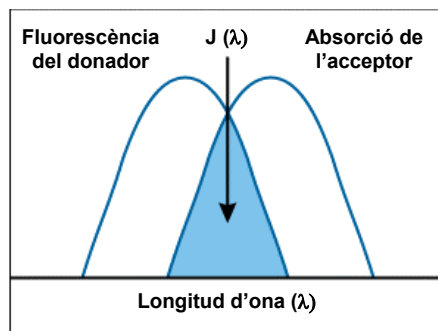


Figura 2.3 – Representació esquemàtica de la superposició espectral necessària perquè tingui lloc el fenomen FRET.

L'eficiència d'aquest procés de transferència d'energia es defineix com la quantitat d'energia transferida pel donador, dividida per la quantitat d'energia absorbida per l'acceptor. Aquesta magnitud s'expressa matemàticament amb la següent equació³:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

En ella, R representa la distància a la que es troben ambdós fluoròfors, mentre que R_0 s'anomena radi de Förster, i es defineix com la distància a la qual la transferència d'energia té una eficiència del 50%. Aquest valor s'ha de determinar experimentalment per a cada parella donador-acceptor. Tanmateix, aquest valor es troba entre els 10 i els 100 Å en la majoria de parelles.

En el fenomen de FRET, tant la velocitat de transferència d'energia com l'eficiència del procés són altament sensibles a la distància que separa ambdós fluoròfors. Mentre que la velocitat és inversament proporcional a la sisena potència d'aquesta distància, l'eficiència disminueix dràsticament a mesura que ambdós fluoròfors s'allunyen del radi de Förster (fig. 2.4). Aquesta característica converteix el FRET en una de les poques tècniques que permeten mesurar distàncies i/o variacions de distàncies de l'ordre de nanometres. Aquest fet explica que cada cop sigui una tècnica més emprada en el camp de la biologia molecular i estructural. A més a més, cal destacar que el FRET és una tècnica molt versàtil que pot ser usada tant *in vitro* com *in vivo*⁴. I no només ha estat usada per tal d'obtenir informació estructural de biomolècules com ara àcids nucleics⁵, proteïnes⁶, complexos proteïna-àcid nucleic³ i carbohidrats⁷ sinó també ha estat àmpliament utilitzada en el camp de la biologia molecular per tal de monitoritzar la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)⁸.

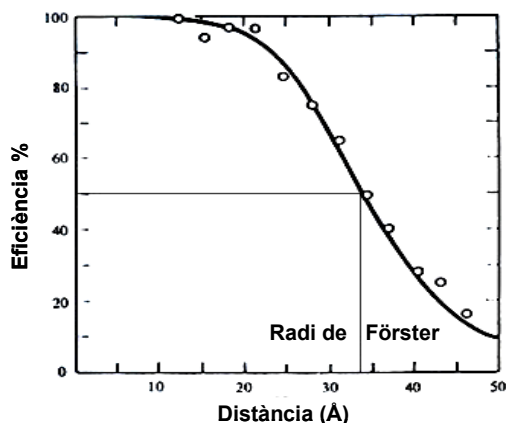


Figura 2.4 – L'eficiència del procés de transferència d'energia disminueix a mesura que augmenta la distància entre donador i acceptor.

2.2.1.2 Aplicacions a l'estudi de l'estructura dels àcids nuclèics

Tot i que la teoria del FRET va ser desenvolupada per Förster avançats els anys 40, aquesta tècnica no es començà a aplicar en el camp de la biologia fins als anys 70 amb l'estudi de proteïnes, i no fou fins uns 15 anys més tard, a cavall entre els anys 80 i 90, quan s'adoptà per a l'estudi estructural d'àcids nuclèics. Des de llavors s'han realitzat un gran nombre d'experiments en aquest camp utilitzant FRET.

Oligonucleòtids marcats amb 2 fluoròfors (un donador i un acceptor) situats en llocs estratègics de la seqüència formen un sistema FRET, podent-se seguir així les transformacions o variacions estructurals que tenen lloc mitjançant l'estudi del procés de transferència d'energia de fluorescència. En la pràctica, normalment el que es mesura és la variació de la intensitat de la fluorescència emesa pel donador.

Més concretament, mitjançant FRET es pot estudiar per exemple la formació de dúplex en un oligonucleòtid que pugui formar una forqueta (*hairpin*), l'estabilitat d'un dúplex dins d'una estructura de tríplex, o fins i tot directament la formació d'un tríplex (fig. 2.5)⁹.

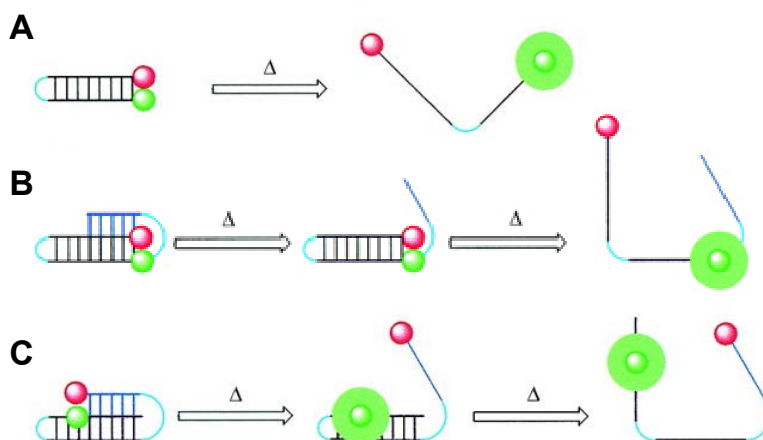


Figura 2.5 – Mitjançant FRET es poden estudiar les estabilitats de hairpins (A), de dúplex formats per oligonucleòtids formadors de tríplex (B), i de tríplex (C).

Bàsicament, la idea és sempre la mateixa: situar els fluoròfors en llocs allunyats de la cadena sense estructurar, però que es trobin propers en l'estructura que es vol estudiar. D'aquesta manera, en la conformació desestructurada pràcticament no hi ha transferència d'energia, ja que la distància mitjana entre ambdós fluoròfors és massa gran. Tanmateix, quan la molècula es troba estructurada en la forma desitjada, ambdós fluoròfors se situen propers en l'espai, observant-se una disminució de la fluorescència emesa pel donador degut al fenomen de *quenching*. És per això, que sovint s'utilitza el terme *quencher* per referir-se a l'acceptor.

Aquesta tècnica ha estat utilitzada darrerament per tal d'estudiar també motius quàdruplex, ja siguin *i-motifs*¹⁰, o sobretot, quàdruplex de G¹¹. A la figura 2.6 es mostren alguns dels experiments realitzats per tal de seguir la formació de quàdruplex de G, tant unimoleculars com bimoleculars.

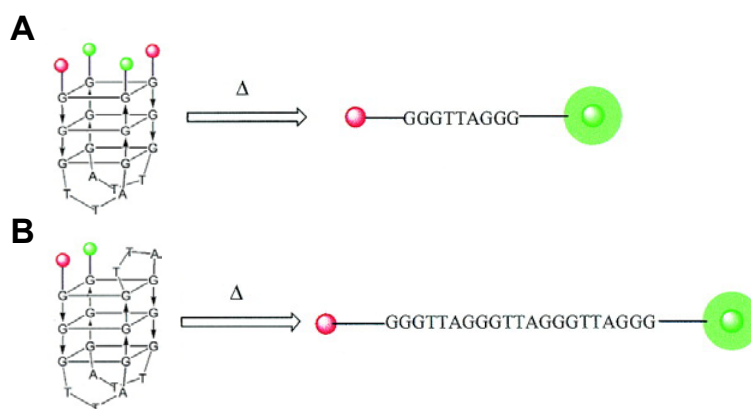


Figura 2.6 – Models per a l'estudi estructural de quàdruplex de G bimoleculars (A) i unimoleculars (B) mitjançant FRET.

En el camp dels quàdruplex de G la tècnica de FRET ha estat utilitzada en els darrers anys per a realitzar tot tipus d'estudis estructurals. S'ha estudiat, per exemple, com afecten la longitud dels *loops* a l'estabilitat global del quàdruplex^{12,13}, o s'han fet estudis competitius de formació de quàdruplex respecte dúplex en seqüències telomèriques en presència de les seves cadenes complementàries¹⁴. Finalment s'han realitzat també estudis cinètics¹⁵ i dinàmics¹⁶ de la formació d'aquestes estructures, així com també estudis de la interacció de diverses molècules amb estructures quàdruplex^{17,18}.

2.2.1.3 Raons per l'elecció de la tècnica FRET

Per tal de determinar l'estabilitat d'estructures secundàries d'àcids nucleics i/o la seva interacció amb lligands, habitualment es realitzen estudis de desnaturalització tèrmica (fusió) dels oligonucleòtids a estudiar. Aquests tipus d'experiments es basen en tenir un o més oligonucleòtids (depenent de l'estudi a realitzar) dissolts en unes condicions salines apropiades perquè tingui lloc l'estructuració desitjada. A mesura

que s'escalfa la solució que conté les molècules de DNA estructurades, les diferents cadenes que formen l'estructura global se separen, i l'estructura "es fon". La temperatura al punt mig de la transició és el que s'anomena temperatura de fusió T_m (*melting temperature*), i ens indica l'estabilitat de l'estructura. La T_m respon a la situació on el 50% de la mostra es troba encara estructurada, mentre que l'altre 50% es troba ja desestructurada. Els valors de T_m serveixen per comparar els efectes que produeixen a una estructura determinada diferents condicions experimentals, seqüències diferents, o la interacció amb diferents lligands. Anteriorment s'ha fet menció del gran nombre de tècniques mitjançant les quals es poden realitzar aquests estudis. La tècnica més àmpliament usada en química d'àcids nucleics per a realitzar estudis de fusió és l'espectroscòpia UV, en la qual es mesuren els canvis produïts en l'absorbància de la mostra a 260 nm. Aquests canvis tenen lloc perquè a mesura que l'estructura es va fonent, les nucleobases deixen d'estar apilades i passen a estar exposades al dissolvent, cosa que comporta habitualment un augment en l'absorbància global de la mostra (hipercromicitat).

En el nostre cas, no obstant, s'ha decidit usar la tècnica FRET perquè reuneix alguns avantatges respecte l'espectroscòpia d'UV que ens poden ser de gran utilitat. D'entrada és una tècnica molt més sensible, de manera que es requereix molt poca quantitat de mostra per tal de realitzar els experiments. En aquest sentit no només s'empra poc volum sinó també una concentració molt baixa. A més a més, les transicions observades per fluorescència són molt més grans que els canvis d'absorbància que tenen lloc en l'UV. Finalment l'aparell utilitzat permet realitzar un gran nombre d'experiments en poc temps.

Generalment, l'anàlisi d'estabilitat d'una mostra per espectroscòpia d'UV requereix volums de l'ordre d'1 a 3 mL d'una solució que contingui almenys 0.2 OD₂₆₀, concentracions d'oligonucleòtid a partir de 1-2 μM , i difícilment es poden analitzar diverses mostres a la vegada. Amb la tècnica FRET i mitjançant l'aparell LightCycler de Roche (fig. 2.7), els experiments es duen a terme amb volums de mostra de 20 μL , concentracions de l'ordre de 0.25 μM i es poden analitzar 32 mostres simultàniament.



Figura 2.7 – LightCycler, aparell on s'han dut a terme els experiments de FRET.

Tots els estudis mitjançant FRET s'han realitzat a la University of Southampton sota la supervisió del Prof. Keith Fox. S'ha seguit el mètode posat a punt en aquest grup per l'estudi de quàdruplex de G, per bé que tant el disseny dels experiments com la seva anàlisi posterior s'ha realitzat majoritàriament a Barcelona.

2.2.2 Avaluació de l'efecte estabilitzant de les acridines

Un cop s'ha decidit la tècnica a utilitzar, s'ha cregut convenient començar analitzant les acridines. A la següent figura es mostren les estructures de totes les acridines analitzades:

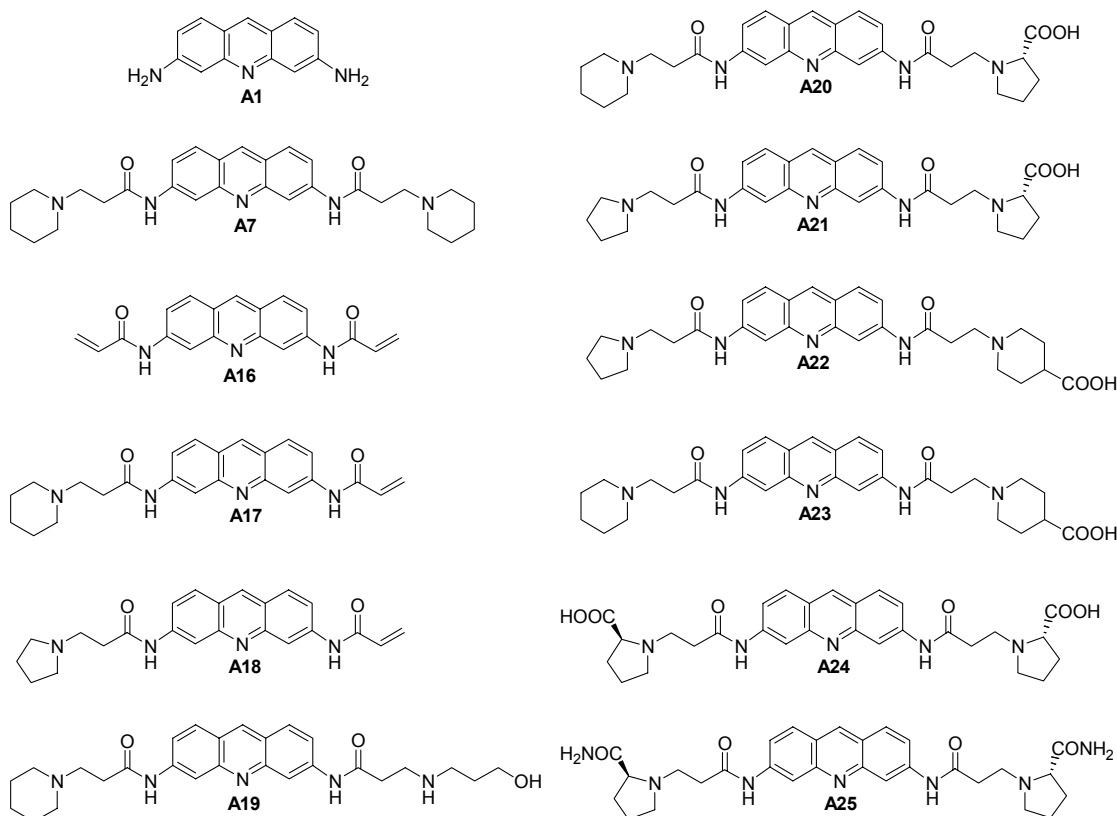


Figura 2.8 – Acridines assajades.

2.2.2.1 Disseny dels experiments amb acridines

Els estudis d'estabilització amb acridines s'han realitzat amb l'oligonucleòtid formador de quàdruplex de G HT4 (fig. 2.9), format per 21 nucleobases i que conté 3.5 repeticions de la seqüència telomèrica humana més els 2 fluoròfors, els quals es troben situats als dos extrems de la seqüència. Aquest i tots els altres oligonucleòtids formadors de quàdruplex emprats en els experiments de FRET s'han adquirit a Oswel Research Products Ltd (Southampton, UK).

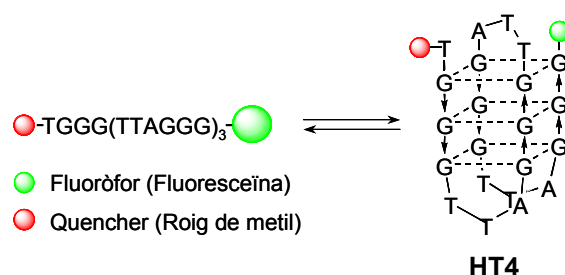


Figura 2.9 – Seqüència i estructura quàdruplex que adopta **HT4**.

A l'extrem 5' hi ha una molècula de roig de metil (MeRed) que és la que actuarà com a acceptor o *quencher*, mentre que a l'extrem 3' hi ha una molècula de fluoresceïna (FAM) que és la que actuarà com a donador o fluoròfor. A la figura 2.10 es mostra el tipus d'unió que presenten ambdues molècules respecte la cadena oligonucleotídica. Aquestes es troben unides a un anell de 2' desoxiribosa a través d'un espaiador.

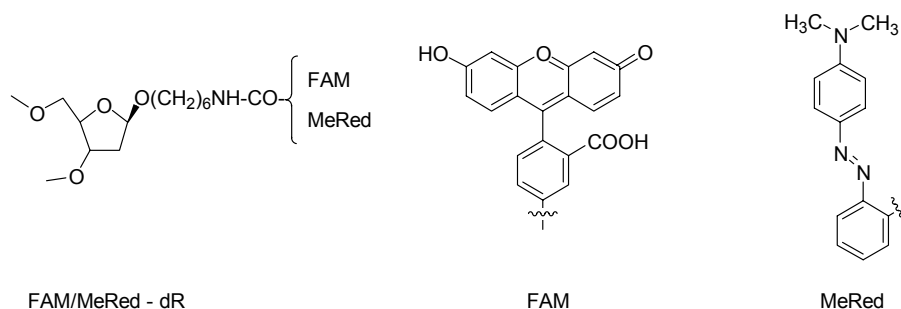


Figura 2.10 – Estructura del fluoròfor (FAM), del quencher (MeRed) i tipus d'unió que presenten ambdós a la cadena oligonucleotídica.

En la seva forma desestructurada, els dos extrems d'**HT4** es troben molt allunyats un de l'altre, de manera que no pot haver-hi transferència d'energia entre fluoròfor i *quencher*. Tanmateix, quan **HT4** es troba estructurat en forma de quàdruplex de G, ambdós extrems experimenten un important apropament espacial. En aquesta situació, sí que pot tenir lloc la transferència d'energia, de manera que en la forma estructurada s'observa un *quenching* en la fluorescència emesa per FAM.

Finalment, cal remarcar la importància que la seqüència d'**HT4** sigui homòloga a la del telòmer humà, ja que interessa avaluar la capacitat d'estabilització de les molècules sintetitzades respecte els quàdruplex de G que es puguin formar en els telòmers de les cèl·lules humanes. Com s'ha comentat a l'apartat A.2.4 de la introducció de la present memòria, l'alt polimorfisme que presenten les estructures quàdruplex de G fa que certs lligands reconeguin de forma diferent els quàdruplex de G formats per seqüències diferents.

2.2.2.2 Primers experiments amb HT4

Els experiments consten de quatre etapes i s'han dut a terme en tampó fosfat de potassi 50 mM (pH = 7.4) i amb una concentració d'**HT4** de 0.25 μ M. Primerament té lloc una desnaturalització de la mostra mitjançant un escalfament a 95°C. Aquesta temperatura es manté durant 5 minuts i llavors es procedeix a una renaturalització refredant fins a 30°C. Finalment, i després de 5 minuts a 30°C, es repeteix altre cop tot el procediment. Les velocitats tant de refredament com d'esclafament estàndards de l'aparell són de 0.1°C/segon. No obstant, també s'han realitzat experiments amb velocitats menors (1°C/min.) per tal de comprovar que les velocitats d'esclafament i refredament no afectessin al resultat de l'experiment.

En primer lloc, i abans d'avaluar cap de les acridines, s'ha realitzat una fusió de l'oligonucleòtid control (**HT4**). Aquesta es mostra a la figura 2.11, on s'observa clarament la transició produïda per la fusió del quàdruplex, amb una T_m de 71.5°C.

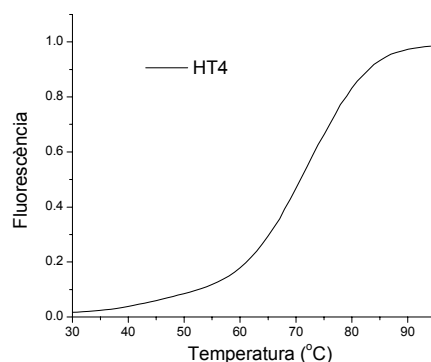


Figura 2.11 – Fusió del quàdruplex format per l'oligonucleòtid **HT4**.

A continuació s'han avaluat totes les acridines a una concentració 10 μ M. A la taula 2.1 es mostren els increments de T_m observats en cadascun dels experiments.

Acridina	ΔT_m HT4 ($T_m = 71.5^\circ\text{C}$)	Acridina	ΔT_m HT4 ($T_m = 71.5^\circ\text{C}$)
A1	0.0	A20	6.0
A7	13.5	A21	10.0
A16	0.5	A22	8.0
A17	7.5	A23	13.5
A18	14.0	A24	0.0
A19	16.0	A25	0.0

Taula 2.1 – Increments observats en la T_m d'**HT4** ($^\circ\text{C}$) per l'efecte de les acridines.

Analitzant les dades obtingudes, el primer que s'observa és que en la majoria dels casos té lloc un cert increment en la T_m d'**HT4**. Aquest fet demostra que la majoria de les acridines sintetitzades i assajades provoquen una certa estabilització de l'estructura quàdruplex formada per l'oligonucleòtid **HT4**, que cal recordar, està format

íntegrament per repeticions telomèriques humanes. Hi ha quatre acridines, no obstant, que no presenten cap increment. Entrant a analitzar més en detall els resultats obtinguts es poden extreure algunes conclusions addicionals.

Les quatre acridines que no presenten gens d'estabilització són la proflavina de partida **A1**, el seu derivat diacriloil **A16** i les acridines **A24** i **A25**, que contenen dues molècules de prolina i de prolinamida respectivament. La proflavina de partida i el seu derivat diacriloil no presenten cap dels requisits estructurals que han de presentar els derivats acridínics per tal d'interaccionar favorablement amb estructures quàdruplex. Aquests requisits s'han exposat anteriorment a l'apartat 1.3 del capítol 1, i es poden resumir com la presència d'una amina terciària i cíclica (preferiblement de 5 o 6 baules) separada per dos metilens del carbonil de l'amida unida a la proflavina. Queda clar que aquestes dues acridines no compleixen cap dels requisits, de manera que no ha estat cap sorpresa el fet que no presentin gens d'estabilització.

D'altra banda, els resultats negatius obtinguts amb les acridines **A24** i **A25** (fig. 2.12) sí han estat més sorprenents. La idea inicial d'obtenir l'acridina **A25** i assajar-ne les seves propietats sorgí del fet que tots els conjugats presenten un enllaç amida en la seva estructura. Així doncs, la nostra intenció era comparar els resultats obtinguts amb les acridines **A24** i **A25** per tal de poder extreure alguna conclusió respecte a com afecta a l'estabilització del quàdruplex la presència del grup amida enlloc del grup àcid en l'esquelet de la molècula. Malauradament però, cap de les dues molècules ha presentat gens d'estabilització.

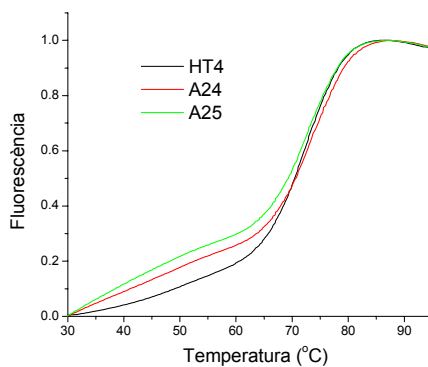


Figura 2.12 – Corbes de fusió d'HT4, sol i amb A24 i A25.

Referint-nos al derivat **A24**, es pot concloure que la presència de dos grups carboxílics no resulta gens favorable. Aquest fet sembla raonable, ja que aquests grups, a pH 7.4 es troben desprotonats i situats prop dels fosfats de l'esquelet del quàdruplex format per **HT4**, també carregats negativament. Així, la presència en el mateix entorn d'altres grups amb càrrega negativa no en fa gens favorable la interacció. És cert, però, que hi ha acridines que també contenen grups àcids i sí que produeixen una estabilització del quàdruplex format per **HT4**. L'anàlisi d'aquests derivats es farà més endavant.

El resultat obtingut amb **A25** és força més difícil d'interpretar, ja que aquest derivat no conté cap càrrega negativa. L'única conclusió que es pot extreure és que la presència de grups amida, enlloc d'àcids carboxílics en aquesta posició de la molècula no permet millorar la interacció del derivat acridínic amb el quàdruplex format per **HT4**.

Pel que fa a les acridines que sí presenten estabilització, cal comentar en primer lloc l'acridina **A7** (fig. 2.13), que s'ha utilitzat com a control positiu. Aquesta acridina havia estat ja descrita a la literatura com a estabilitzadora d'estructures quàdruplex de G, de manera que s'ha cregut convenient analitzar-la per dues raons: en primer lloc per tal de veure si el model d'experiment escollit per a realitzar l'estudi és vàlid per a l'avaluació dels nostres productes i, en segon lloc, per tal de tenir una referència amb la qual poder comparar els resultats obtinguts amb les altres acridines. Com s'observa a la taula 2.2, el derivat **A7** ha presentat una forta estabilització del quàdruplex, només comparable a la produïda per les acridines **A19** i **A23**. Aquest fet posa de manifest que el model dissenyat per a l'avaluació dels derivats acridínics és força adequat.

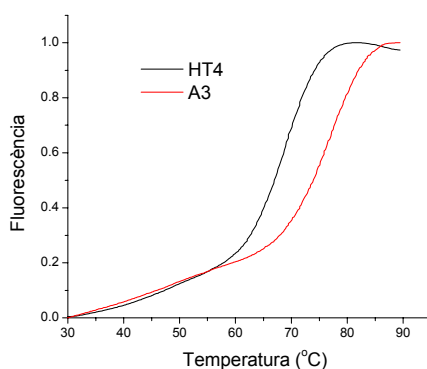


Figura 2.13 – Corbes de fusió d'**HT4**, sol i amb **A7**.

Les acridines restants, es poden dividir en tres grups. Un primer grup el formen les que contenen un grup acriloil en un dels braços i una amina terciària i cíclica a l'altre. Un segon, les acridines precursors immediates dels conjugats, que contenen un aminoàcid en un extrem i una amina terciària i cíclica en l'altre, i finalment ens trobem amb un tercer grup format exclusivament per l'acridina **A19** que és l'única que conté un grup hidroxil.

Per les acridines del primer grup (**A17** i **A18**), sembla força clar que per a l'estabilització del quàdruplex és més favorable la presència d'un anell de pirrolidina que la d'un de piperidina. Cal remarcar que ambdues acridines contenen només un braç estabilitzador, ja que com s'ha observat amb l'acridina **A16** la part acriloil no estabilitza gens el quàdruplex format per **HT4**.

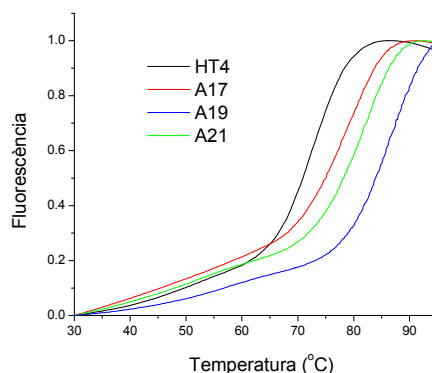


Figura 2.14 – Corbes de fusió d'**HT4**, sol i amb **A17**, **A19** i **A21**.

Dins del segon grup (**A20-23**) els resultats són força més complexos d'interpretar. D'entrada ressalta el fet que les acridines que presenten més estabilització són les dues que contenen els dos anells de la mateixa mida (**A21** i **A23**). Aquest fet podria tenir a veure amb la simetria global del quàdruplex format per **HT4**. D'entre aquestes dues, sorprèn el fet que la que ha presentat un millor resultat és la que conté els dos anells de 6 baules (piperidina i àcid isonipecòtic). En principi, tot sembla indicar que el braç que conté l'àcid carboxílic no contribueix a l'estabilització del quàdruplex. Llavors, si el grau d'estabilització ve donat per l'altre braç, caldria esperar que l'ordre fos l'invers, ja que com s'ha observat anteriorment la presència d'un anell de pirrolidina sembla estabilitzar més que la d'un de piperidina. En aquest sentit, no obstant, convé remarcar que en cap cas s'ha analitzat l'efecte que produeix la presència d'un residu d'àcid isonipecòtic.

Analitzant les acridines que contenen anells de mida diferent, s'observa que la que presenta més estabilització és la que conté un anell de pirrolidina i un residu d'àcid isonipecòtic (**A21**). Aquest resultat sembla força lògic, ja que anteriorment s'havia vist que l'anell de pirrolidina és més favorable que el de piperidina.

Finalment, l'acridina **A19** s'ha erigit com l'acridina que més estabilitza el quàdruplex format per **HT4**. Un dels braços és idèntic als d'**A7**, per tant aquest ja s'ha vist que interacciona molt favorablement. Això no obstant, l'altre braç és de característiques diferents als derivats acridínics descrits a la literatura i als altres obtinguts en aquest treball, de manera que no hi ha antecedents per comparar. La presència de l'amina secundària i del grup hidroxil primari és la responsable d'aquesta forta estabilització. En aquest sentit, el grup hidroxil podria estar involucrat en la formació d'algun enllaç d'hidrogen.

2.2.2.3 Experiments a diferents concentracions d'acridines

Amb les acridines que han mostrat una certa estabilització a 10 μM s'ha decidit repetir els experiments, però a concentracions més baixes (1, 2 i 5 μM). Els resultats obtinguts es mostren a la següent taula:

Acridina	ΔT_m HT4 ($T_m = 71.5^\circ\text{C}$)			
	1 μM	2 μM	5 μM	10 μM
A17	0.0	0.7	2.5	7.5
A18	0.0	0.5	3.0	14.0
A19	0.7	1.5	5.0	16.0
A20	0.0	0.0	2.0	6.0
A21	0.5	2.0	3.0	10.0
A22	0.0	0.5	2.0	8.0
A23	0.0	1.0	2.0	13.5

Taula 2.2 – Increments en la T_m d'HT4 ($^\circ\text{C}$) produïts per les diferents acridines a diferents concentracions.

Bàsicament, i com era d'esperar, s'ha observat per a totes elles un increment en l'estabilització de l'estructura d'HT4 a mesura que s'ha anat augmentant la concentració, sobretot al passar de 5 a 10 μM . En aquest sentit cal destacar altre cop l'acridina **A19** que continua sent la que presenta valors millors d'estabilització per a gairebé cada concentració avaluada (fig. 2.15). De fet, juntament amb l'**A21**, és l'única que mostra una certa estabilització a concentració 1 μM .

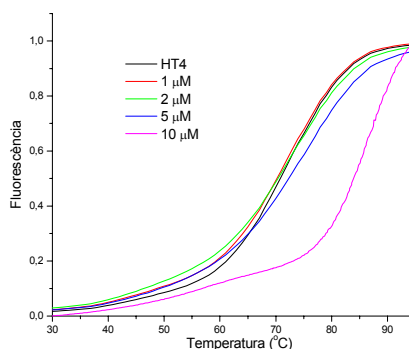


Figura 2.15 – Corbes de fusió d'HT4, sol i amb A19 a diferents concentracions d'acridina.

En general, els resultats obtinguts amb les acridines mostren que la majoria d'elles tenen una certa capacitat d'estabilització d'estructures quàdruplex de G. Això no obstant, sovint les diferències de comportament observades entre algunes d'elles són molt petites i responen a factors poc clars. En certa mesura, doncs, aquestes diferències podrien posar de manifest la presència d'errors experimentals. Un exemple el trobem en les inversions observades en el grau d'estabilització de les diferents acridines en funció de la concentració (taula 2.2).

Així, només ha estat possible extreure algunes conclusions generals sobre els trets estructurals que condueixen a una millor estabilització d'estructures quàdruplex. Qualsevol anàlisi més profunda requeriria la realització de més estudis.

2.2.3 Avaluació dels conjugats

Un cop avaluada la capacitat d'estabilitzar quàdruplex de G de les acridines, s'han avaluat els diferents conjugats. A la figura següent es mostren les estructures de tots els conjugats analitzats.

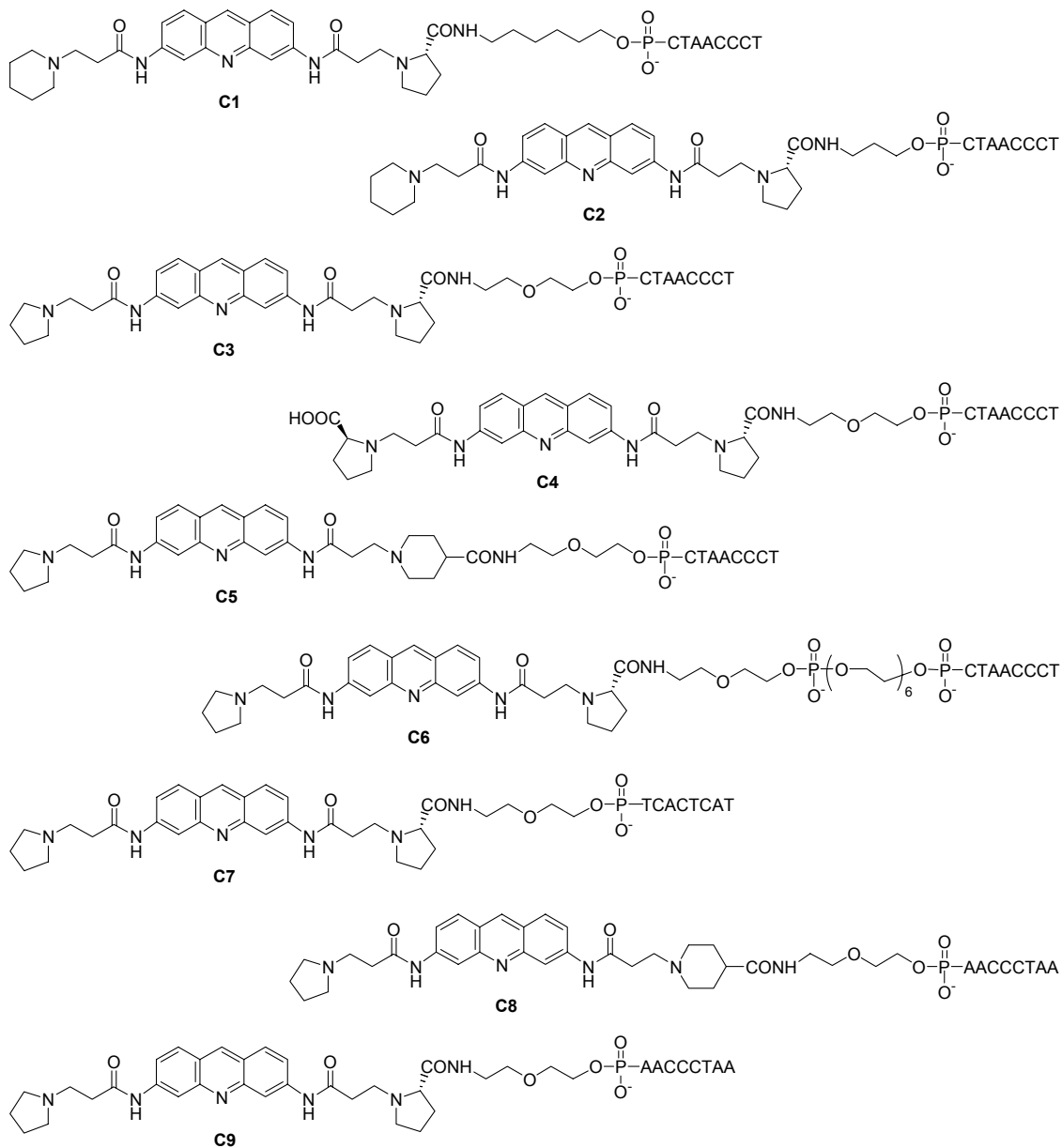


Figura 2.16 – Estructures dels conjugats avaluats.

2.2.3.1 Disseny dels experiments amb conjugats

Els experiments amb els conjugats han estat més difícils de dissenyar, ja que entre el conjugat i l'oligonucleòtid formador de quàdruplex poden tenir lloc dos tipus d'interaccions. Per una banda, els conjugats presenten la part aromàtica que

interacciona amb els quàdruplex de G, però per l'altra també presenten la part oligonucleotídica complementària al DNA telomèric, amb qui, per tant, pot formar estructures dúplex. De fet, interessa que formi estructures dúplex, ja que això és el que a la llarga ha de dotar de selectivitat als conjugats en comparació amb les acridines per tal d'esdevenir potencials fàrmacs anticancerígens. Així doncs, sembla clar que **HT4** no és un model adequat per tal d'avaluar la capacitat d'estabilització dels conjugats, ja que en cas que interaccionin formant un dúplex, llavors aquest no es pot estructurar en forma de quàdruplex, i viceversa. Ha estat necessari, doncs, dissenyar nous oligonucleòtids formadors de quàdruplex. Aquests es mostren a la figura 2.17.



Figura 2.17 – Seqüències dels oligonucleòtids emprats en l'avaluació dels conjugats: **HT5, HT6 i HTmod.**

Per una banda s'ha dissenyat un oligonucleòtid formador de quàdruplex que conté 4.5 repeticions telomèriques (**HT5**). S'ha de tenir en ment que per formar-se un quàdruplex intramolecular només calen 3.5 repeticions, de manera que un oligonucleòtid d'aquestes característiques es pot estructurar en forma de quàdruplex i deixar alhora 6 nucleòtids lliures per tal que la part nucleotídica del conjugat s'hi hibridi formant un dúplex (fig. 2.18). De totes maneres aquest model presenta limitacions com és el fet de comptar, un cop estructurat en forma de quàdruplex, amb només 6 bases complementàries a la part oligonucleotídica dels conjugats, la qual conté 8 nucleòtids. És a dir, només és possible que tingui lloc una hibridació parcial. És per això que s'ha pensat en utilitzar també un altre oligonucleòtid que contingui 5.5 repeticions telomèriques (**HT6**). Amb aquest ja pot tenir lloc la hibridació de tota la part nucleotídica del conjugat. Això no obstant, el problema que presenten tant **HT5** com sobretot **HT6** és el fet de poder presentar diferents conformacions en solució, de manera que el que s'estarà analitzant no respon al model ideal d'un oligonucleòtid formador de quàdruplex que forma una única estructura ben definida. Ans el contrari, el que s'estarà analitzant serà probablement una barreja d'estructures molt similars entre elles, algunes de les quals permeten la hibridació amb el conjugat, mentre que d'altres no. Per exemple, en el cas d'**HT6**, mentre que en la conformació **HT6a** és possible la formació d'un dúplex de 8 parells de bases, en la **HT6b** només és possible una hibridació parcial de 5 parells, i en la conformació **HT6c**, si bé és possible la formació de dúplex, llavors l'acridina quedaria en molts casos força lluny del quàdruplex.

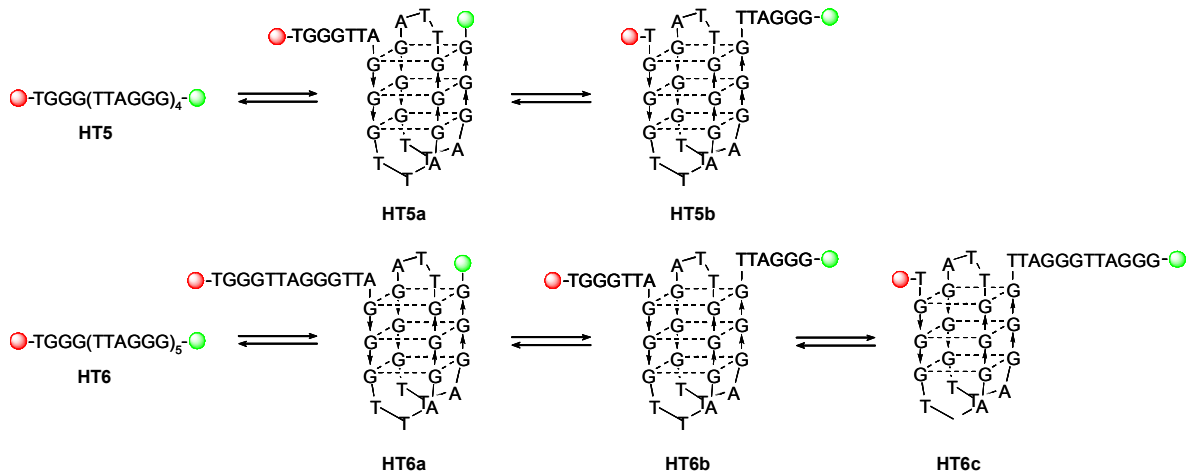


Figura 2.18 – Conformacions que poden adoptar HT5 i HT6.

Finalment, s'ha cregut convenient dissenyar un tercer oligonucleòtid: **HTmod** (fig. 2.19). Aquest presenta dues particularitats en comparació amb **HT5** i **HT6**. Per una banda conté el *quencher* per entremig de la seqüència nucleotídica, situat a 3.5 repeticions telomèriques de distància del fluoròfor, de forma similar al que passava amb **HT4**. En aquest cas però, **HTmod** conté més bases en el seu extrem 5' per tal de permetre la formació de dúplex amb els conjugats. Per altra banda, en aquesta zona, no tota la seqüència és homòloga a la del telòmer humà, sinó que s'han substituït dues G per dues T. Amb aquesta modificació el que s'ha intentat és afavorir una de les possibles conformacions per sobre les altres, de manera que la formació del quàdruplex tingui lloc exclusivament, o almenys de forma majoritària, a l'extrem 3' de l'oligonucleòtid, que és on estan situats ambdós cromòfors. En resum, el que s'ha pretès amb aquest disseny és intentar evitar la barreja de conformacions que poden presentar tant **HT5** com **HT6**. A més a més, en el cas que hi hagués més d'una conformació, la que es mostra a la figura és la que més es veuria reflectida en els resultats dels experiments de FRET, ja que és la que té els cromòfors més propers entre ells.

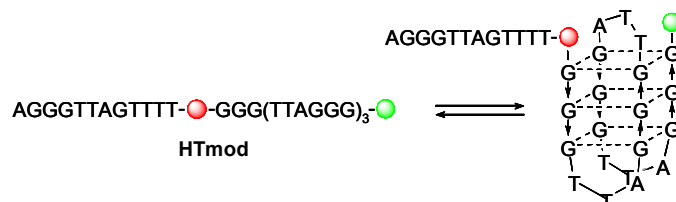


Figura 2.19 – Quàdruplex format per HTmod.

2.2.3.2 Estudis amb HT5

En primer lloc s'han realitzat els assaigs utilitzant **HT5** com a oligonucleòtid formador de quàdruplex. Els conjugats s'han avaluat a una concentració de 10 μM i els increments observats en la T_m de l'oligonucleòtid es mostren a la taula següent:

Conjugat	ΔT_m HT5 ($T_m = 62.5^\circ\text{C}$)	Conjugat	ΔT_m HT5 ($T_m = 62.5^\circ\text{C}$)
C1	4.3	C6	4.7
C2	0.5	C7	3.2
C3	3.8	C8	2.6
C4	0.3	C9	2.7
C5	5.1		

Taula 2.3 – Increments en la T_m d'**HT5** ($^\circ\text{C}$) produïts pels diferents conjugats.

Cal destacar, en primera instància, que la majoria dels conjugats produeixen una certa estabilització d'**HT5**, demostrant que són capaços d'estabilitzar quàdruplex de G formats per la seqüència telomèrica humana. Comparant els resultats amb els de les acridines soles, no obstant, queda palès que aquestes últimes presenten increments majors. Així doncs, la presència de la part oligonucleotídica juga un paper negatiu en l'estabilització dels quàdruplex.

Analitzant les dades més en detall, s'observa que hi ha dos conjugats que no produeixen cap mena d'estabilització. Aquest són els conjugats **C4** i **C2**. El primer conté l'acridina **A24** (dos residus de prolina), la qual ja s'ha vist anteriorment que no produïa cap mena d'estabilització, degut a la presència del grup carboxílic. Com que també s'ha arribat a la conclusió que la presència del grup amida a través del qual s'uneix a l'espaiador tampoc afavoreix la interacció amb el quàdruplex, aquest resultat és del tot coherent amb el que s'ha vingut observant fins el moment. Per altra banda, resulta en principi més sorprenent el resultat obtingut pel conjugat **C2**, que tampoc produeix gens d'estabilització. Aquest conjugat conté la mateixa acridina i la mateixa seqüència nucleotídica que el conjugat **C1**, amb el qual només difereix pel que respecte a l'espaiador. En el cas de **C1**, l'espaiador conté 6 àtoms de carboni (**LN6**) i en el cas de **C2** només 3 (**LN3**). Com que **C1** sí que estabilitza el quàdruplex format per **HT5**, sembla clar que l'espaiador en aquest cas juga un paper molt important. La missió de l'espaiador és allunyar suficientment la cadena oligonucleotídica del quàdruplex, de manera que aquesta no interfereixi en la interacció entre el quàdruplex i l'acridina. Així doncs, la conclusió que s'extreu d'aquest resultat és que l'espaiador **LN3** és massa curt i impedeix una bona interacció de la part acridínica del conjugat amb **HT5**.

Referent als altres conjugats, cal fer una comparació entre **C3** i **C6** per una banda i **C3**, **C7** i **C9** per l'altra, tot i les petites diferències en els increments de T_m que hi ha entre ells. En el primer cas, ambdós conjugats difereixen només en l'espaiador i presenta un increment de T_m superior el que el té més llarg. Aquest fet es podria

relacionar amb l'observació feta anteriorment, de manera que sembla que espaiadors llargs funcionen millor que espaiadors curts. Això vol dir que és important que les dues parts del conjugat que interaccionen amb **HT5** (aromàtica i nucleotídica) es trobin suficientment separades per poder interaccionar cadascuna d'elles de la millor forma possible. Per la seva banda **C3**, **C7** i **C9** difereixen només amb la seqüència nucleotídica. En aquest cas els resultats són força difícils d'interpretar, però sí que s'observa clarament que la seqüència que condueix a una pitjor estabilització és AACCTAA. Aquesta observació es corrobora comparant també els increments de T_m produïts pels conjugats **C5** i **C8**, on el primer mostra una estabilització força superior que el darrer, essent l'única diferència entre ambdós la seqüència nucleotídica.

Finalment, i un cop analitzats els increments de T_m d'**HT5** observats, cal fixar-se en el perfil de les corbes de fusió obtingudes (fig. 2.20).

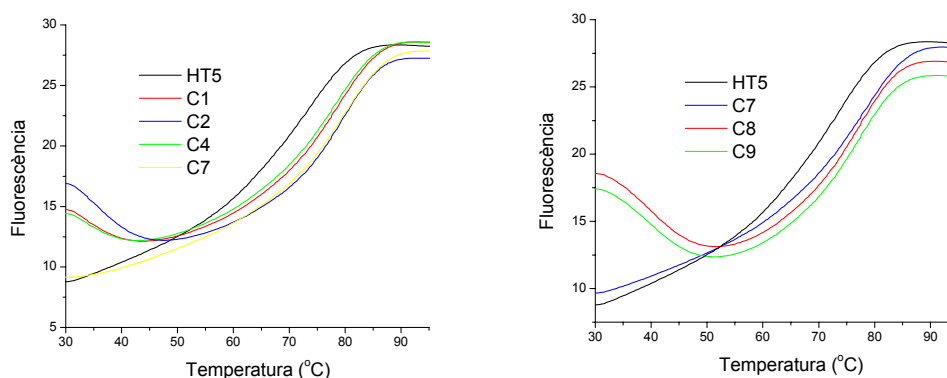


Figura 2.20 – Corbes de fusió d'**HT5**, sol i amb alguns dels conjugats.

Com es pot observar en la figura, en moltes de les corbes, a part de la transició esperada de fusió del quàdruplex al voltant del 60-70°C, n'apareix una altra de perfil invers a temperatures més baixes (al voltant dels 35°C). Aquest increment de la fluorescència que té lloc a baixa temperatura és degut a la formació de dúplex entre l'oligonucleòtid dels conjugats i la part d'**HT5** que no forma el quàdruplex. Anteriorment ja s'ha comentat que **HT5**, en una de les seves possibles conformacions (**HT5a**), permet la formació d'aquest tipus de dúplex. Un cop format el dúplex, la part oligonucleotídica del conjugat es troba molt propera al *quencher*, de manera que té lloc un apantallament que dificulta que hi hagi una transferència d'energia del fluoròfor cap al *quencher* (fig. 2.21A). Així, aquesta transferència no pot tenir lloc ara amb la mateixa eficiència que quan el dúplex no es forma, o es troba fos. Aquest fenomen, doncs, es manifesta en un increment de la fluorescència emesa pel fluoròfor.

En les gràfiques s'observa que a part d'**HT5**, hi ha dos conjugats que no presenten aquest increment de la fluorescència a baixes temperatures. Aquests dos són **C6**, que conté l'espaiador més llarg de tots, i **C7**, que conté la seqüència nucleotídica aleatòria, i per tant no complementària a **HT5** (fig. 2.21B). És evident que **C7** no pot formar dúplex, per tant, és impossible que presenti aquesta segona

transició. Per altra banda, sembla que **C6**, al tenir l'espaiador tant llarg (**LN5 + LO18**), li és pràcticament impossible formar aquest dúplex, ja que l'espaiador situa la part oligonucleotídica del conjugat excessivament lluny de l'extrem 5' d'**HT5**.

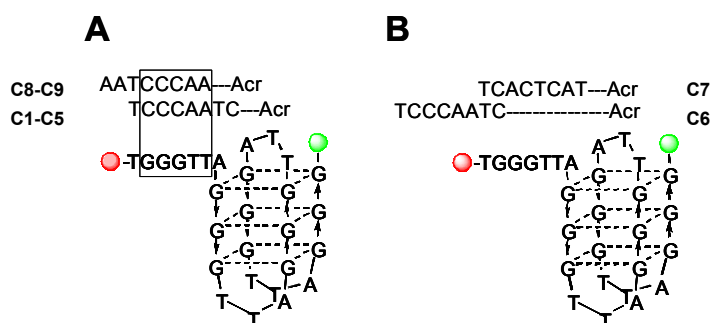


Figura 2.21 – Dúplex que poden formar els conjugats **C1-5** i **C8-9** amb **HT5** (A). Els conjugats **C6-7** no poden formar cap dúplex amb **HT5** (B).

2.2.3.3 Estudis amb HT6

Com ja s'ha comentat, l'avantatge d'utilitzar **HT6** com a oligonucleòtid formador de quàdruplex per tal d'avaluar els conjugats és que el dúplex que es pot formar entre el conjugat i **HT6** pot ser més llarg, i per tant pot tenir lloc una hibridació total de la part oligonucleotídica del conjugat. Tanmateix **HT6** presenta un desavantatge respecte **HT5**, que és el fet de poder adoptar més conformacions. Això fa que els resultats obtinguts corresponguin a un promig de les fusions de cadascuna d'elles.

S'han realitzat, en primer lloc assaigs a concentració 10 μM de cada conjugat, i posteriorment s'han avaluat els conjugats que han presentat uns millors resultats d'estabilització a concentracions més baixes. Els valors d'increment de T_m obtinguts es mostren a la següent taula:

Conjugat	ΔT_m HT6 ($T_m = 62.5^\circ\text{C}$)		
	2 μM	5 μM	10 μM
C1	1.0	1.0	3.0
C2	-	-	0.5
C3	-	-	1.0
C4	-	-	0.5
C5	0.5	2.0	4.0
C6	0.0	1.5	4.5
C7	0.0	1.0	1.5
C8	0.0	0.0	2.0
C9	-	-	0.5

Taula 2.4 – Incrementos en la T_m d'**HT6** produïts pels diferents conjugats.

En general l'estabilització d'**HT6** que produeixen els conjugats són menors que en **HT5**, per bé que la majoria dels conjugats a concentració 10 μM continuen mostrant

un increment de la T_m del quàdruplex. Els conjugats **C4** i **C2** continuen sense establir pràcticament gens, mentre que els conjugats que donen millors resultats continuen essent **C1**, **C5** i **C6**. Igualment, si es fan les comparacions realitzades anteriorment amb els valors obtinguts amb **HT5**, s'observa en tots els casos la mateixa tendència. La seqüència oligonucleotídica que produeix una menor estabilització continua essent AACCTAA, mentre que la comparació entre conjugats on només varia l'espaiador, mostra clarament que els espaiadors més llargs condueixen a majors estabilitzacions del quàdruplex.

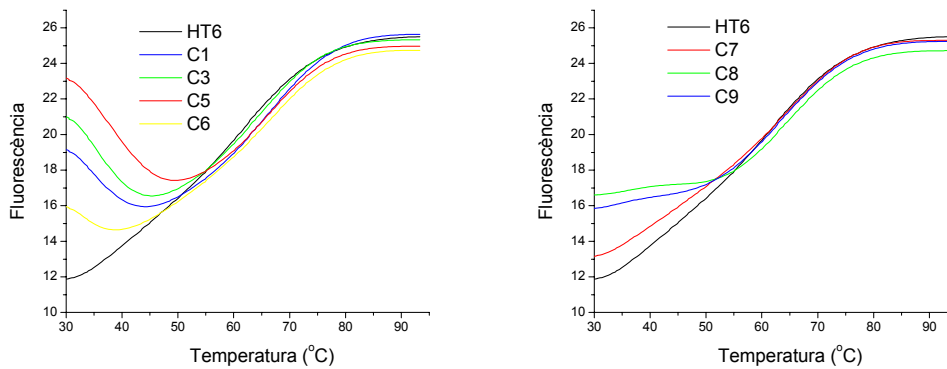


Figura 2.22 – Corbes de fusió d'**HT6**, sol i amb els diferents conjugats.

En les corbes de fusió, també destaca la formació de dúplex (fig. 2.22), tal i com s'havia observat ja en els experiments realitzats amb **HT5**. La major diferència respecte **HT5** és que en aquest cas el conjugat **C6** forma dúplex, cosa que abans no passava. Aquest fet és degut a la major llargada de la seqüència d'**HT6** respecte a **HT5**, de manera que encara que l'espaiador sigui molt llarg, pot tenir lloc l'hibridació, almenys en una de les conformacions (fig. 2.23B).

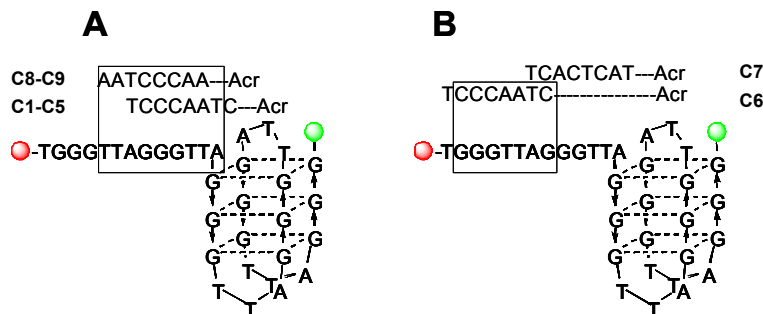


Figura 2.23 – Dúplex que poden formar els conjugats **C1-5** i **C8-9** amb **HT5**
(A). **C6** també pot formar dúplex amb **HT6**, mentre que **C7** no (B).

2.2.3.4 Estudis amb HTmod

Finalment, s'han realitzat els experiments emprant **HTmod** com a oligonucleòtid formador de quàdruplex. En aquest cas, el que s'ha pretès és intentar estudiar una sola conformació, que, a més a més, permet la formació de dúplex. Els increments observats en la T_m d'**HTmod** es mostren a la següent taula:

Conjugat	ΔT_m HTmod ($T_m = 64.0^\circ\text{C}$)		
	2 μM	5 μM	10 μM
C1	2.0	3.5	4.0
C2	-	-	0.5
C3	1.5	3.0	3.5
C4	-	-	2.0
C5	2.0	3.0	6.5
C6	2.0	3.0	4.5
C7	1.5	2.5	4.0
C8	1.5	2.5	5.5
C9	0	1.5	2.0

Taula 2.5 – Increments en la T_m d'**HTmod** ($^\circ\text{C}$) produïts pels diferents conjugats.

En aquest cas els valors d' ΔT_m obtinguts són en general superiors als obtinguts prèviament amb **HT5** o amb **HT6**. Això es creu que pot ser degut al fet que **HTmod** presenta una sola conformació de forma molt majoritària. En aquest cas, l'ordre relatiu dels conjugats en funció de l'estabilització que provoquen ha variat sensiblement, situant-se **C8** entre els tres millors. Això no obstant, repetint les comparacions realitzades anteriorment entre els conjugats que difereixen en l'espaiador o en la seqüència oligonucleotídica, s'observa la mateixa tendència apuntada en els altres estudis. Així, sembla clar que espaiadors llargs afavoreixen l'estabilització, i que la seqüència CTAACCCT és la que funciona millor.

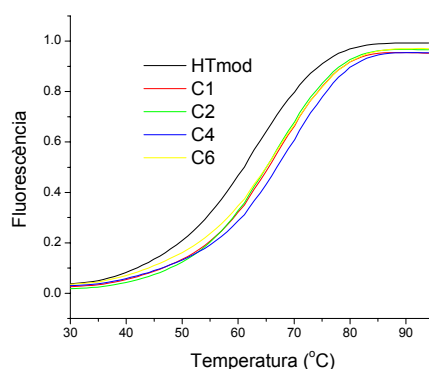


Figura 2.24 – Corbes de fusió d'**HTmod**, sol i amb alguns dels conjugats.

En aquest cas, en les gràfiques no s'observa la transició que indicava la presència del dúplex, però això no significa que aquest no es formi. El disseny d'**HTmod** ha estat pensat perquè el fluoròfor i el quencher estiguin situats propers als extrems del quàdruplex, de manera que la formació del dúplex en l'extrem 5' d'**HTmod** no hauria d'afectar al procés de transferència d'energia entre ambdós cromòfors (fig. 2.25).

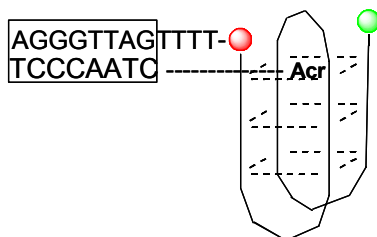


Figura 2.25 – La formació de dúplex entre els conjugats **C1-5** i **HTmod** no produeix apantallament.

En aquest punt del treball caldria fer una anàlisi global de tots els resultats obtinguts fins el moment per tal d'extreure'n conclusions. Aquest, però, s'ha reservat per al final del capítol, per tal d'analitzar conjuntament els resultats obtinguts per FRET amb els obtinguts mitjançant TRAP.

2.3 Estudis d'inhibició de la telomerasa mitjançant l'experiment TRAP

Un cop avaluada la capacitat, tant de les acridines com dels conjugats, d'estabilitzar estructures quàdruplex de G formades per la seqüència telomèrica humana, s'ha cregut convenient avaluar-ne també la seva capacitat d'inhibició de la telomerasa. Amb aquest propòsit s'han realitzat experiments basats en el *Telomeric Repeat Amplification Protocol* (TRAP).

2.3.1 L'experiment TRAP

L'acrònim TRAP dona nom al mètode descrit per Kim *et al.*¹⁹ per a la determinació d'activitat telomerasa tant en teixits com en extractes cel·lulars. L'aparició del TRAP va significar un gran avanç no només en la detecció de l'activitat telomerasa en concret, sinó també en estudis relacionats amb el càncer en general i el paper que en juga aquest enzim en el desenvolupament de la malaltia.

El TRAP es basa en l'amplificació, mitjançant una reacció en cadena de la polimerasa (PCR), dels productes resultants de l'activitat de la telomerasa, i ha aportat grans millores en sensibilitat, velocitat i eficiència respecte als mètodes utilitzats anteriorment per a la determinació de l'activitat telomerasa^{20,21}. Amb el temps s'hi han anat introduint modificacions, i l'assaig actualment utilitzat de forma habitual en biologia molecular és una versió modificada del TRAP inicial. Aquest mateix tipus d'experiment també s'utilitza per tal de determinar les propietats de diverses molècules d'inhibir la telomerasa.

2.3.1.1 Fonament de l'experiment

L'assaig TRAP consta bàsicament de dues etapes (fig. 2.26):

- La telomerasa afegeix repeticions telomèriques a l'extrem 3' d'un oligonucleòtid sintètic (**TS**: AATCCGTCGAGCAGAGTT).
- Els productes resultants d'aquesta elongació són amplificats a través d'una PCR, utilitzant el mateix **TS** i un altre oligonucleòtid sintètic (**CX**: CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA) com a iniciadors.

Posteriorment, els productes finals de la PCR són visualitzats mitjançant una electroforesi no desnaturant en gel de poliacrilamida, la qual permet analitzar els resultats de l'assaig i diferenciar les mostres que posseeixen activitat telomerasa de les que no. L'assaig es realitza introduint nucleòtids trifosfat marcats radioactivament, per permetre la visualització del resultat de l'electroforesi.

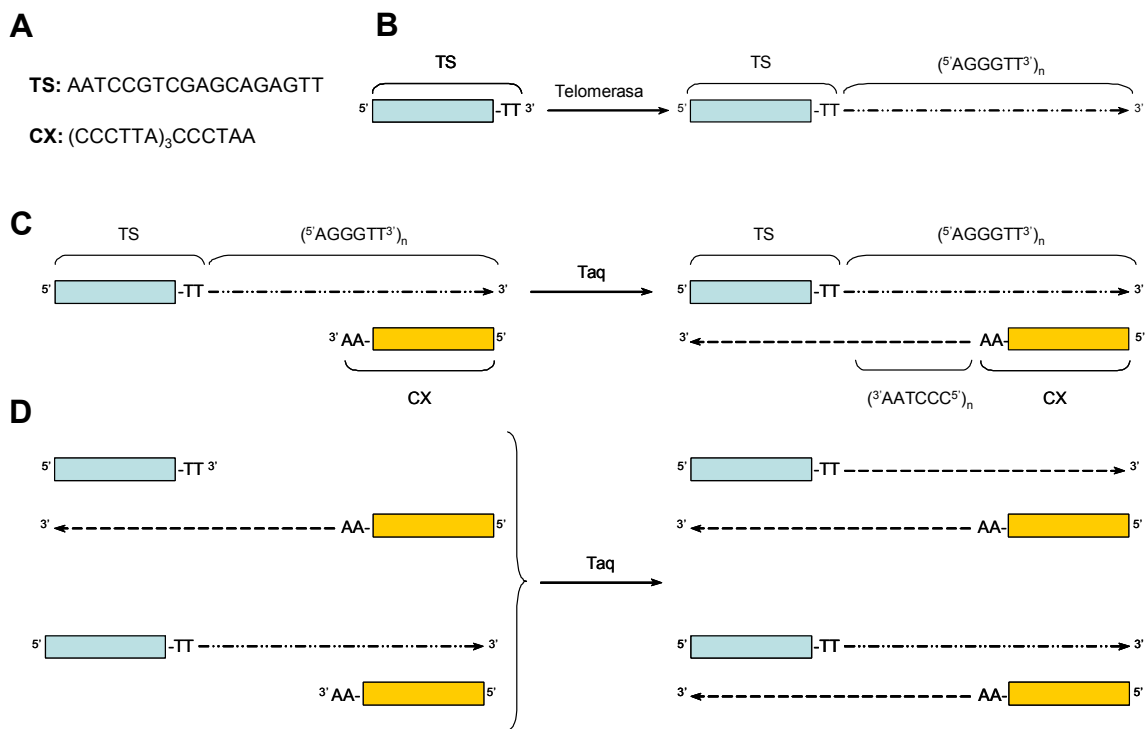


Figura 2.26 – Seqüències dels oligonucleòtids **TS** i **CX** (A). En el TRAP primer té lloc l'elongació de **TS** per part de la telomerasa (B) i llavors l'amplificació dels oligonucleòtids resultants mitjançant una PCR (C i D).

El mecanisme d'acció a través del qual la telomerasa afegeix repeticions telomèriques (apartat B.2.1 de la Introducció) es pot dividir en quatre etapes:

- Formació del complex enzimàtic (format per la subunitat catalítica, la ribonuclèica i varies proteïnes associades).
- Reconeixement (l'RNA de la telomerasa s'hibrida amb la cadena de DNA que actua com a substrat, **TS**).
- Elongació (la subunitat catalítica de l'enzim addiciona fins a 6 nucleòtids a l'extrem 3' del substrat, utilitzant l'RNA com a motlle).
- Translocació (desplaçament del fragment que s'acaba de sintetitzar respecte a l'RNA de la telomerasa per tal que aquest quedi lliure i pugui continuar actuant de motlle durant successives rondes d'elongació-translocació).

El substrat natural de la telomerasa humana és l'extrem 3' del telòmer humà, però en l'assaig TRAP, el que actua com a substrat és l'oligonucleòtid **TS** (*Telomerase Substrate*). Aquest és un 18-mer de seqüència no telomèrica, però que és reconegut per l'enzim (fig. 2.26A)²².

En el TRAP, en primera instància té lloc l'elongació de **TS** per part de la telomerasa present a l'extracte o al teixit (fig. 2.26B), que afegeix repeticions telomèriques al seu extrem 3'. L'enzim afegeix nucleòtids en series de 6, de manera

que després de cada addició de 6 (una repetició telomèrica), té lloc l'etapa de translocació per tal de poder continuar addicionant més repeticions telomèriques. El resultat de tot aquest procés és la generació, després de successives etapes d'addició-translocació, d'un oligonucleòtid de longitud **TS** + 6n. La suma de tots aquests processos que tenen lloc a nivell molecular durant un assaig TRAP genera una barreja de cadenes nucleotídiques de diferents longituds: **TS**, **TS** + 6, **TS** + 12, **TS** + 18, ...

La segona etapa del TRAP consisteix en l'amplificació d'aquestes cadenes mitjançant una reacció de PCR utilitzant la Taq polimerasa com a enzim i **TS** i **CX** com a iniciadors (fig. 2.26C-D). Aquest últim, **CX**, és un 24-mer de seqüència pràcticament complementària a la telomèrica (fig. 2.26A).

Finalitzada la PCR, la barreja resultant s'analitza per electroforesi no-desnaturalitzant en gel de poliacrilamida, observant-se tota una sèrie de bandes corresponents als dúplex formats pels productes **TS** + 6n amb els seus oligonucleòtids complementaris.

En el cas que la mostra analitzada no contingui telomerasa, l'elongació inicial de **TS** no té lloc, de manera que la PCR no comporta l'amplificació de cap producte. Cal pensar que perquè aquesta tingui lloc hi ha d'haver un iniciador i un motlle. En aquest cas hi ha dos oligonucleòtids (**TS** i **CX**) que no són complementaris entre ells, per tant cap pot actuar com a motlle de l'altre. El resultat final és la no amplificació d'aquests i, per tant, l'obtenció d'un gel d'electroforesi on no s'observa cap banda.

2.3.1.2 Millores introduïdes

L'experiment TRAP, descrit per primer cop l'any 1994, inicialment es dissenyà per dur-se a terme en un eppendorf, tal i com es mostra a la figura 2.27. La quantitat requerida de **CX** es dipositava liofilitzada al fons de l'eppendorf i separada per una barrera de cera de la resta de components (**TS**, també, Taq polimerasa, nucleòtids trifosfat i l'extracte cel·lular del qual es volia detectar l'activitat telomerasa). Es deixava reaccionar 10 minuts a 23°C per tal que la telomerasa actués i llavors s'introduïa l'eppendorf en el termociclador. Allà, a l'augmentar la temperatura la cera es fonia i s'alliberava **CX**, de manera que podia començar la PCR.

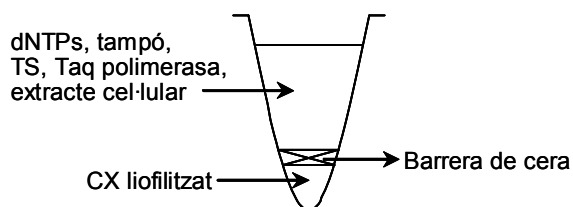


Figura 2.27 – Disseny dels primers TRAPS.

Al llarg dels anys, aquest experiment ha anat incorporant algunes modificacions per tal de millorar-ne els punts més dèbils, i actualment es realitzen el que s'anomenen assaigs TRAP modificats.

Una primera millora fou la introducció d'un control intern de la PCR²³. Dos dels problemes que presentava inicialment el TRAP eren la no-linealitat de l'assaig, que feia impossible anàlisis quantitatives fiables, i l'aparició de falsos negatius, deguda a la presència, sovint, d'inhibidors de la Taq polimerasa en els teixits analitzats. La presència en la mescla de reacció d'un oligonucleòtid que actua com a control intern de la PCR ha permès solucionar ambdós problemes. Per una banda, permet dur a terme una correcció en l'eficiència de la PCR per a cada assaig, cosa que permet una millor quantificació, i per l'altra, permet detectar clarament els falsos negatius deguts a una inhibició de la Taq polimerasa. L'oligonucleòtid més usat amb aquesta finalitat s'anomena **TSNT**²⁴ i és un 36-mer que participa en la PCR de forma semi-competitiva amb els productes resultants de l'elongació de **TS** (fig. 2.28). **TSNT** està format per la seqüència **TS** en el seu extrem 5' i 18 nucleòtids més. Amb la incorporació de **TSNT** en el TRAP, també s'hi incorpora l'iniciador **NT**, complementari als 18 nucleòtids de l'extrem 3' de **TSNT**. Així doncs, **TSNT** no és substrat de la telomerasa, però és amplificat per la Taq polimerasa utilitzant **TS** i **NT** com a iniciadors.



Figura 2.28 – Seqüències de **TS**, **TSNT** i **NT**. Com es pot observar, **TSNT** està format per la seqüència **TS** en el seu extrem 5' i per la seqüència complementària de **NT** en el seu extrem 3'. D'aquesta manera **TSNT** és amplificat gràcies a ambdós iniciadors (**TS** i **NT**).

Una altra millora molt important fou la introducció de l'iniciador **CX-ext**²⁵ (**CX** amb tres nucleòtids addicionals a l'extrem 5': GTG-**CX**) en l'etapa d'amplificació per PCR enloc de **CX**. Aquesta modificació ha permès evitar l'aparició de molts falsos positius. Durant l'etapa d'amplificació, podia tenir lloc la formació del que s'anomena dímer d'iniciadors **TS+CX** com a conseqüència de la formació de dos parells AT entre ambdós iniciadors (fig. 2.29A). A partir d'aquí, en els següents cicles de la PCR podia tenir lloc una hibridació esglaonada de **CX** amb una de les dues cadenes del dímer d'iniciadors (fig. 2.29B), cosa que provocava l'amplificació de tot un seguit de seqüències de **TS** + 6n que no eren resultat de l'acció de la telomerasa. En l'anàlisi per electroforesi, aquest tipus d'artefactes apareixien com a falsos positius, ja que visualment s'observava tota la sèrie de bandes característiques dels assaigs positius. L'oligonucleòtid **CX-ext**, conté 3 nucleòtids addicionals en el seu extrem 5' que, tot i no

evitar la formació del dímer d'iniciadors, sí evita l'aparició de falsos positius a causa de successives hibridacions esglaonades de **CX-ext** amb una de les cadenes del dímer d'iniciadors. Ara, en la formació del dímer (fig. 2.29C), l'elongació de la cadena **TS** acaba amb un trinucleòtid "no telomèric" a l'extrem 3'. D'aquesta manera, encara que tingui lloc una hibridació esglaonada, la Taq polimerasa no reconeix el trinucleòtid CAC, ja que no es trobarà hibridat, i per tant no actua (fig. 2.29D).

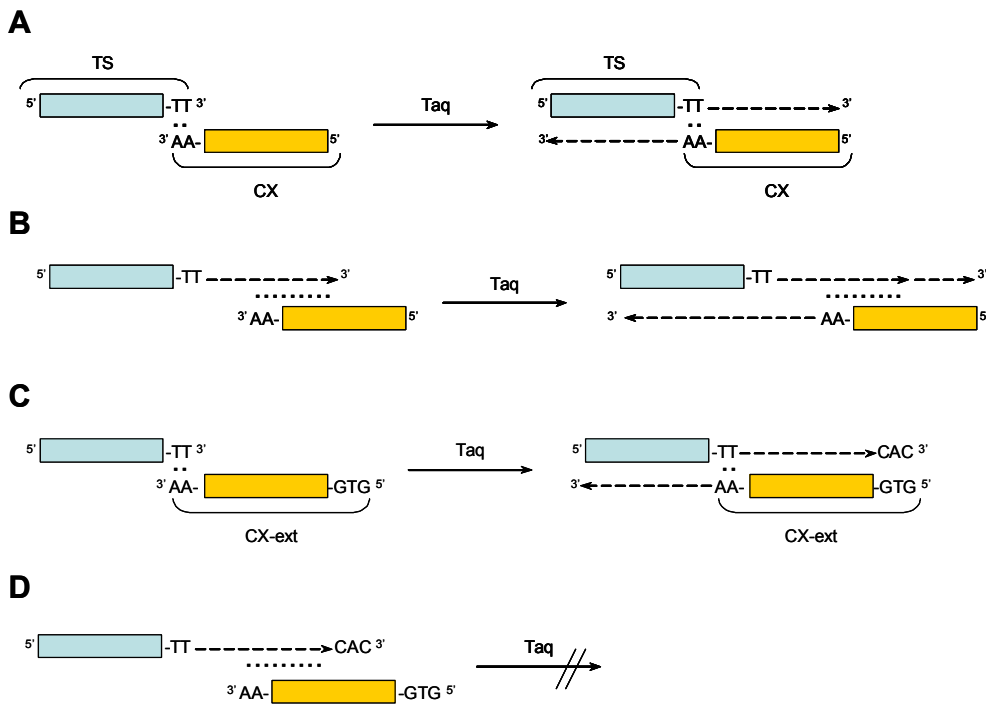


Figura 2.29 – Formació del dímer d'iniciadors entre **TS** i **CX** (A), a partir del qual pot tenir lloc una hibridació esglaonada de **CX** que dona lloc a falsos positius. La formació del dímer d'iniciadors entre **TS** i **CX-ext** (C), minimitza l'aparició de falsos positius, ja que en cas d'hibridació esglaonada, la PCR no té lloc (D).

Finalment, l'eliminació de la barrera de cera ha estat un factor molt important per tal de minimitzar el temps emprat en la realització de l'assaig²⁶. La preparació de la barrera de cera, amb l'iniciador liofilitzat al fons de l'ependorf, esdevenia força lenta, laboriosa i complicada de realitzar correctament; a més a més, podia donar lloc a contaminacions. Actualment, doncs, realitzant tot l'assaig en un mateix medi s'ha aconseguit una important reducció en el temps i en la laboriositat de la preparació dels assaigs. Això ha permès una posterior optimització i automatització dels TRAPs que ha donat com a resultat l'aparició de kits per part de diverses cases comercials. D'aquesta manera, la detecció d'activitat telomerasa en teixits o l'avaluació de les propietats inhibidores de certes molècules es pot realitzar de forma força més senzilla i ràpida.

Puntualment s'han introduït altres modificacions a l'assaig per casos concrets on es vol obtenir informació més concreta. Un d'aquests casos es troba en el TRAP

modificat descrit per a realitzar assaigs d'inhibició de telomerasa justament de molècules que interaccionen amb quàdruplex de G²⁷. La principal modificació introduïda en aquest cas és la substitució de **TS** per **TSG4**, de seqüència 5'GGGATTGGGATTGGGATTGGGTT³. Aquest oligonucleòtid és reconegut per la telomerasa actuant igual que **TS**, però té l'avantatge que es pot estructurar en forma de quàdruplex. Així, molècules que inhibeixen la telomerasa via estabilització de quàdruplex poden evitar que l'enzim addicioni cap repetició telomèrica, mentre que utilitzant **TS**, això no és possible, i les molècules només poden interferir en l'activitat de l'enzim un cop afegides algunes repeticions, ja que **TS** per sí sol no pot formar cap quàdruplex. Així doncs, amb aquesta modificació en concret és possible calcular IC₅₀ més precises, que són generalment menors que les aconseguides amb els assaigs TRAP estàndard.

2.3.1.3 Kits comercials

En el mercat hi ha diversos kits de detecció d'activitat telomerasa de diferents cases comercials. En la majoria d'aquests, la barreja de **TS** amb el tampó, l'iniciador i el control intern de la PCR ve ja preparada, mancant només la Taq polimerasa i la mostra a analitzar. Les principals diferències entre els diferents kits radiquen en els mètodes d'anàlisi dels resultats. S'ha comentat que inicialment els resultats d'un assaig TRAP s'analitzaven mitjançant electroforesi en gel de poliàcrilamida i amb detecció mitjançant radioactivitat. Amb el temps s'han dissenyat altres mètodes de detecció dels productes amplificats que també permeten obtenir resultats força fiables. No obstant, l'ús l'electroforesi continua utilitzant-se en molts dels casos.

Un d'aquests nous mètodes dissenyats ha consistit en acoblar el TRAP a un assaig ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). En aquests kits, **TS** es presenta biotinilat en el seu extrem 5'. Així, un cop acabada l'etapa d'amplificació, la barreja de productes obtinguda (**TS** + 6n) s'immobilitza en una placa d'ELISA on cada pou està folrat amb streptavidina. Posteriorment, els productes resultants de l'elongació de la telomerasa són reconeguts per un anticòs que es troba conjugat a una peroxidasa, que a la vegada metabolitza un substrat generant un producte amb color. Finalment, un lector de plaques ELISA llegeix l'absorbància de la dissolució final, resultat del producte generat per la peroxidasa. El valor d'absorbància obtingut és proporcional a la quantitat de producte elongat per la telomerasa i posteriorment amplificat. En absència de telomerasa, el producte amplificat no és reconegut per l'anticòs, de manera que la reacció de la peroxidasa no té lloc, i no apareix coloració.

Un altre kit utilitza com a mètode de detecció la PCR en temps real (*PCR Real Time*). Aquest mètode permet anar detectant en temps real la generació de producte amplificat mitjançant mesures de la fluorescència emesa per un tint anomenat SYBR Green. Aquest tint és un intercalador de DNA que té la propietat d'augmentar enormement la seva fluorescència quan es troba interaccionant amb estructures dúplex. A mesura que té lloc l'amplificació cada cop hi ha més molècules de DNA que

s'hibriden formant dúplex, de manera que l'augment de la fluorescència emesa pel SYBR Green és proporcional a la generació de productes d'amplificació. D'aquesta manera se segueix l'evolució de la PCR de forma contínua.

Finalment, hi ha kits que utilitzen un altre mètode de detecció fluorimètric. Aquest es basa en la tècnica del FRET i en l'ús d'uns oligonucleòtids proveïts de la tecnologia Amplifluor[®] com a iniciadors, enlloc de **CX-ext** i **NT**. El disseny d'aquests oligonucleòtids permet la detecció i quantificació de l'activitat telomerasa mesurant directament la fluorescència de les dissolucions un cop acabada la PCR.

Els iniciadors Amplifluor[®] contenen un fluoròfor i un *quencher*, i estan dissenyats per emetre fluorescència només en el cas de ser incorporats en una PCR. En la seva estructura es poden diferenciar dues zones. Per una banda l'extrem 3' està format per la seqüència complementària a la que es vol reconèixer, mentre que l'extrem 5' és autocomplementari i es troba estructurat formant un *hairpin* (fig. 2.30). És en aquesta zona on hi ha incorporats ambdós cromòfors que intervenen en el fenomen del FRET, els quals es troben inicialment situats molt propers a l'espai degut a la formació del *hairpin*. Aquest *hairpin* és desestructurat per l'acció de la Taq polimerasa, provocant una separació espacial del fluoròfor i el *quencher*, la qual condueix a un increment de la fluorescència emesa pel fluoròfor, o donador (fig. 2.30B). Així doncs, l'increment de fluorescència observat al final de la PCR és proporcional a la quantitat de DNA amplificat, el qual es pot correlacionar amb l'elongació de **TS** produïda per la telomerasa.

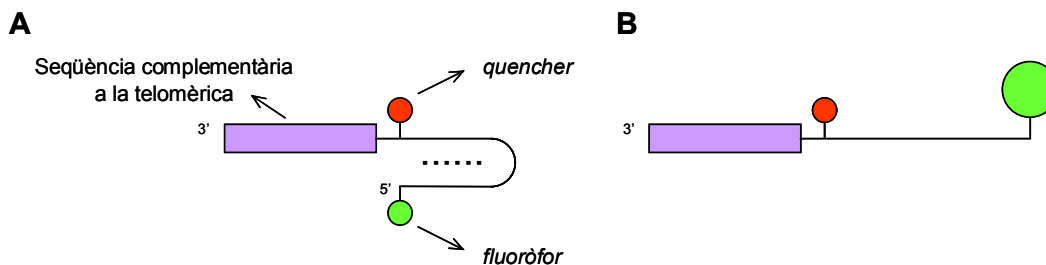


Figura 2.30 – Representació esquemàtica de la tecnologia Amplifluor[®] aplicada als iniciadors de la PCR. Inicialment, l'extrem 3' d'aquests iniciadors es troba estructurat en forma de *hairpin* (A). Quan aquesta estructuració desapareix té lloc un increment en l'emissió de la fluorescència per part de la fluoresceïna.

S'ha considerat convenient realitzar els assaigs d'inhibició utilitzant un dels kits comercials, i d'entre tots els existents, s'ha decidit usar el TRAPeze XL Telomerase Detection Kit de la casa comercial Chemicon International, el qual utilitza la tecnologia dels oligonucleòtids Amplifluor[®] per tal de determinar l'activitat telomerasa. Aquest kit permet obtenir resultats quantitatius (alguns kit només serveixen per a realitzar anàlisis qualitatives) tant a través de lectures de fluorescència de les mostres finals, com mitjançant una electroforesi no-desnaturalitzant en gel de poliàcrilamida.

L'objectiu d'aquesta part del treball és fer una avaluació de les capacitats d'inhibició de les acridines i dels conjugats per veure en quin rang de concentracions se situen les seves IC₅₀.

2.3.2 TRAPeZe XL Telomerase Detection Kit

El kit de detecció de telomerasa TRAPeZe XL està basat en el fonament bàsic del TRAP i permet la detecció fluorimètrica de l'activitat de la telomerasa. Inclou també la majoria de les modificacions indicades anteriorment, com ara la presència d'un control intern o la modificació de la seqüència de l'iniciador **CX**.

Aquest kit està dissenyat per analitzar mostres de teixits o extractes cel·lulars i detectar-hi la presència o absència d'activitat telomerasa, així com també poder quantificar aquesta activitat, en cas d'haver-n'hi. No obstant, també és possible realitzar estudis de capacitats d'inhibició de la telomerasa de certes molècules.

2.3.2.1 Components del kit

El kit conté:

- *Pellet* de 10⁶ cèl·lules control que contenen telomerasa.
- **TS**: substrat de la telomerasa descrit anteriorment.
- **RP** Amplifluor[®]: iniciador homòleg a **CX-ext**, però conté el sistema Amplifluor[®] en el seu extrem 5'.
- **K2** Amplifluor[®]: iniciador homòleg a **NT**, però conté el sistema Amplifluor[®] en el seu extrem 5'.
- **TSK2**: control intern, homòleg de **TSNT**.
- **TSR8**: oligonucleòtid de seqüència idèntica a **TS** però allargat amb més de 7 repeticions telomèriques (**TS-AG(GGTTAG)₇**) que actua de motlle control en el calibratge de l'experiment.

RP és en el seu extrem 3' complementari a la seqüència telomèrica humana i conté com a fluoròfor una molècula de fluoresceïna i com a *quencher* una de DABSYL (àcid 4-(dimetilamino)aza-benzen sulfònic). Aquest iniciador fa la funció de **CX-ext**, però amb el sistema Amplifluor[®] incorporat. Així, reconeix els productes resultants de l'elongació de **TS** per part de la telomerasa i permet la seva amplificació juntament amb el mateix **TS** (fig. 2.31).

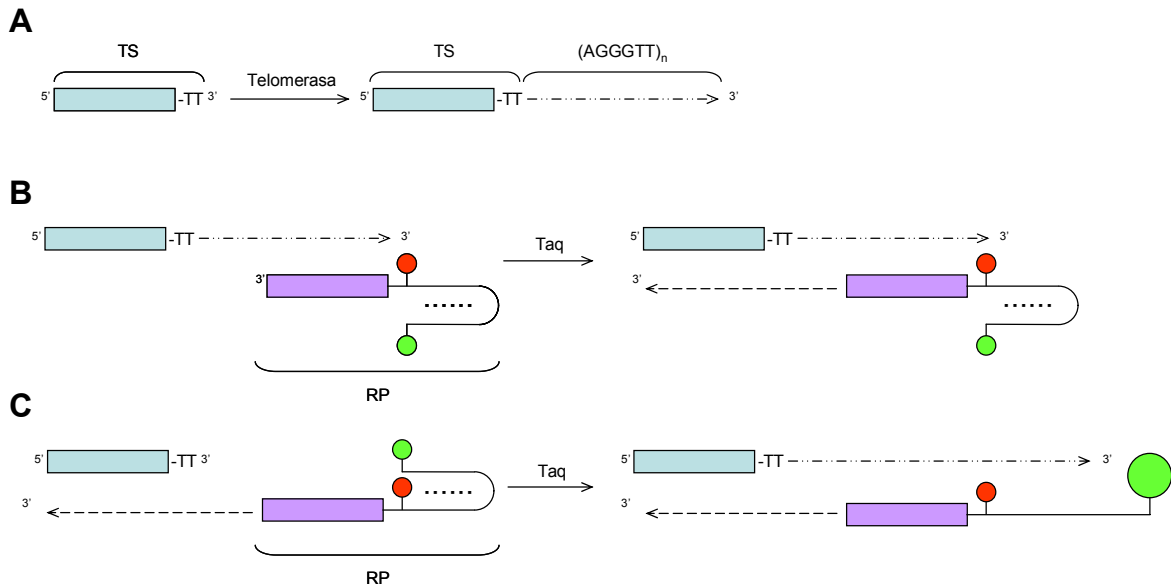


Figura 2.31 – Esquema de les diferents etapes del TRAP usant el sistema d'iniciadors Amplifluor[®]. Primer té lloc l'elongació de **TS** per part de la telomerasa (A), seguidament un primer cicle de PCR produeix l'oligonucleòtid **RP** elongat (B), el qual en posteriors cicles actua com a motlle i perd l'estructura de hairpin per acció de la Taq polimerasa (C).

Per la seva banda, **TSK2** és l'homòleg de **TSNT**, de manera que **K2** és l'iniciador Amplifluor[®] homòleg de **NT**. **K2** conté com a fluoròfor una molècula de sulforodamina i com a *quencher* una de DABSYL. Aquest sistema **TSK2** i **K2** realitzen la funció de control intern per a la PCR.

Les longituds d'ona d'excitació i emissió de la fluoresceïna i de la sulfordamina (fluoròfors d'**RP** i **K2** respectivament) es troben suficientment allunyades entre elles per tal de permetre la detecció simultània de la fluorescència emesa per cadascun d'ells. L'increment de fluorescència provinent de la fluoresceïna és conseqüència de la incorporació dels iniciadors **RP** a la PCR i és proporcional a la quantitat de **TS** elongat per la telomerasa que s'ha amplificat durant la PCR. Aquest valor té una correlació directa amb l'activitat telomerasa, ja que com més molècules **TS** hagin estat elongades per la telomerasa, més iniciadors **RP** seran incorporats a la PCR, i per tant, més fluorescència provinent de la fluoresceïna es detectarà.

Per altra banda, l'increment de fluorescència provinent de la sulforodamina és degut a la incorporació dels iniciadors **K2** a la PCR, en l'amplificació de **TSK2**. Aquest procés es semi-competitiu amb l'amplificació dels productes de l'elongació de **TS** per part de la telomerasa, ja que **TS** actua d'iniciador en ambdós processos. En aquest cas, el valor de fluorescència actua com a indicador de l'eficiència de la PCR. Així doncs, aquest valor permet realitzar una correcció del resultat obtingut en cada assaig per tal que aquests puguin ser completament comparables entre ells.

2.3.3 Assaigs preliminars

2.3.3.1 Recta de calibratge

En primer lloc s'ha realitzat un assaig amb **TSR8** per tal de generar una recta de calibratge. Aquesta és important per tal de fer determinacions quantitatives d'activitat telomerasa, però també serveix com a control per saber que l'experiment funciona correctament.

Per tal de realitzar la recta de calibratge, primer de tot s'han fet 4 dilucions consecutives 1:5 de la dissolució inicial de **TSR8**. Aquesta solució té una concentració de 0.2 amol/ μ L, de manera que s'han obtingut les diferents dissolucions que es mostren a la següent taula:

Nom	Conc. de TSR8 (amol/ μ L)
A	0.2
B	0.04
C	0.008
D	0.0016

Taula 2.6 – Dissolucions de **TSR8** preparades per a dur a terme la recat de calibratge.

Posteriorment, s'ha dut a terme la preparació de 7 mostres, per tal de poder elaborar una recta de calibratge (taula 2.7).

Mostra	Nom	5X TRAPeZe	Taq (μ L)	Tel (μ L)	TSR8
1	Tel ctrl. +	+	+	+	-
2	Tel ctrl. -	+	+	-	-
3	TSR8 A	+	+	-	A
4	TSR8 B	+	+	-	B
5	TSR8 C	+	+	-	C
6	TSR8 D	+	+	-	D
7	Taq ctrl. -	+	-	+	-

Taula 2.7 – Composició de les mostres per a realitzar la recta de calibratge.

En aquest experiment, la mostra 1 és el control positiu de la telomerasa, la 2 el negatiu, de la 3 a la 6 són les que permetran generar la recta de calibratge i la 7 és el control negatiu de Taq polimerasa. S'ha dut a terme el TRAP (en primer lloc l'elongació de la telomerasa i posteriorment la PCR) i s'ha mesurat la fluorescència provinent tant de la fluorescència com de la sulforodamina per a cada mostra.

Els valors obtinguts de fluorescència requereixen un tractament matemàtic abans de poder construir la recta de calibratge. En primer lloc s'han d'obtenir els increments nets de fluorescència tant per la fluoresceïna (Δ FL), com per la

sulfurodamina (ΔR). Aquests valors s'obtenen restant a cada mostra l'emissió provinent de la fluoresceïna en el control negatiu de telomerasa i la provinent de la sulfurodamina en el control negatiu de Taq polimerasa, respectivament. Posteriorment, s'ha de calcular la proporció relativa d'increment net de fluorescència ($\Delta FL/\Delta R$) per a cada una de les mostres. Aquest valor és proporcional a l'activitat telomerasa i és el que s'utilitzarà per tal de comparar l'activitat telomerasa entre les diferents mostres dels TRAPs.

Per a realitzar la recta de calibratge, s'ha de calcular també els **TPG** (*Total Product Generated*) per a cada mostra. Una unitat **TPG** es defineix com el nombre d'iniciadors **TS** per a cada 600 molècules allargat amb almenys 3 repeticions telomèriques per la telomerasa, en 30 minuts d'incubació a 30°C, i té la següent equivalència: 1 amol de **TSR8** = 1000 **TPG**. Aquestes unitats serveixen per tal de correlacionar les unitats de $\Delta FL/\Delta R$ amb l'activitat de la telomerasa, i poder quantificar aquesta en teixits o d'extractes cel·lulars. En el nostre cas, que estudiarem la capacitat d'inhibició de certes molècules a partir d'un control positiu, aquestes unitats no les utilitzarem, però són necessàries per a realitzar el calibratge. La relació entre les unitats **TPG** i la proporció relativa d'increment net de fluorescència ($\Delta FL/\Delta R$) és logarítmica, de manera que cal calcular el \log_{10} de cada valor obtingut i llavors representar el $\log(\Delta FL/\Delta R)$ vers el \log **TPG** (fig. 2.32).

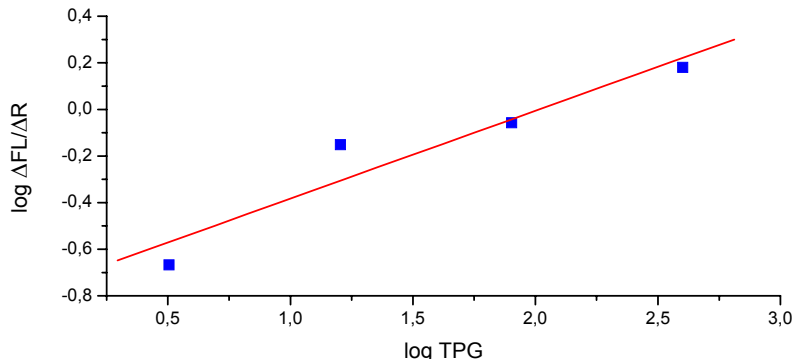


Figura 2.32 – Recta de calibratge obtinguda.

Com es pot observar, els valors obtinguts s'ajusten força bé a una recta ($R^2 > 0.9$). Si es volgués dur a terme alguna quantificació d'activitat telomerasa, es repetiria la recta per aconseguir un millor ajust que assegurés una quantificació més precisa, però ja que el que es vol observar és una inhibició d'un control, aquest calibratge és força menys important.

2.3.3.2 Assaig preliminar amb acridines

En primer lloc s'ha pensat en avaluar l'activitat inhibidora de 3 acridines: **A7**, **A18**, i **A21**. D'aquestes, **A7** ja ha estat descrita com a inhibidora de la telomerasa, així

que servirà com a control. S'han preparat les mostres tal i com es mostra esquemàticament a la taula 2.8, avaluant cada acridina a 4 concentracions diferents (1, 5, 10 i 50 μM).

Mostra	Nom	5X Mescla	Taq	Tel (μL)	Acr
1	Tel ctrl +	+	+	+	-
2	Tel ctrl -	+	+	-	-
3-6	A7 (1-50 μM)	+	+	+	A7
7-10	A18 (1-50 μM)	+	+	+	A18
11-14	A21 (1-50 μM)	+	+	+	A21
15	Taq ctrl -	+	-	+	-

Taula 2.8 – Mostres preparades pel primer assaig.

S'ha dut a terme l'assaig, i un cop obtinguts els valors de $\Delta\text{FL}/\Delta\text{R}$ per a cada mostra, aquests s'han normalitzat respecte al valor obtingut per al control positiu de la telomerasa (mostra 1). El valor de $\Delta\text{FL}/\Delta\text{R}$ de cada mostra és proporcional a l'activitat telomerasa i s'ha representat vers la concentració de cada acridina. A la figura 2.33 s'observen els resultats obtinguts, els quals resulten força sorprenents.

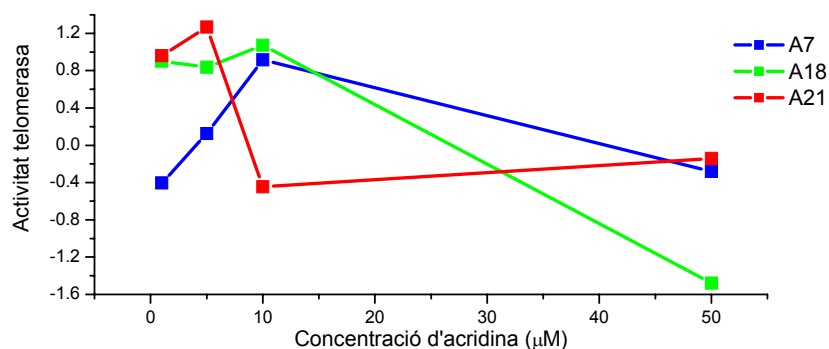


Figura 2.33 – Resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi fluorimètrica de les mostres.

D'entrada, s'observen valors per sobre d'1 (valor d'activitat telomerasa del control) i per sota de 0 (100% d'inhibició) que en teoria no són possibles. A més a més, el comportament que presenten els valors obtinguts no és gens coherent (alguns augmenten amb la concentració). S'ha pensat que aquests valors obtinguts poden ser degut a interferències entre la fluorescència que presenten les acridines per sí soles i els sistemes Amplifluor[®]. Aquests resultats ja han estat corregits amb els blancs, mesurats per a cada concentració d'acridina, però resulta evident que la interferència no s'ha pogut eliminar.

S'ha decidit provar l'anàlisi per electroforesi no desnaturant en gel de poliacrilamida, que és la tècnica clàssica en l'anàlisi dels TRAPs. Mitjançant aquesta,

en principi no hi hauria d'haver interferències provinents de la fluorescència de les acridines, ja que el revelat es du a terme amb bromur d'etidi.

2.3.3.3 Estudi per electroforesi en gel de poliacrilamida

En primer lloc, s'han analitzat les mostres utilitzades anteriorment per a construir la recta de calibratge. Això ha permès avaluar el funcionament d'aquesta tècnica en l'anàlisi dels resultats dels TRAPs. Així doncs s'ha realitzat una electroforesi no desnaturant, s'ha tenyit el gel obtingut amb bromur d'etidi i s'ha visualitzat amb un transil·luminador (fig. 2.34).

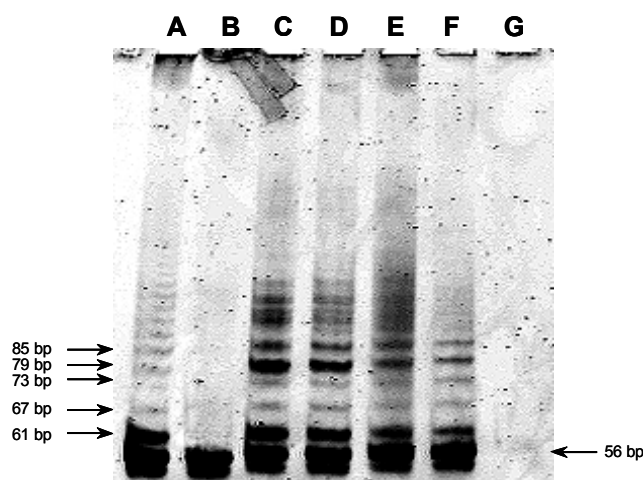


Figura 2.34 – Anàlisi per electroforesi de les mostres de la recta de calibratge: *Tel ctrl +* (A), *Tel ctrl –* (B), **TSR8 A-D** (C-F) i *Taq ctrl-* (G).

El primer que s'observa en el gel és que tant el control positiu de telomerasa com les 4 mostres que contenen el patró **TSR8**, presenten la sèrie de bandes esperades, característiques dels productes elongats per la telomerasa.

Anteriorment s'ha comentat que el kit utilitzat conté l'oligonucleòtid **RP** com a iniciador de la PCR. Aquest fa la funció que desenvolupa **CX-ext** en l'assaig TRAP tradicional, però és un oligonucleòtid força més llarg, ja que conté el sistema Amplifluor al seu extrem 3'. Això fa que quan es forma el dímer d'iniciadors entre **TS** i **RP**, el que es forma és un dúplex de 61 parells de bases. Per altra banda, el dúplex format pels oligonucleòtids que exerceixen de control intern (**TSK2** i **K2**) és de 56 parells de bases i presenta una mobilitat superior. La banda corresponent a aquest dúplex és molt important, ja que informa que la PCR ha funcionat correctament.

En els carrils A, C, D, E i F es poden observar tant les bandes de 56 i 61 bp com el seguit de bandes 61 + 6n característic de l'acció de la telomerasa (fig. 2.34). Per contra, en el carril B (control negatiu de la telomerasa) només s'observa la banda de 56 bp (control intern de la PCR) i en el G (control negatiu de Taq polimerasa) no se n'observa cap, ja que no ha tingut lloc l'amplificació.

Els resultats obtinguts són qualitativament acceptables, i a partir d'aquí s'ha realitzat la quantificació de la intensitat de les bandes mitjançant el software present en el mateix transil·luminador. Per una banda s'ha mesurat la intensitat de les bandes provinents dels productes elongats per la telomerasa, i per l'altra, la de la banda provinent del control intern. Aquests valors són es poden correlacionar amb ΔFL i ΔR , de manera que s'ha calculat la proporció relativa d'increment net de fluorescència ($\Delta FL/\Delta R$) i s'ha representat el seu logaritme vers el \log_{10} de TPG. S'ha obtingut una recta força similar on el punt que es troba més desviat correspon al de la mostra **TSR8C**, igual que abans. Ara, però, al tenir la imatge del gel es pot observar que realment el carril corresponent a aquesta mostra (carril E) no és que contingui més quantitat de producte, sinó que es troba un pèl contaminat. Una altra observació és que el control positiu de la telomerasa (carril A) presenta un perfil correcte però de poca intensitat global. És per això que s'ha decidit que, de cara a assaigs posteriors, s'augmentarà la quantitat d'enzim per mostra.

2.3.4 Assaigs amb acridines

El primer que s'ha fet ha estat tornar a analitzar, ara per electroforesi en gel de poliacrilamida, l'experiment realitzat amb anterioritat on s'havien avaluat les acridines **A7**, **A18** i **A21**.

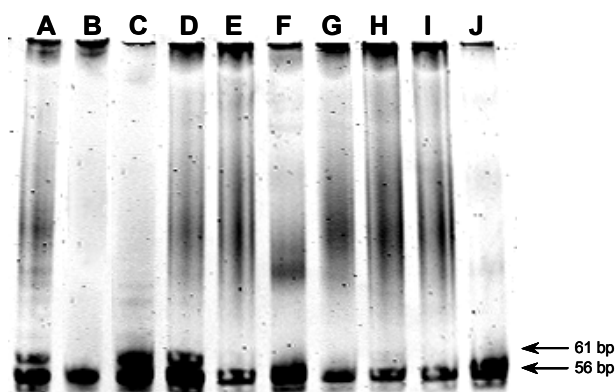


Figura 2.35 – Anàlisi per electroforesi del TRAP realitzat amb les acridines **A7**, **A18** i **A21**: Tel ctrl + (A), Tel ctrl – (B), **A7** (C-F) i **A18** (G-J).

Com es pot observar a la figura 2.35, en el gel no s'observa de forma clara la sèrie de bandes característica de l'acció de la telomerasa. Tot i que és possible distingir el control negatiu de la telomerasa, en general tots els carrils són molt bruts i tenen poca o nul·la resolució. Aquestes mostres han estat guardades un parell de mesos al congelador, de manera que aquest podria ser el motiu de la poca qualitat del gel. Així doncs, d'ara en endavant, les anàlisis per gel s'han dut a terme just pocs dies després de realitzar el TRAP per tal d'evitar possibles degradacions.

S'ha decidit avaluar la majoria de les acridines que han mostrat certa estabilització d'estructures quàdruplex de G en els assaigs de FRET (**A7**, **A18-23**), així

com també una de les que no ha mostrat gens d'estabilització (**A24**). En tots els casos les mostres s'han preparat de forma similar a la que es mostra a la taula 2.8 i les concentracions d'acridina assajades han estat 1, 5, 20 i 50 μM . A la figura 2.36 es poden observar els gels obtinguts.

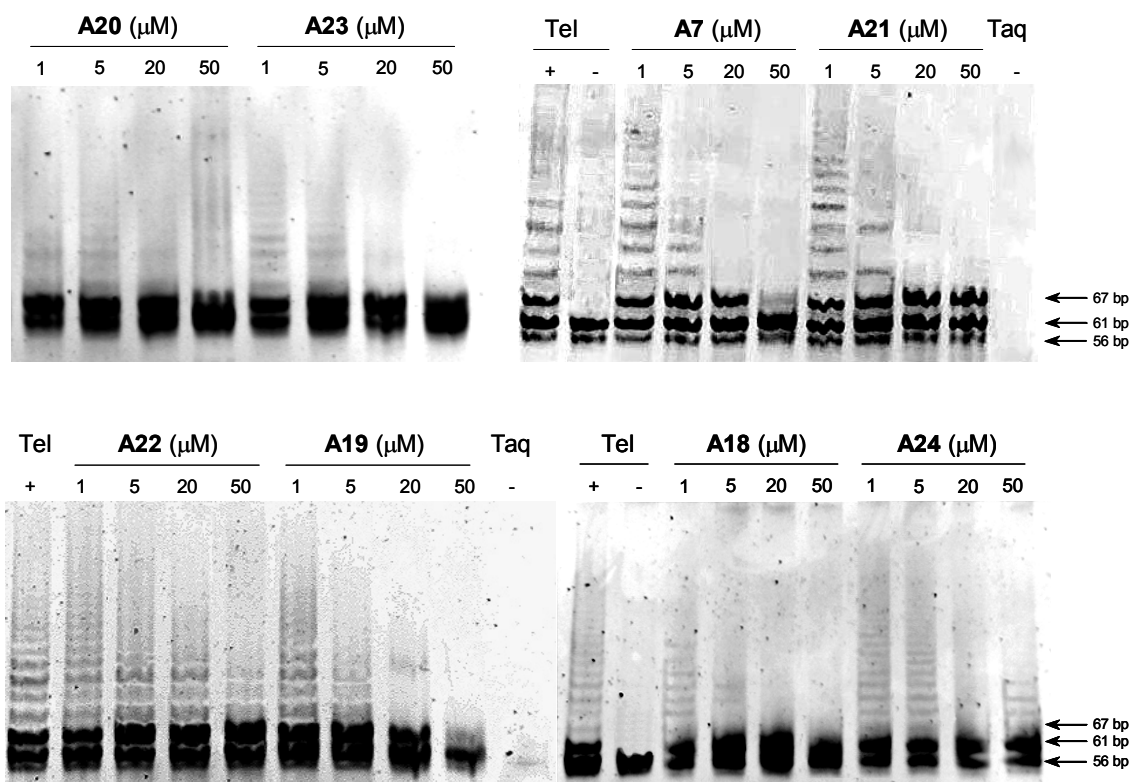


Figura 2.36 – Anàlisi per electroforesi dels TRAPs realitzats amb les acridines **A7**, **A18-24** a concentracions 1, 5, 20 i 50 μM .

En una primera observació dels gels es pot arribar a diverses conclusions qualitatives. En primer lloc, cal destacar que en els controls positius de telomerasa sempre s'observa la sèrie de bandes característica (**TS** + 6n), mentre que en els controls negatius només s'observa la banda de 56 bp que correspon al control intern. Aquests resultats juntament amb el fet de que en els controls negatius de Taq polimerasa no s'hi observa cap banda, són una constatació que els assaigs han funcionat correctament. A partir d'aquí, si es passa a analitzar els resultats de les diferents acridines cal destacar que en general tant el nombre de bandes com la intensitat de les mateixes tendeix a disminuir a mesura que augmenta la concentració d'acridina. Aquest fet és coherent amb l'existència de certa inhibició de l'enzim per part de les molècules assajades.

Comparant les acridines entre elles, sembla que n'hi hagi cinc que inhibeixen força, ja que a concentració 50 μM , pràcticament només apareix la primera banda (61 bp), o en alguns casos, ni aquesta. Les acridines en qüestió són l'**A7**, **A18**, **A19**, **A21** i

A23. Per contra, les acridines **A20**, **A22** i **A24**, semblen no inhibir massa, ja que a la màxima concentració assajada encara s'observa la sèrie de bandes característica. Per tal de quantificar els resultats, s'han integrat les intensitats de les bandes amb el *software* que conté el mateix transil·luminador on s'han visualitzat els gels. Els resultats obtinguts s'han representat a la figura 2.37.

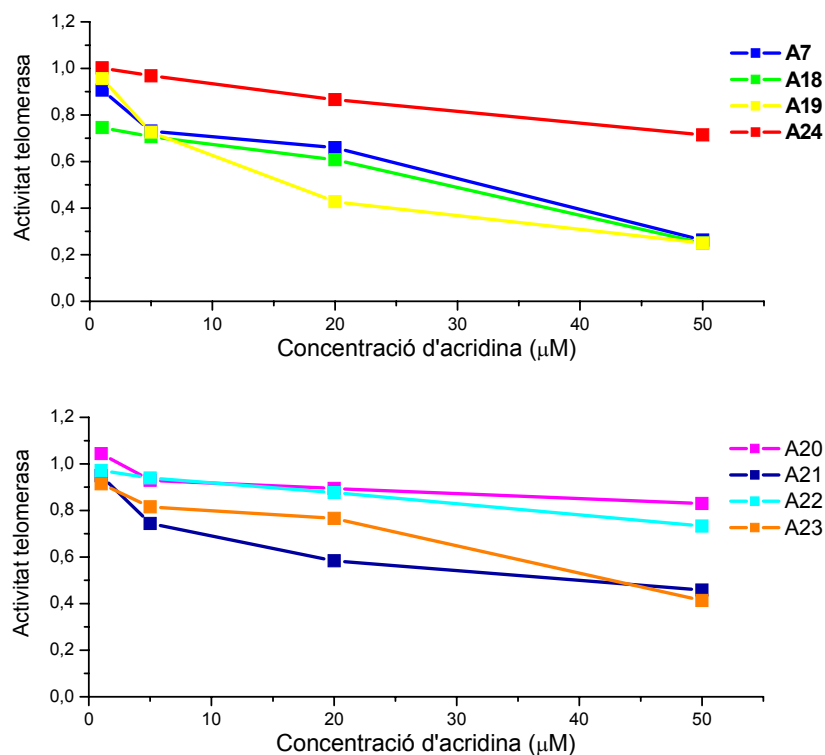


Figura 2.37 – Gràfiques d'activitat telomerasa vs concentració per a les acridines **A7**, **A18-24**.

En general, els resultats obtinguts en la integració dels diferents carrils dels gels confirmen la tendència apuntada amb anterioritat de que, en tots els casos, a l'augmentar la concentració d'acridina, augmenta el grau d'inhibició de la telomerasa. A partir de les gràfiques obtingudes, s'han pogut calcular els valors d' IC_{50} d'inhibició de l'activitat telomerasa per a cada acridina avaluada. Aquests valors es mostren a la taula 2.9

Acridina	IC_{50} (μM)	Acridina	IC_{50} (μM)
A7	33	A21	40
A18	30	A22	>50
A19	16	A23	44
A20	>50	A24	>50

Taula 2.9 – IC_{50} calculades de les acridines avaluades.

Amb aquests valors es pot realitzar una anàlisi comparativa més precisa entre les diferents acridines. N'hi ha cinc que presenten valors d'IC₅₀ menors que 50 µM, d'entre les quals la més potent és l'**A19**. Aquesta és la que conté un grup hidroxil primari. No gaire allunyades es troben l'**A7**, descrita amb anterioritat a la literatura, i l'**A18**, que conté un anell de pirrolidina en un extrem i un grup acriloil en l'altre. Finalment les altres dues acridines (**A21** i **A23**) presenten valors d'IC₅₀ al voltant de 40 µM i són dues de les acridines que es troben a punt per ser conjugades (contenen un aminoàcid en un extrem i una amina terciària i cíclica en l'altre). Aquestes dues acridines són les que contenen anells de mateix nombre de baules a banda i banda.

Les tres acridines que han presenten pitjors resultats d'inhibició són, per una banda les **A20** i **A22** que contenen anells de mida diferents a cadascun dels braços, i per l'altra, l'**A24**, que és la que conté dos residus de prolina.

Aquests resultats d'inhibició, són interessants, ja que sembla que es poden correlacionar relativament bé amb els resultats observats per FRET. Cal recordar que l'**A19** és la que més increment de T_m ha mostrat per FRET, mentre que **A24** és la que menys. De totes maneres cal ser prudent en l'anàlisi d'aquests resultats, ja que segurament la integració de les bandes dels gels comporta un important marge d'error. Així doncs, els valors obtinguts serveixen a nivell orientatiu per tal de comparar les diferents acridines entre elles i mostrar tendències generals de comportament. Qualsevol anàlisi més acurada requeriria la realització d'aquests experiments almenys per triplicat i l'estudi dels errors obtinguts en les quantificacions.

2.3.5 Assaigs amb conjugats

Un cop avaluades la majoria de les acridines, s'han avaluat també alguns dels conjugats. Per FRET s'ha observat que els conjugats en general estableixen menys les estructures quàdruplex de G que les acridines, de manera que seria previsible que també produïssin un efecte menor d'inhibició de la telomerasa. Així doncs, s'ha decidit avaluar d'entrada 3 dels conjugats més destacats en els assaigs de FRET.

S'han escollit els conjugats **C1**, **C6** i **C8**, perquè a part de ser dels que millors resultats han donat en els assaigs realitzats per FRET (sobretot **C1** i **C6**), a més a més presenten força diversitat estructural entre ells. Tenint en consideració que tots contenen acridines diferents, cal recordar que **C6** conté l'espaiador més llarg de tots compostat per **LN5** + **LO18**, i que **C1** i **C8** es diferencien en la seqüència nucleotídica. S'han realitzat els TRAPs per a cada conjugat i els gels obtinguts es mostren a la figura 2.38. Posteriorment s'ha dut a terme la integració de les bandes i s'han obtingut els corresponents perfils d'inhibició (fig. 2.39).

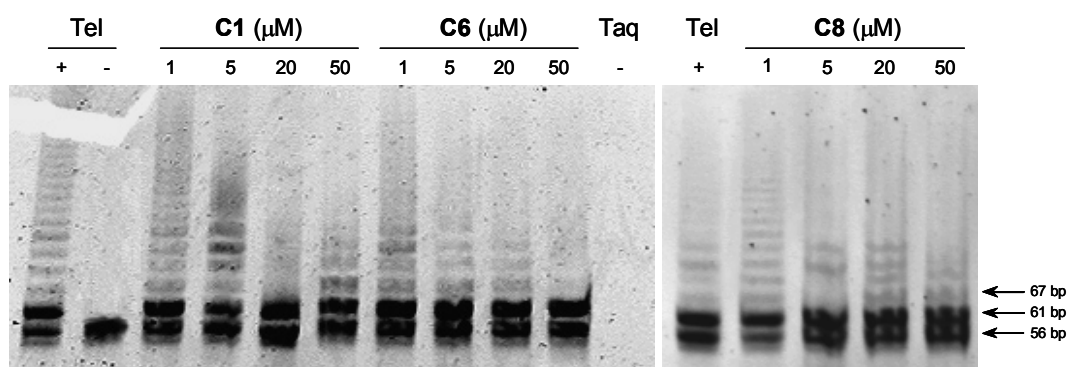


Figura 2.38 – Anàlisi per electroforesi dels TRAPs realitzats amb els conjugats **C1**, **C6** i **C8** a concentracions 1, 5, 20 i 50 μM .

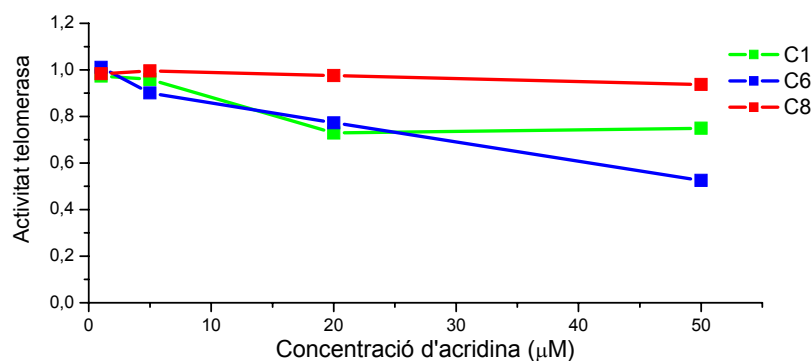


Figura 2.39 – Gràfica d'activitat telomerasa vs concentració per als conjugats **C1**, **C6** i **C8**.

En primer lloc el que s'observa és un comportament similar al mostrat per les acridines, en el sentit que en augmentar la concentració de conjugat hi ha una disminució evident de l'activitat de la telomerasa. En aquest cas, però, les disminucions són força menors que les observades pels compostos acridínics. A partir de les gràfiques obtingudes ha estat possible calcular les IC_{50} d'aquests productes (taula 2.10).

Conjugat	IC_{50} (μM)
C1	>50
C6	50
C8	>50

Taula 2.10 – IC_{50} calculades dels conjugats avaluats.

Realment, en aquest cas és més interessant fixar-se en els gels o en les gràfiques d'inhibició que en aquests valors d' IC_{50} , ja que amb aquests últims només

són una estimació i no es poden establir gaires diferències entre ells. Per tal d'obtenir valors més precisos d'IC₅₀, caldria haver fet assaigs a concentracions més elevades d'aquests conjugats (20, 40, 60 i 80 µM).

Analitzant els gels, el que s'observa és que el conjugat **C6** és el que presenta una major inhibició, ja que a una concentració de 50 µM ja no s'observa la sèrie característica de bandes, sinó solament la primera (61 bp) i la del control intern (56 bp). Per altra banda, **C8** és clarament el que menys inhibició produeix, produïnt a 50 µM, una inhibició de l'activitat telomerasa inferior al 10%. Es fa difícil poder extreure gaires conclusions d'aquests resultats més enllà de que realment es produeix inhibició, però que aquesta és menor en els conjugats que en les acridines.

2.4 Discussió dels resultats obtinguts i perspectives

En aquest capítol s'han descrit els experiments realitzats tant amb les acridines com amb els conjugats per tal d'avaluar la seva capacitat d'estabilització d'estructures quàdruplex de G i d'inhibició de la telomerasa. Ambdós tipus d'experiments són completament diferents i permeten obtenir informació complementària. No obstant, és interessant intentar fer una comparativa dels resultats obtinguts mitjançant ambdues tècniques (FRET i TRAP).

Cal recordar que la síntesi dels conjugats s'ha plantejat per tal d'obtenir molècules que produïssin una inhibició selectiva de la telomerasa via estabilització d'estructures quàdruplex en els extrems telomèrics de les cèl·lules. Mitjançant FRET s'ha pogut constatar que la majoria dels conjugats i de les acridines obtingudes produeixen una estabilització d'estructures quàdruplex de G formades per la seqüència telomèrica humana. També s'ha pogut observar, mitjançant TRAP, que la majoria d'aquestes molècules produeixen una inhibició de la telomerasa. Així doncs, la pregunta que faltaria respondre ara és si la inhibició observada és resultat de la capacitat d'estabilització de quàdruplex de G que posseeixen aquestes molècules. Aquesta pregunta és molt difícil de contestar de forma rotunda, ara bé, sí que és possible analitzar fins a quin punt els resultats de FRET es correlacionen amb els de TRAP.

S'ha observat que les acridines que millor estabilitzen els quàdruplex són les **A19, A18, A7, A23** i **A21**, en aquest ordre. Fixant-nos en els valors d'IC₅₀ calculats per aquestes mateixes acridines, l'ordre és pràcticament idèntic: **A19, A18, A7, A21** i **A23**. En tot cas, s'observa de forma més que evident que aquestes són les acridines que més inhibeixen la telomerasa. Però això no és tot, ja que fixant-se amb les que menys estabilització produeixen, s'observa que **A24**, que és una de les acridines que no ha mostrat gens d'estabilització, també és una de les que menys inhibeix l'enzim en qüestió.

Dins del grup d'acridines que contenen una amina terciària a una banda i un aminoàcid a l'altra, també s'observa aquesta correlació dels resultats. Per FRET s'ha observat una diferència entre **A21** i **A23** (anells de mateix nombre de baules a cada

braç) respecte a **A20** i **A22**. Aquesta mateixa tendència s'ha observat també per TRAP, ja que les dues primeres presenten valors d'IC₅₀ al voltant de 40 µM, mentre que les darreres els presenten força majors de 50 µM.

En el cas dels conjugats, es fa més difícil correlacionar els resultats. Per una banda només s'han realitzat TRAPs de tres d'ells, i per l'altra, els resultats de FRET depenen del tipus d'oligonucleòtid formador de quàdruplex emprat (**HT5**, **HT6** o **HTmod**). En tot cas, sí que sembla, per FRET, que en general els conjugats **C1** i **C6** estableixen més els quàdruplex que no pas **C8** i que d'entre els dos primers, **C6** destaca sensiblement. Les diferències entre ells en TRAP són més evidents i responen clarament a la tendència apuntada per FRET, essent **C6** el que presenta una capacitat inhibidora més alta i **C8** el que la presenta més baixa.

Finalment, fent una comparació entre les acridines i els conjugats, també s'observa una certa correlació, ja que tant per FRET com per TRAP, les acridines donen millors resultats que els conjugats, si bé per FRET el model utilitzat per cada tipus de compost ha estat diferent (**HT4** per les acridines i **HT5**, **HT6** i **HTmod** pels conjugats).

En resum, els resultats obtinguts permeten concloure que ambdós experiments mostren una correlació força satisfactòria, encara que no perfecta. A partir d'aquí, sembla ser que molt probablement la inhibició de la telomerasa observada per TRAP pot venir donada, tal com es pretenia, per una estabilització d'estructures quàdruplex. Una altra conclusió que es pot extreure és que els conjugats obtinguts han resultat ser inhibidors menys potents que les acridines que contenen. Aquest fet, tot i no ser positiu tampoc és sorprenent i no tanca la porta a aquestes molècules com a potencials fàrmacs anticancerígens. En primer lloc l'objectiu perseguit amb la síntesi d'aquests compostos no era millorar-ne l'activitat dels precursors acridínics, sinó millorar-ne la selectivitat. D'aquesta manera, el proper pas hauria de ser la realització d'un estudi d'activitat i citotoxicitat, per tal d'observar si realment els conjugats en qüestió presenten la selectivitat desitjada.

Pel que fa a l'activitat dels productes en sí mateixa, cal tenir en compte que des de fa anys, la lluita contra el càncer ha anat guanyant terreny a la malaltia degut, en gran part, a l'ús de teràpies combinades. Aquestes es basen en l'administració de dos o més fàrmacs amb mecanismes diferents, però complementaris. En aquest marc és on podrien tenir cert futur els conjugats obtinguts en aquesta tesi. Cal destacar que per a la majoria dels fàrmacs anticancerígens de naturalesa nucleotídica que es troben en fases d'assaigs clínics, s'han realitzat assaigs en combinació amb altres fàrmacs, com ara el carboplatí, el docetaxel o el paclitaxel²⁸, per intentar potenciar-ne els efectes²⁹. En el nostre cas, és d'esperar que la interacció dels conjugats amb els telòmers condueixi a la inhibició de l'enzim, impossibilitant la restauració de la longitud dels telòmers en les cèl·lules cancerígenes. Aquest fet provocaria que aquestes cèl·lules passessin a tenir telòmers cada vegada més curts, podent entrar així en estat de senescència.

Finalment, cal tenir en compte que tot i l'esforç que s'està realitzant de cara a desenvolupar més fàrmacs de naturalesa oligonucleotídica^{30,31} (sobretot en el camp del càncer), actualment només n'hi ha dos en el mercat: l'agent antivíric Vitravene, desenvolupat per ISIS Pharmaceuticals³², i l'aptàmer Macugen, comercialitzat per Eyetech i Pfizer³³. Aquest fet demostra les enormes dificultats que han presentat aquests tipus de compostos en el seu desenvolupament com a fàrmacs. Aquestes van des de la degradació en medis cel·lulars, fins a la difícil internalització cel·lular. Així doncs, si es demostrés la selectivitat esperada pels conjugats sintetitzats, caldria obtenir noves famílies de conjugats formades per anàlegs oligonucleotídics amb unions internucleosídiques fosforotioat, o bé conjugats de PNA, o d'altres esquelets.

2.5 Bibliografia

- ¹ Selvin, P.R. **The renaissance of fluorescence resonance energy transfer.** *Nature Struct. Biol.*, **2000**, *7*, 730-734
- ² Didenko, V.V. **DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications.** *BioTechniques*, 2001, *31*, 1106-1121
- ³ Hillisch, A.; Lorenz, M.; Diekmann, S. **Recent advances in FRET: distance determination in protein-DNA complexes.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2001**, *11*, 201-207
- ⁴ Nagai, Y.; Miyazaki, M; Aoki, R.; Zama, T.; Inouye, S.; Hirose, K.; Iino, M.; Hagiwara, M. **A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo.** *Nature Biotech.*, **2000**, *18*, 313-316
- ⁵ Yang, M.; Millar, D.P. **Fluorescence resonance energy transfer as a probe of DNA structure and function.** *Methods in Enzimology.*, **1997**, *278*, 417-444
- ⁶ Truong, K.; Ikura, M. **The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2001**, *11*, 573-578
- ⁷ Rice, K.G. **Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer to Analyze Carbohydrates.** *Anal. Biochem.*, **2001**, *297*, 117-122
- ⁸ Wittwer, C.T.; Herrmann, M.G.; Moss, A.A.; Rasmussen, R.P. **Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification.** *Biotechniques*, **1997**, *22*, 130-138
- ⁹ 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.*, **2002**, *30*, e39
- ¹⁰ Mergny, J.L. **Fluorescent Energy Transfer as a Probe for tetraplex Formation: The i-Motif.** *Biochemistry*, **1999**, *38*, 1573-1581
- ¹¹ 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
- ¹² Risitano, A.; Fox, K.R. **Influence of loop size on the stability of intramolecular DNA quadruplexes.** *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 2598-2606
- ¹³ Risitano, A.; Fox, K.R. **The stability of intramolecular DNA quadruplexes with extended loops forming Inter.- and intra-loops duplexes.** *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 1852-1855
- ¹⁴ Risitano, A.; Fox, K.R. **Stability of Intramolecular DNA Quadruplexes: Comparison with DNA Duplexes.** *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6507-6513
- ¹⁵ Green, J.J.; Ying, L.; Klenerman, D.; Balasubramanian, S. **Kinetics of Unfolding the Human Telomeric DNA Quadruplex Using a PNA Trap.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 3763-3767
- ¹⁶ Ying, L.; Green, J.J.; Li, H.; Klenerman, D.; Balasubramanian, S. **Studies on the structure and dynamics of the human telomeric G quadruplex by a single-molecule fluorescence resonance energy transfer.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, 14629-14634
- ¹⁷ 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
- ¹⁸ Anantha, N.V.; Azam, M.; Sheardy, R.D. **Porphyrim Binding to Quadruplexed T₄G₄.** *Biochemistry*, **1998**, *37*, 2709-2714
- ¹⁹ Kim, N.W.; Piatyszek, M.A.; Prowse, K.R.; Harley, C.B.; West, M.D.; Ho, P.L.C.; Coviello, G.M.; Wright, W.E.; Weinrich, S.L.; Shay, J.W. **Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer.** *Science*, **1994**, *266*, 2011-2015
- ²⁰ 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

- ²¹ Greider, C.W.; Blackburn, E.H. **Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts.** *Cell*, **1985**, *43*, 405-413
- ²² Morin, G.B. **The Human Telomere Terminal Transferase Enzyme Is a Ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG Repeats.** *Cell*, **1989**, *59*, 521-529
- ²³ Wright, W.E.; Shay, J.W.; Piatyszek, M.A. **Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity.** *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 3794-3795
- ²⁴ Kim, N.W.; Wu, F. **Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP).** *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 2595-2597
- ²⁵ Krupp, G.; Kühne, K.; Tamm, S.; Klapper, W.; Heidorn, K.; Rott, A.; Parwaresch, R. **Molecular basis of artefacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust "TRAP" assay.** *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 919-921
- ²⁶ Sellner, L.N.; Lock, P.M.; Turbett, G.R. **Simplified Method for the Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP).** *BioTechniques*, **1998**, *24*, 726-728
- ²⁷ Gomez, D.; Mergny, J.L.; Riou, J.F. **Detection of Telomerase Inhibitors Based on G-Quadruplex Ligands by a Modified Telomeric Amplification Protocol Assay.** *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 3365-3368
- ²⁸ Tamm, I.; Dörken, B.; Hartmann, G. **Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?** *The Lancet*, **2001**, *358*, 489-497
- ²⁹ Pirolo, K.F.; Rait, A.; Sleer, L.S.; Chang, E.H. **Antisense therapeutics: from theory to clinical practice.** *Pharm. & Therap.*, **2003**, *99*, 55-77
- ³⁰ Da Ros, T.; Spalluto, G.; Prato, M.; Saison-Behmoaras, T.; Bourtoune, A.; Cacciari, B. **Oligonucleotides and Oligonucleotide Conjugates: A New Approach for Cancer Treatment.** *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 71-88
- ³¹ Dean, N.M.; Bennett, C.F. **Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer.** *Oncogene*, **2003**, *22*, 9087-9096
- ³² Opalinska, J.B.; Gewirtz, A.M. **Nucleic-Acid Therapeutics: Basic Principles and Recent Applications.** *Nature Rev.*, **2002**, *1*, 503-514
- ³³ Fine, S.L.; Martin, D.F.; Kirkpatrick, P. **Pegaptanib sodium.** *Nature Rev. Drug Discov.*, **2005**, *4*, 187-188.