

3. ESTUDI DE QUÀDRUPLEX DE GUANINES EN OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS

3.1 Introducció i objectius

Dins del camp de la biologia estructural dels àcids nucleics, una de les línies de recerca que més interès ha suscitat en els últims anys ha estat l'estudi estructural dels quàdruplex de G. Les hipòtesis sorgides sobre els possibles rols que poden jugar aquest tipus d'estructures en diversos processos cel·lulars, conjuntament amb el fet d'haver esdevingut una diana terapèutica de singular importància en la cerca de nous fàrmacs anticancerígens, ha disparat enormement aquest interès. També ha despertat força fascinació entre els estructuralistes l'elevat polimorfisme que presenta aquest motiu estructural. Actualment són molts els diferents grups de recerca d'arreu del món que treballen en aquest camp, intentant augmentar el coneixement estructural global d'aquestes estructures i estudiant la seva interacció amb diferents lligands. Fins ara tots aquests estudis s'han dut a terme amb oligonucleòtids lineals de seqüències molt variades, però majoritàriament provinents de seqüències telomèriques de diferents organismes. En aquest sentit, s'ha cregut interessant estudiar aquest motiu en oligonucleòtids cíclics, ja que presenten certs avantatges en l'estudi estructural de motius multicadena com a conseqüència de les restriccions conformacionals imposades pel fet de ser cíclics. Aquestes restriccions permeten una pre-organització espacial de les cadenes oligonucleotídiques i faciliten la formació del motiu estructural desitjat. Aquest fet, s'ha utilitzat per tal d'estudiar les propietats d'estructures multicadena, com ara tríplex. S'ha demostrat també que els oligonucleòtids cíclics poden formar estructures quàdruplex com ara el motiu *bi-loop*¹, difícil d'observar en oligonucleòtids lineals^{2,3}. En aquest motiu estructural, dos cicles interaccionen entre sí formant-se enllaços d'hidrogen intermoleculars (fig. 3.1).

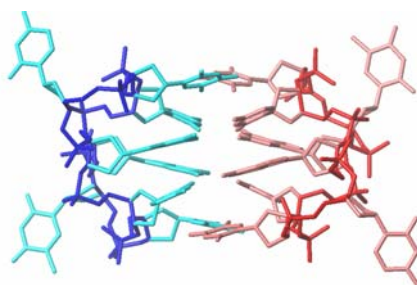


Figura 3.1 – Estructura quàdruplex que presenta en solució l'oligonucleòtid **d<pTGCTCGCT>**.

Dins d'aquest context s'ha cregut interessant estudiar el motiu estructural quàdruplex de G en oligonucleòtids cíclics, no només pel seu interès intrínsec, sinó també perquè podria servir com a model estructural per a l'estudi de la interacció dels derivats acridínics amb quàdruplex. Per això, el primer objectiu que es planteja en aquest capítol és el disseny de seqüències adequades per a l'estudi del motiu estructural en qüestió i la posterior obtenció dels oligonucleòtids cíclics dissenyats. Un cop obtinguts, el segon objectiu és la realització d'un estudi estructural per tal de determinar-ne l'estructura que presenten. Aquest estudi s'ha pensat en dur-lo a terme utilitzant les tècniques d'RMN d'alt camp, d'espectroscòpia UV i de dicromisme circular (DC). Finalment, un tercer objectiu que s'ha plantejat és estudiar per DC com es veu afectada l'estabilitat dels quàdruplex formats pels oligonucleòtids cíclics a l'interaccionar amb alguna de les acridines obtingudes anteriorment i descrites al capítol 1.

3.2 Síntesi d'oligonucleòtids cíclics rics en G

3.2.1 Mètodes de síntesi d'oligonucleòtids cíclics

Els mètodes de síntesi d'oligonucleòtids cíclics han evolucionat molt al llarg dels anys. Les primeres síntesis es van assolir ara fa uns 20 anys emprant el mètode del fosfat triester, tant per l'elongació de la cadena com per la seva posterior ciclació, tenint lloc totes les reaccions en dissolució⁴. Fou un avanç molt important la introducció de la fase sòlida primer⁵, i del mètode del fosfit triester posteriorment⁶. No obstant, les primeres síntesis en fase sòlida i utilitzant els fosforamidits com a reactius principals presentaven dues limitacions importants: restricció seqüencial i baix nivell de puresa del cru. Tots aquests problemes s'han pogut superar gràcies al mètode desenvolupat al nostre grup, el qual permet obtenir oligonucleòtids cíclics de mida petita i mitjana (2 a 30-mer) sense restricció de seqüència i amb rendiments moderadament bons⁷. El gran avantatge que presenta aquest mètode respecte als altres és que permet obtenir oligonucleòtids sense cap restricció seqüencial i que permet obtenir crus de desancoratge d'una puresa força elevada, cosa que facilita enormement la posterior

purificació del producte desitjat. Amb aquesta metodologia, a més a més, també és possible l'obtenció de molècules d'RNA cíclic^{8,9}.

Actualment, també s'utilitzen altres mètodes en els quals la ciclació té lloc en dissolució a través de reaccions químiques o enzimàtiques. Aquests es basen en l'ús d'un motlle que pre-estructura el precursor lineal de forma que els seus extrems s'aproximen en l'espai, facilitant-ne així la reacció de ciclació (*template assisted ligation*). En aquest sentit, s'ha descrit l'ús tant de motlles interns com externs, basats en estructures conegudes del DNA com ara dúplex¹⁰, tríplex¹¹, *i-motif*^{12,13} o quàdruplex de G^{14,15}. Algunes d'aquestes aproximacions es mostren esquematitzades a la figura 3.2.

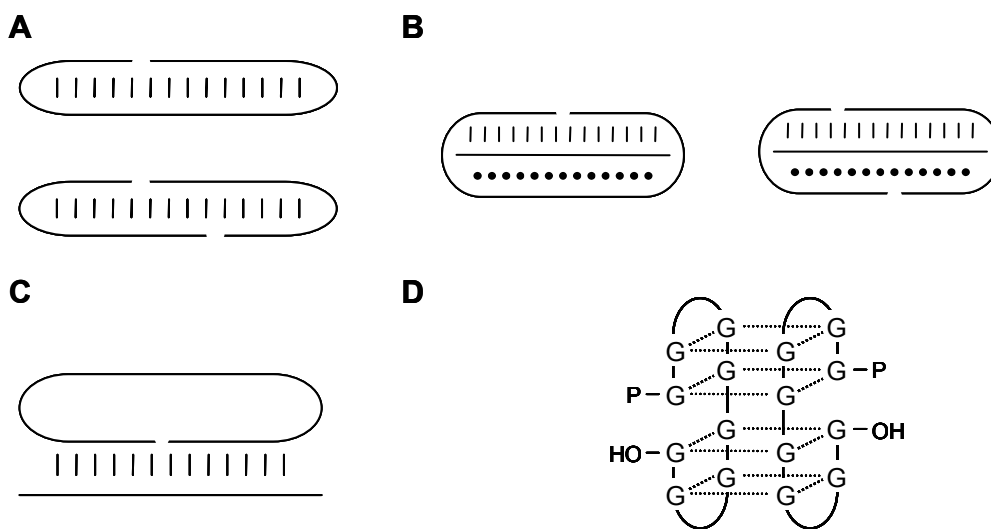


Figura 3.2 – Diferents estratègies de ciclació basades en l'ús de motlles del precursor lineal. Formació d'un dúplex intermolecular (A), presència d'un motlle extern que forma tríplex (B) o dúplex (C) i formació del motiu quàdruplex de G (D).

3.2.2 Disseny de les seqüències

Dins del context global del present treball, s'ha cregut convenient obtenir un oligonucleòtid que estigui format per repeticions de la seqüència telomèrica humana. Així doncs, i tenint en compte que es persegueix la formació d'estructures quàdruplex bimoleculares, aquest oligonucleòtid hauria d'estar format per 12 nucleòtids (2 repeticions telomèriques). Així, la seqüència que s'ha plantejat obtenir és **d<pTTAGGGTTAGGG>**, que podria formar l'estructura quàdruplex que es mostra esquematitzada a la figura 3.3. En aquesta, les guanines formarien tres tètredes, quedant les timines i adenines situades als *loops*. Tant la síntesi d'aquest oligonucleòtid com la seva determinació estructural, no obstant, poden presentar forces complicacions. La síntesi, degut a l'alt contingut en guanines, i l'elucidació estructural al gran nombre de nucleòtids que participen en l'estructura. És per això,

que paral·lelament a la síntesi del 12-mer, s'ha decidit abordar també la síntesi d'un altre oligonucleòtid cíclic ric en G, però més curt. Aquest és el 8-mer **d<pTTGGTTGG>**. En aquest cas, la síntesi hauria de presentar menys dificultats, així com també el seu estudi estructural per RMN, ja que en aquest cas el quàdruplex estarà format per *loops* més curts i només 2 tètades, tal i com es mostra a la figura 3.3.

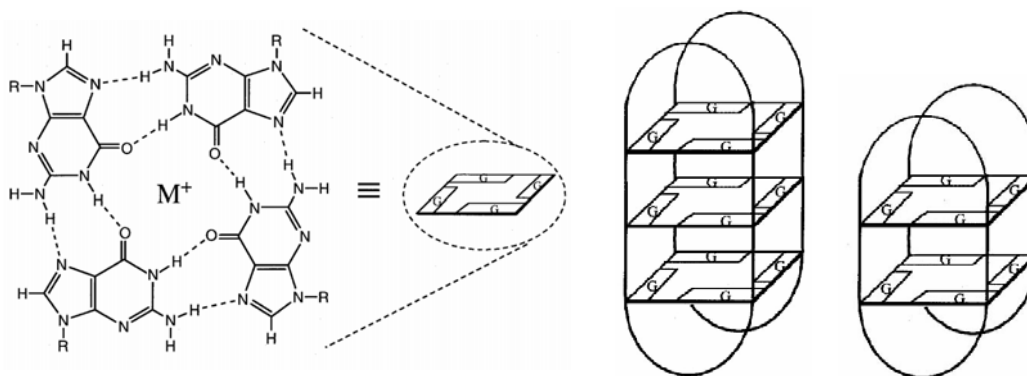


Figura 3.3 – Esquema de les estructures quàdruplex de G que poden formar **d<pTTAGGGTTAGGG>** i **d<pTTGGTTGG>**. M^+ simbolitza un catió metàl·lic.

Un cop dissenyades les seqüències a sintetitzar, s'ha hagut de decidir quins precursors lineals obtenir per tal de dur a terme la ciclació. En aquest sentit, les ciclacions en fase sòlida donen millors rendiments quan la reacció té lloc entre dues bases pirimidíniques que en qualsevol dels altres casos. Així doncs, s'ha decidit “tallar” els oligonucleòtids per un dels *loops*, i més concretament entremig de les dues timines consecutives. Així doncs, les dues oligonucleotidil resines que s'ha plantejat sintetitzar en fase sòlida són les que es mostren a la figura 3.4.



Figura 3.4 – Precursors lineals dels oligonucleòtids cíclics.

3.2.3 Obtenció dels oligonucleòtids **d<pTTGGTTGG>** i **d<pTTAGGGTTAGGG>**

La síntesi dels oligonucleòtids plantejats s'ha dut a terme segons el mètode desenvolupat al nostre grup¹⁶. Aquest es mostra esquematitzat a la següent figura:

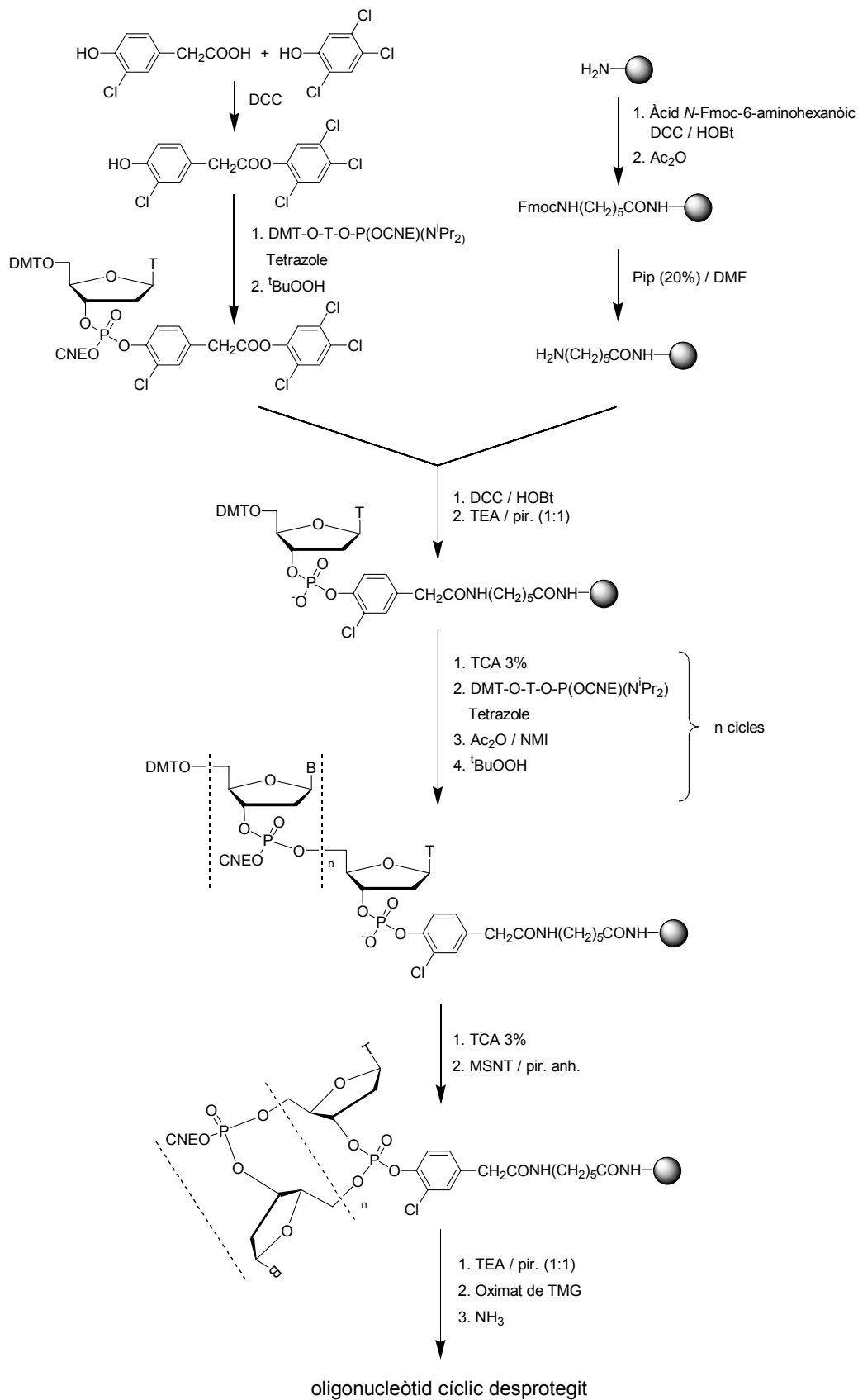


Figura 3.5 – Esquema sintètic d'obtenció d'oligonucleòtids cíclics .

3.2.3.1 Síntesi de la nucleotidil-resina

En primer lloc s'ha sintetitzat l'espaiador bifuncional fent reaccionar l'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic amb el 2,4,5-triclorofenol en presència de DCC com a agent acoblant (fig. 3.6). La reacció ha funcionat bé i s'ha obtingut el producte desitjat amb un rendiment del 66 %. Seguidament, la reacció d'aquest amb el fosforamidit de la T en presència de tetrazole, i la posterior oxidació del fosfit triester generat, han permès obtenir el nucleotidil-espaiador desitjat, a punt ja per ser ancorat a la resina. L'alta reactivitat d'aquest producte comporta la seva degradació en cas de realitzar una cromatografia en columna en gel de sílice, de manera que normalment no es du a terme cap purificació. S'ha comprovat la seva puresa mitjançant un espectre d'RMN de ^{31}P i s'ha observat que la principal impuresa que conté el cru de síntesi és l'hidrogenfosfonat que prové de la hidròlisi de part del fosforamidit que no ha reaccionat. Aquest producte no interfereix en el posterior acoblament i és per això que s'ha utilitzat sense cap etapa de purificació.

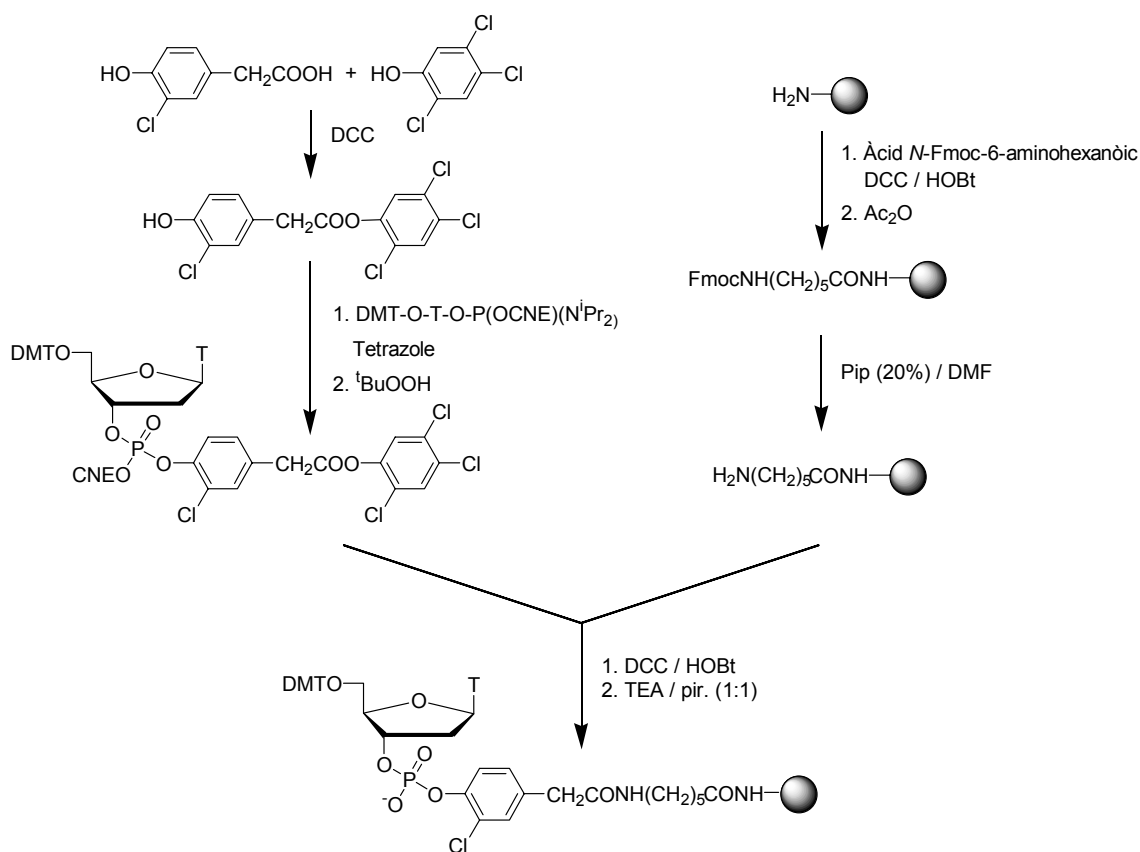


Figura 3.6 – Esquema de síntesi per a l'obtenció de la nucleotidil resina.

L'obtenció de la nucleotidil resina a partir de la qual se sintetitzaran els oligonucleòtids cíclics desitjats té lloc en dues etapes (fig. 3.6). El suport polimèric emprat ha estat la resina NH₂-TentaGel, un copolímer de polietilenglicol i poliestirè de funcionalització inicial al voltant de 240 μmol/g.

En primer lloc s'ha incorporat l'àcid *N*-Fmoc-6-aminohexanòic a la resina en presència de DCC i HOBt. La missió d'aquest aminoàcid és augmentar la flexibilitat de la resina i separar la cadena nucleotídica suficientment de la resina, de manera que l'impediment estèric en les etapes de ciclació i desancoratge sigui menor. Un cop incorporat l'aminoàcid s'ha calculat la nova funcionalització de la resina seguint el mètode estàndard de càlcul de funcionalització per a les Fmoc-resines (apartat D.2.1 de Materials i mètodes). S'ha obtingut un valor de 164 $\mu\text{mol/g}$, el qual s'ha considerat acceptable i s'ha procedit amb l'acetilació dels grups amino de la resina que no havien reaccionat. Seguidament, s'ha eliminat el grup Fmoc de l'àcid aminocapròic i s'ha realitzat l'acoblament del nucleotidil espaiador a la resina en presència de DCC i HOBt. S'ha tornat a calcular la nova funcionalització, aquest cop seguint el mètode estàndard de càlcul de funcionalització per a les DMT-resines (apartat D.2.2 de Materials i mètodes) i s'ha obtingut un valor de 104 $\mu\text{mol/g}$. Una funcionalització així es considera adequada per a la síntesi d'oligonucleòtids cíclics, de manera que s'ha continuat amb l'acetilació dels grups amino lliures que no han reaccionat. L'últim pas abans de començar la síntesi automàtica és la desprotecció del grup fosfat, que s'ha dut a terme tractant la resina amb pir./TEA (1:1) per tal d'eliminar el grup cianoetil. Un cop arribat en aquest punt, la resina ja està a punt per ser dipositada al reactor i començar la síntesi automàtica.

3.2.3.2 Elongació de la cadena nucleotídica i ciclació

La síntesi dels oligonucleòtids s'ha realitzat seguint les condicions experimentals desenvolupades en el nostre grup per a la síntesi d'oligonucleòtids sobre resina TentaGel. Com a diferències principals entre la síntesi sobre TentaGel i l'estàndard sobre boles de vidre (CPG) cal destacar sobretot que els temps emprats en els diferents tractaments són molt superior en el cas de la resina TentaGel. També cal destacar la incorporació de rentats amb DMF, absents en la síntesi estàndard sobre CPG. S'han realitzat dues síntesis de cada oligonucleòtid, en primer lloc a escala 2 μmol i posteriorment a escala 10 μmol . Les síntesis s'han realitzat tal i com s'explica a l'apartat C de Materials i mètodes, obtenint-se rendiments molt elevats en cada etapa d'acoblament (>97%) i sense observar-se canvis significatius entre les síntesis realitzades a diferent escala.

El següent pas, la ciclació, és l'etapa clau de la síntesi i té lloc mitjançant la reacció entre l'hidroxil de l'extrem 5' i el fosfat diester de l'extrem 3' (fig. 3.7). Aquesta s'ha dut a terme mitjançant tres tractaments de la oligonucleotidil-resina amb 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT), de tres hores cadascun. El mecanisme proposat per a aquesta reacció comença amb la formació d'un anhidrid mixt fosfòric-sulfònic, el qual pot evolucionar posteriorment de dues maneres diferents. D'una banda pot ser atacat directament pel grup hidroxil i formar-se el cicle desitjat (ruta a). Per altra banda, pot tenir lloc l'atac del triazole formant-se en primera instància un

fosfat activat que posteriorment és atacat per l'hidroxil produint la ciclació (ruta b). Ambdós mecanismes condueixen al mateix producte que és l'oligonucleòtid cíclic desitjat ancorat al suport sòlid.

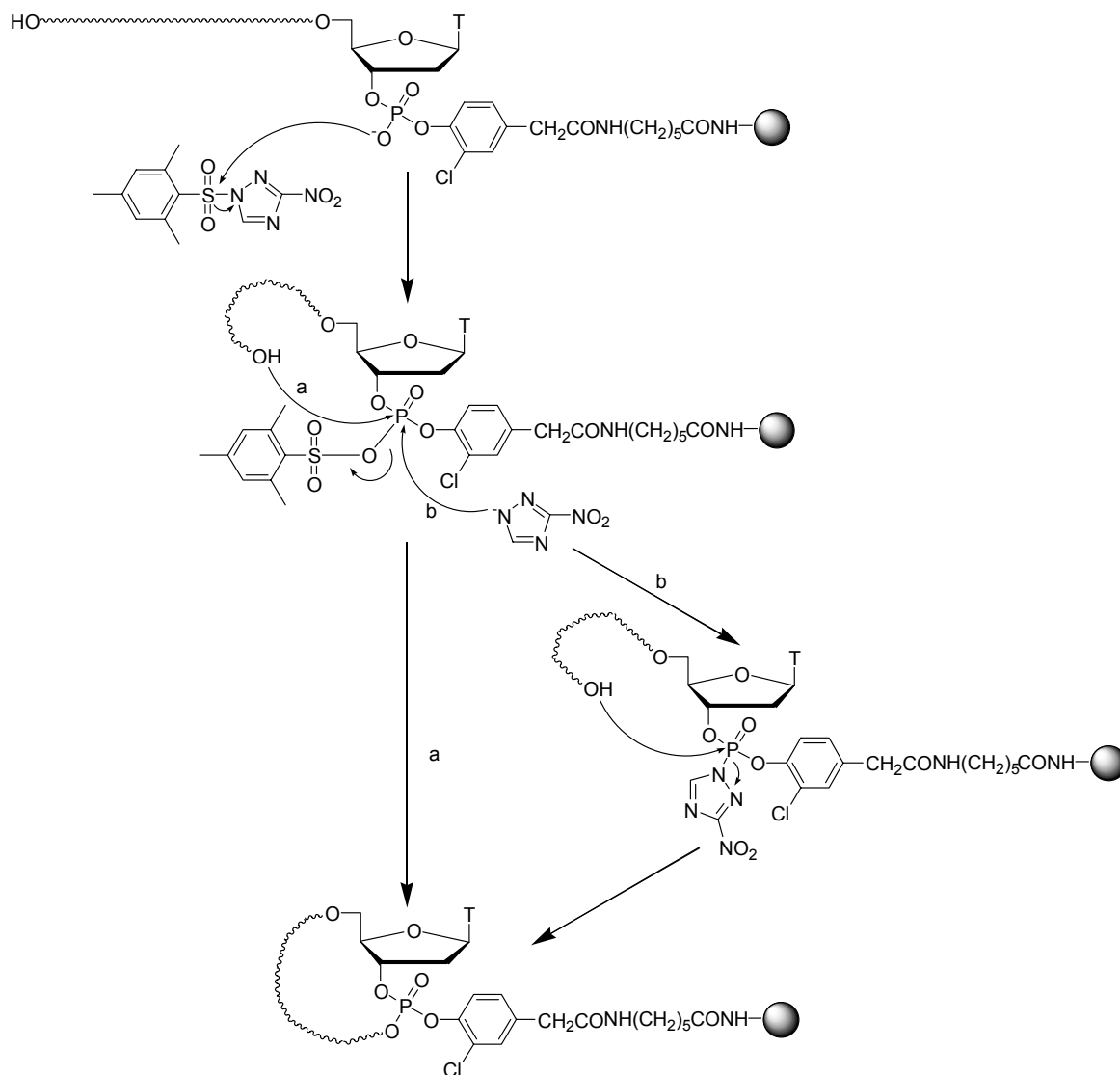


Figura 3.7 – Mecanismes proposats per a la reacció de ciclació de l'oligonucleòtid lineal amb MSNT.

3.2.3.3 Desprotecció, escissió i dessalatge del producte cíclic

Un cop ciclat l'oligonucleòtid, s'ha procedit amb l'eliminació dels grups cianoetils que fins ara han actuat com a protectors temporals dels grups fosfats. Aquest pas és força important, ja que la posterior escissió de l'oligonucleòtid cíclic es du a terme de manera selectiva, escindint-se només els fosfats triester. Així doncs, convé eliminar tots els grups cianoetils i que els únics fosfats triester que quedin a la nucleotidil resina siguin els que mantenen units els oligonucleòtids cíclics al suport sòlid. Aquesta desprotecció s'ha dut a terme mitjançant el tractament de la resina amb pir./TEA (1:1).

Posteriorment, s'ha dut a terme l'escissió de l'oligonucleòtid cíclic del suport polimèric mitjançant un tractament de la resina amb *syn*-piridin-2-aldoximat de 1,1,3,3-tetrametilguanidini¹⁷ (fig. 3.8). Aquest tractament permet un desancoratge selectiu dels productes cíclics, fet que es tradueix en l'obtenció de crus de desancoratge d'elevada puresa. Un cop realitzada l'escissió, el cru obtingut s'ha tractat amb NH₃ concentrat tota una nit a 55°C per tal de desprotegir les nucleobases i posteriorment s'ha dessalat mitjançant una cromatografia d'exclusió molecular Sephadex G-10.

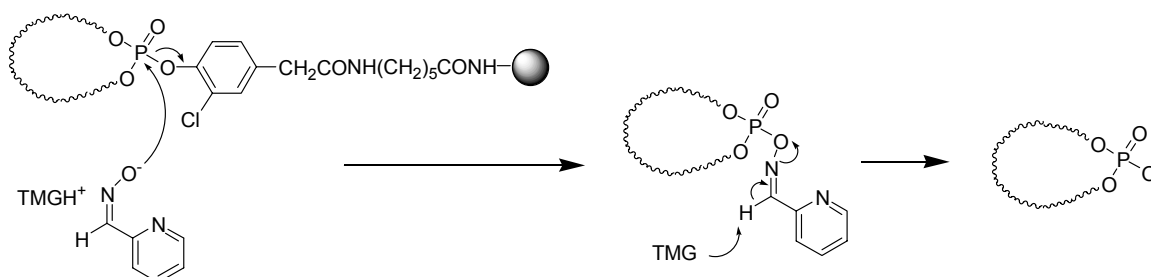


Figura 3.8 – Mecanisme proposat per a la reacció de desancoratge duta a terme amb oximat de TMG.

3.2.3.4 Anàlisi i purificació

Els oligonucleòtids obtinguts s'han quantificat per espectroscòpia UV, i un cop purificats s'han analitzat per HPLC i s'han caracteritzat per EM-MALDI-TOF i digestió enzimàtica amb fosfodiesterasa de verí de serp SVPD (*Snake Venum PhosphoDiesterase*).

El primer cru analitzat ha estat el de la síntesi a escala 2 μmol de **d<pTTGGTTGG>** i ha estat força desconcertant, ja que s'ha obtingut un cromatograma molt complex (fig. 3.9A).

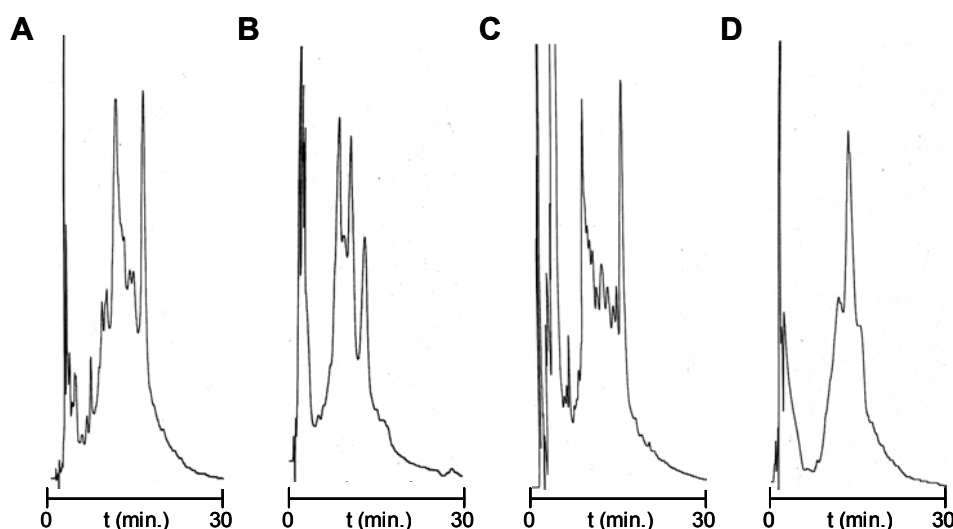


Figura 3.9 – Cromatogrames del cru de desancoratge de **d<pTTGGTTGG>** a temperatura ambient (A), a 66°C (B), a temperatura ambient amb presència de formamida (C) i de DMF (D). Gradient: 5-35% B en 30 min.; A: 10 mM NH₄OAc, B: ACN/H₂O (1:1).

Una de les característiques principals del mètode de síntesi utilitzat és justament l'obtenció de crus de desancoratge d'elevada puresa, amb la presència molt majoritària del producte desitjat. S'ha pensat doncs que l'obtenció d'un cromatograma tan brut i irreproducible podria ser degut a la presència de certa estructuració o d'agregacions inespecífiques per part de l'oligonucleòtid. Habitualment la síntesi d'oligonucleòtids rics en guanines sol presentar problemes d'aquest estil^{18,19}, però generalment no de tal magnitud. S'ha intentat solventar el problema escalfant la columna de cromatografia, i introduint formamida²⁰ o fins i tot DMF a la mostra (fig. 3.9B-D), però per bé que els perfils cromatogràfics han experimentat certes millores, no s'ha aconseguit trobar unes condicions en les quals fos possible la purificació.

S'ha decidit realitzar una electroforesi en gel de poliàcrilamida (PAGE) en condicions desnaturalitzants per tal de veure si realment el cru està tan brut com sembla, o si és que hi ha estructuració o agregacions inespecífiques. S'ha obtingut un gel analític on s'observa una banda força majoritària que correspon al producte desitjat (fig. 3.10A). Així doncs, es confirma que el que s'ha vingut observant a través de l'HPLC són majoritàriament artefactes produïts per estructuracions degudes, segurament, a l'alt contingut en guanines de l'oligonucleòtid.

Per tal de millorar l'anàlisi cromatogràfic dels productes s'ha provat de canviar el tampó utilitzat fins ara (NH_4OAc 10 mM) per acetat de trietilamoni (TEAAc 10 mM). Els cations NH_4^+ pot ser que afavoreixin l'estructuració de la mostra, ja que tenen una mida que els possibilita interaccionar favorablement amb moltes estructures, com ara els quàdruplex de G. El catió trietilamoni és de mida molt més gran i segurament minimitzarà aquesta estructuració.

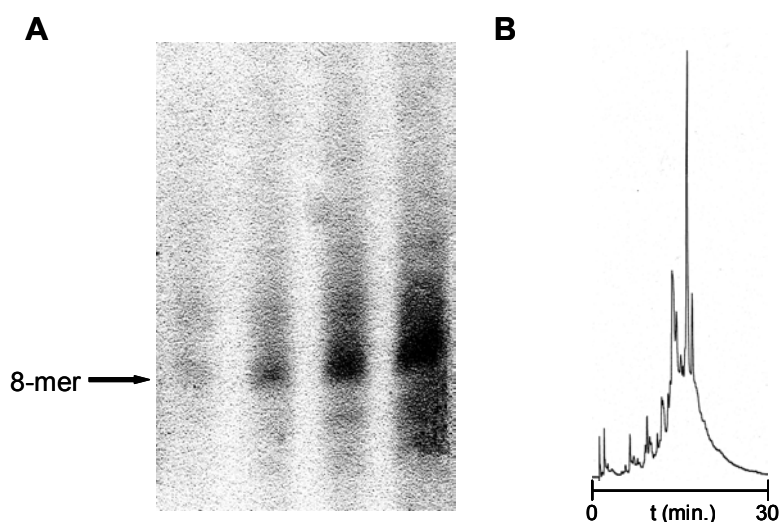


Figura 3.10 – Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliàcrilamida a escala analítica (A) i cromatograma d'HPLC (B) del cru de desancoratge de **d<pTTGGTTGG>**. Gradient: 5-35% B en 30 min.; A: 10 mM TEAAc, B: ACN/H₂O (1:1).

Com es pot observar a la figura 3.10B, en el cromatograma es posa de manifest la presència d'un producte majoritari, de forma similar a l'observat per electroforesi. S'ha decidit doncs, a partir d'ara realitzar totes les anàlisis per HPLC usant el tampó TEAAc 10 mM. De totes maneres, cal tenir en compte que la síntesi no ha funcionat com era d'esperar, ja que normalment els crus de desancoratge obtinguts mitjançant el mètode de síntesi emprat són molt més nets.

S'ha procedit amb la purificació mitjançant HPLC semipreparativa, així com també amb l'anàlisi de les altres síntesis realitzades. A la figura 3.11 es mostren els cromatogrames tant dels crus de desancoratge com dels productes purificats per a les síntesis realitzades a escala 10 μ mol, mentre que a la taula 3.1 es mostren les quantitats de producte obtingut, així com també els rendiments tant de síntesi com de purificació.

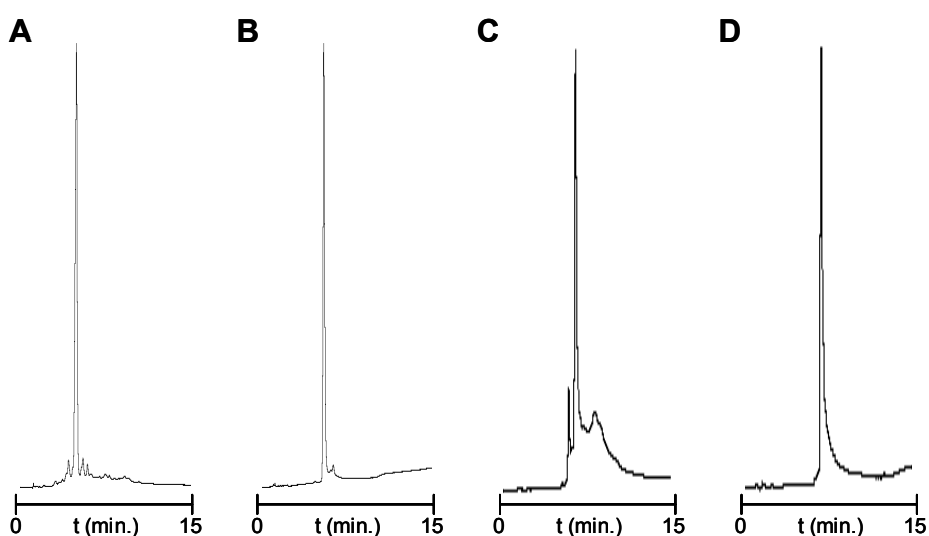


Figura 3.11 – Cromatogrames del cru de síntesi **d<pTTGGTTGG>** i **d<pTTAGGGTTAGGG>** (A i C), i dels mateixos oligonucleòtids purificats (B i D). Gradient: 5-35% B en 15 min.; A: 10 mM TEAAc, B: ACN/H₂O (1:1).

Seqüències i escala	Rdt. cru	Rdt. purificació	Rdt. global	Quantitat
d<pTTGGTTGG> (2 μ mol)	25%	10%	2.5%	10.0 OD
d<pTTGGTTGG> (10 μ mol)	17%	38.5%	6.5%	38.5 OD
d<pTTAGGGTTAGGG> (5 μ mol)	18%	13%	2.5%	14.2 OD
d<pTTAGGGTTAGGG> (10 μ mol)	25%	16%	4%	39.1 OD

Taula 3.1 – Rendiments de les síntesis dels oligonucleòtids **d<pTTGGTTGG>** i **d<pTTAGGGTTAGGG>**.

La caracterització dels oligonucleòtids obtinguts s'ha dut a terme per espectrometria de masses MALDI-TOF i per digestions enzimàtiques amb la SVPD (taula 3.2). Les digestions enzimàtiques permeten obtenir la constitució dels oligonucleòtids, a través de la relació existent entre els diferents nucleòtids que els formen.

Seqüències	(M-H) ⁻ obs.	(M-H) ⁻ calc.	dG:dT:dA obs.
d<pTTGGTTGG>	2530.59	2531.39	1.0:1.0:0.0
d<pTTAGGGTTAGGG>	3815.17	3815.16	3.2:1.9:1.0

Taula 3.2 – Caracterització dels oligonucleòtids cíclics per EM-MALDI-TOF i per digestió enzimàtica amb SVPD.

Finalment, un cop obtinguts els oligonucleòtids amb la puresa adequada s'ha dut a terme una cromatografia de bescanvi catiònic amb una resina Dowex per tal d'obtenir-ne la sal sòdica. Aquestes mostres serviran per dur a terme els estudis mitjançant RMN.

3.3 Estudi estructural dels oligonucleòtids d<pTTGGTTGG> i d<pTTAGGGTTAGGG>

Un cop obtinguts els oligonucleòtids desitjats amb la puresa adequada s'ha realitzat un estudi estructural d'ambdós utilitzant les tècniques d'UV, DC i RMN. Cadascuna de les diferents tècniques permet obtenir un tipus d'informació concreta i sovint complementària a l'obtinguda mitjançant les altres.

3.3.1 Tècniques emprades per a l'estudi estructural dels quàdruplex de G

3.3.1.1 Espectroscòpia ultravioleta

L'espectroscòpia ultravioleta (UV) és la tècnica més habitualment usada per a estudiar l'estabilitat d'estructures secundàries de DNA. L'experiment estàndard consisteix en tenir l'oligonucleòtid o oligonucleòtids en qüestió estructurats en un tampó i en unes condicions salines adequades, i llavors realitzar una desnaturalització tèrmica. L'estructuració de la mostra s'aconsegueix mitjançant un escalfament ràpid seguit d'un refredament tan lent com sigui possible, fins a arribar a una temperatura de 5°C. Llavors, després de mantenir aquesta temperatura uns minuts, s'escalfa la mostra gradualment (0.5°C/min.) a la vegada que es va enregistrant l'absorbància d'aquesta a 260 nm. El resultat de l'experiment és una corba de fusió de tipus sigmoïdal, a través de la qual és possible calcular la T_m (*melting temperature*), que representa la temperatura a la qual el 50% de la mostra es troba estructurada, mentre que l'altre 50% es troba fosa. La T_m és el paràmetre que s'utilitza per tal de comparar les estabilitats de diferents seqüències, o de la mateixa seqüència en diferents condicions experimentals.

En el cas d'estudiar l'estabilitat de quàdruplex de G s'ha descrit una modificació de l'experiment típic de fusió que consisteix en registrar l'absorbància de

la mostra a 295 nm enlloc de 260 nm²¹. Aquesta modificació condueix a l'obtenció de corbes de fusió de sentit invers a les obtingudes a 260 nm i ofereix certs avantatges:

- La variació d'absorbància de la transició és més important.
- La línia de base és més plana.
- L'espectrofotòmetre presenta una millor estabilitat i es minimitza l'aparició d'artefactes.

3.3.1.2 Dicroïsme circular

El dicroïsme circular (DC) és una tècnica espectroscòpica que es basa en fer interaccionar una molècula òpticament activa amb llum polaritzada, i llavors quantificar el canvi que es produeix en l'absorció de la llum polaritzada circularment a l'esquerra respecte a la llum polaritzada circularment a la dreta. Aquesta diferència ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{esquerra}} - \epsilon_{\text{dreta}}$) s'expressa en unitats de mil·lidegrees (mdeg), i és la magnitud que es mesura experimentalment. $\Delta\epsilon$ és directament proporcional a l'el·lipticitat (θ), i la seva dependència és:

$$\theta = 3300\Delta\epsilon$$

En els espectres de DC es representa la dependència de qualsevol d'aquestes dues magnituds (θ o $\Delta\epsilon$) respecte la longitud d'ona. També s'utilitza l'el·lipticitat molar ($[\theta]_{\lambda}$) que és l'el·lipticitat en la qual s'ha eliminat el factor dependent de la concentració de la mostra. L'el·lipticitat molar ($[\theta]_{\lambda}$) serveix, doncs, per comparar espectres realitzats a concentracions diferents, i s'obté a mitjançant la següent fórmula:

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta}{10 \cdot l \cdot c}$$

on θ és l'el·lipticitat expressada en graus, l és el camí òptic expressat en centímetres i c és la concentració molar de la mostra.

El dicroïsme circular s'usa mol freqüentment en l'estudi estructural dels àcids nuclèics ja que és una tècnica molt sensible als canvis conformacionals. No obstant, i a diferència d'altres tècniques, la informació estructural que proporciona el DC prové principalment de la comparació amb altres espectres de referència d'estructures ja conegudes. D'aquesta manera existeixen patrons o perfils característics per moltes de les diferents estructures secundàries que pot presentar el DNA. Aquesta tècnica, a més a més, permet realitzar també experiments de fusió. Així doncs, no només s'empra el DC per tal d'obtenir informació purament estructural, sinó també per obtenir informació sobre l'estabilitat d'una estructura concreta, o per analitzar estabilitzacions o desestabilitzacions produïdes per interaccions entre àcids nuclèics i certs lligands.

Totes aquestes característiques s'han d'unir al fet de ser una tècnica força sensible i relativament ràpida.

En l'estudi estructural dels quàdruplex de G, el DC ha estat una tècnica molt usada i bàsicament permet diferenciar els quàdruplex paral·lels dels antiparal·lels, ja que cadascun d'aquests tipus de quàdruplex presenta un espectre característic^{22,23}. Els quàdruplex paral·lels (fig. 3.12A) presenten un màxim d'el·lipticitat al voltant de 260 nm i un mínim al voltant de 240 nm²⁴. Per la seva banda, els antiparal·lels (fig. 3.12B) presenten un espectre on apareix un màxim que se situa entre 285 i 295 nm, un mínim al voltant de 265 nm, i un altre màxim d'intensitat menor al voltant de 250 nm.

Poder assignar un tipus d'espectre de DC a una estructura secundària en concret és possible gràcies als estudis realitzats en els quals s'han enregistrat espectres de DC d'oligonucleòtids, l'estructura dels quals ha estat prèviament resolta bé per raigs X o bé per RMN²⁵. Aquests estudis, no obstant, impliquen fer una important extrapolació, ja que les condicions experimentals en les quals ha estat resolta una estructura en particular mai són les mateixes.

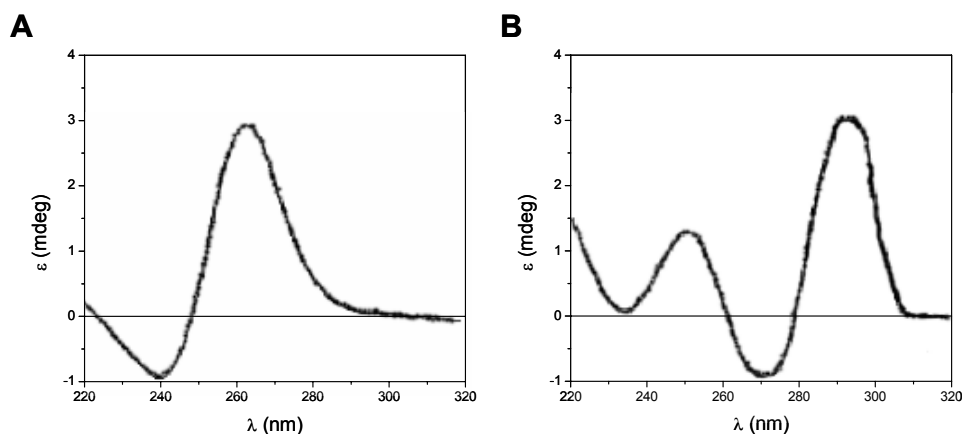


Figura 3.12 – Perfils típics dels espectres de DC per a quàdruplex paral·lels (A) i antiparal·lels (B).

3.3.1.3 Ressonància magnètica nuclear

La ressonància magnètica nuclear (RMN) ha esdevingut en els últims anys una de les tècniques més usades en l'elucidació estructural d'àcids nuclèics. El grau de detall que proporciona aquesta tècnica és força similar a l'obtingut a través d'experiments de difracció de Raigs X de cristalls. No obstant, l'RMN presenta dos avantatges respecte aquesta darrera:

- Proporciona informació de l'estructura que adopta la molècula estudiada en dissolució.
- Proporciona informació dinàmica.

En el cas dels raigs X, les estructures obtingudes sovint es poden trobar distorcionades com a conseqüència de les forces d'empaquetament cristal·lines. Això

no succeeix en l'estudi per RMN, de manera que es pot estudiar la molècula en la seva conformació nativa o almenys en un entorn molt més semblant al fisiològic. Per altra banda, és important la possibilitat que ofereix l'RMN d'obtenir informació dinàmica, ja que els àcids nuclèics solen presentar regions d'elevada flexibilitat. Aquesta informació no és possible obtenir-la mitjançant un estudi cristal·logràfic.

L'RMN ha experimentat certs avenços tècnics en els últims anys que l'han convertit en una tècnica encara més potent. En aquest sentit cal destacar l'ús d'imants superconductors d'alt camp que corresponen a una freqüència de ressonància de 800-900 MHz pel ^1H , la introducció de l'espectroscòpia multidimensional, i finalment els avenços en el marcatge isotòpic de les molècules de DNA. Referent a aquest últim punt, convé remarcar que per a l'elucidació estructural de molècules de DNA de mida petita, el marcatge isotòpic no sempre resulta imprescindible, ja que en la majoria dels casos és possible determinar-ne l'estructura utilitzant molècules no marcades.

3.3.1.3.1 Experiments bidimensionals

Per a la determinació estructural d'àcids nuclèics resulta imprescindible l'ús d'experiments d'RMN bidimensional. Amb aquests experiments s'aconsegueix solventar el problema de l'elevat grau de solapament que existeix en els espectres monodimensionals de molècules de DNA, el qual sovint en dificulta enormement o bé n'impossibilita les anàlisis. En el present treball s'han realitzat bàsicament experiments COSY i NOESY, tot i que també resulten força habituals altres experiments com ara TOCSY o ROESY. Depenent del tipus concret d'experiment bidimensional, no només és possible eliminar parcialment el solapament, sinó que és també possible obtenir molta informació addicional.

Les senyals de correlació observades en un espectre COSY (COrelated Spectroscopy) connecten protons que es troben acoblats escalarment, ja que la transferència de magnetització es produeix a través dels electrons implicats en els diferents enllaços. La seqüència de polsos de l'experiment COSY es mostra a la figura 3.13 i consisteix en dos polsos de 90° separats per un temps t_1 . L'adquisició té lloc després del segon pols, durant el temps t_2 .

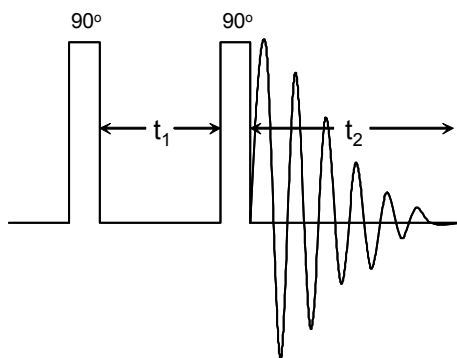


Figura 3.13 – Esquema de la seqüència de polsos d'un experiment COSY.

L'experiment NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) està basat en l'efecte nuclear Overhauser (NOE), el qual està relacionat amb mecanismes de relaxació nuclear creuada. Aquest efecte depèn de la interacció entre dipòls magnètics i és molt sensible a la distància a la que es troben aquests. Així doncs, les senyals de correlació observades en un espectre NOESY connecten protons que es troben pròxims a l'espai, amb independència de que es trobin o no acoblats escalament, ja que la transferència de magnetització té lloc entre nuclis acoblats dipolarment.

La seqüència de polsos de l'experiment NOESY es mostra a la figura 3.14 i consisteix, en primer lloc, en un pols de 90° , el qual genera magnetització transversal que evoluciona lliurement durant el temps t_1 . A continuació té lloc un segon pols de 90° que converteix una de les components de la magnetització existent en magnetització longitudinal de no equilibri. Durant el temps de mescla τ_m , el sistema intenta tornar a l'equilibri mitjançant el procés de relaxació dipolar, tenint lloc una transferència de magnetització entre nuclis acoblats dipolarment, és a dir, pròxims a l'espai. Finalment, i després d'un tercer pols té lloc l'adquisició durant el temps t_2 .

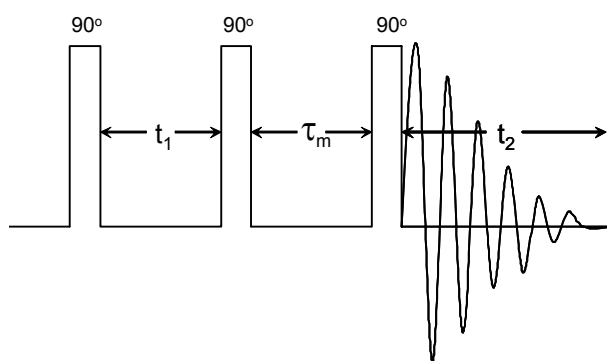


Figura 3.14 – Esquema de la seqüència de polsos d'un experiment NOESY.

3.3.1.3.2 Assignació de l'espectre

El primer pas en la realització d'un estudi estructural d'una molècula de DNA és l'obtenció d'un espectre monodimensional. Amb aquest és impossible realitzar l'assignació, però sí que de vegades és possible extreure alguna informació estructural, com ara saber la molecularitat de l'estructura o detectar la presència de parells Watson-Crick, Hoogsteen o fins i tot d'estructures quàdruplex.

Un cop realitzada aquesta anàlisi preliminar, es procedeix amb l'assignació dels espectres obtinguts. Com s'ha comentat anteriorment, per a dur a terme l'assignació es treballa amb espectres bidimensionals, ja que en els monodimensionals existeix molt solapament degut al fet que les molècules de DNA estan formades per només 4 nucleòtids diferents, i això implica que hi hagi moltes repeticions d'aquests en pràcticament qualsevol seqüència. L'estratègia que cal seguir per a l'assignació d'un espectre consta de tres etapes.

En primer lloc cal fixar-se en els protons no bescanviables (fig. 3.15A) i identificar tots els sistemes d'spin, la qual cosa es du a terme a partir dels experiments

d'acoblament escalar, com ara el COSY. Així s'identifiquen els nuclis que corresponen al mateix nucleòtid seguint els pics de correlació entre els protons $H_{Ar}-H_{1'}$, $H_{1'}/H_{2'}/H_{2''}$, $H_{2'}/H_{2''}-H_{3'}$, $H_{3'}/H_{4'}$ i $H_{4'}/H_{5'}/H_{5''}$. D'aquesta manera és possible identificar inequívocament els sistemes de timina i citosina, ja que per la timina s'observa un pic de correlació entre el H_6 i el grup metil, mentre que per la citosina s'observa un pic de correlació entre els protons H_5 i H_6 de l'anell pirimidínic. Els residus de guanina i adenina, generalment no es poden diferenciar en aquesta primera etapa, excepte els residus de guanina en conformació *syn*, els quals són fàcilment detectables degut a la presència d'un fort NOE intraresidual entre H_8 i $H_{1'}$.

Un cop identificats els sistemes d'spin, es realitza l'assignació seqüencial. Aquesta es du a terme a partir dels pics de correlació que s'observen entre protons de nucleòtids contigus en la seqüència obtinguts en l'espectre NOESY. Mentre que per estructures dúplex els pics de correlació que s'observen presenten un patró força similars ($B_n H_{1'}/B_{n+1} H_{Ar}$ i $B_n H_{2'}/H_{2''}/B_{n+1} H_{Ar}$), en el cas dels quàdruplex s'observen pics diferents depenent de si les guanines es troben en conformació *syn* (sG) o *anti* (aG) en cada pas. En total, com que hi ha 4 tipus de passos diferents, hi ha quatre patrons de pics de correlació observats diferents:

- aG – aG: $G_n H_{1'}/G_{n+1} H_8$ i $G_n H_{2'}/H_{2''}/G_{n+1} H_8$.
- sG – aG: $G_n H_{1'}/G_{n+1} H_8$, $G_n H_{2'}/H_{2''}/G_{n+1} H_8$, $G_n H_8/G_{n+1} H_8$, $G_n H_8/G_{n+1} H_{2'}/H_{2''}$.
- sG – sG: $G_n H_8/G_{n+1} H_{1'}$, $G_n H_8/G_{n+1} H_{sucre}$.
- aG – sG: no s'observen NOEs seqüencials.

Posteriorment, la tercera i última etapa consisteix en l'assignació dels protons bescanviables (fig. 3.15B). Aquesta es du a terme a través dels NOEs entre protons bescanviables i protons no bescanviables, i dels NOEs intercadena amino-imino i imino-imino, que s'observen entre les guanines de cada tètrada i entre guanines situades en diferents tètades. En quàdruplex de G, l'assignació completa dels espectres sol ser força més difícil que en altres estructures degut sovint a la manca de NOEs entre protons bescanviables i protons no bescanviables.

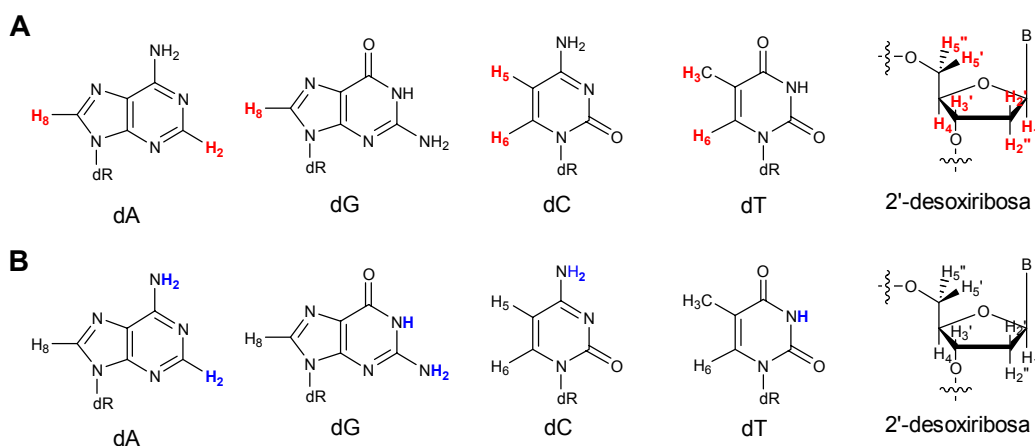


Figura 3.15 – Protons no bescanviables (A) i bescanviables (B) de cadascuna de les diferents nucleobases i de l'anell de 2'-desoxiribosa.

3.3.1.3.3 Informació estructural

Un cop ha estat completament assignat l'espectre d'RMN d'un oligonucleòtid, el següent pas a seguir és extreure'n la informació necessària per tal de poder determinar-ne l'estructura tridimensional. En aquest sentit, la informació més valuosa prové de les restriccions de distàncies interprotòniques derivades dels pics de correlació dipolar (NOEs). Aquesta es complementa amb les restriccions angulars derivades de l'anàlisi de les constants d'acoblament escalar a tres enllaços, obtingudes mitjançant els experiments COSY.

Un cop obtingudes aquestes restriccions ja és possible iniciar un càlcul per tal d'obtenir l'estructura que presenta l'oligonucleòtid en qüestió. La determinació de l'estructura consisteix en obtenir unes coordenades atòmiques compatibles amb les restriccions experimentals de distàncies interprotòniques i angles diedres. En realitat, no es tracta de trobar l'estructura que millor compleixi les restriccions experimentals, sinó tot un conjunt d'estructures compatible amb tota la informació experimental obtinguda i que constitueixi una mostra representativa de tot l'espai conformacional. És per aquest motiu, que les estructures determinades per RMN, sovint es mostren com una superposició de diverses conformacions.

Per tal d'obtenir aquestes estructures existeix una gran varietat de metodologies de càlcul, les quals es classifiquen, en funció de l'aproximació matemàtica que utilitzen, en diversos grups: mètodes de geometria de distàncies, mètodes de minimització de funció blanc, i mètode de dinàmica molecular restringida (RMD). Aquest darrer és el mètode més usat actualment i consisteix en integrar numèricament les equacions de Newton d'un sistema de partícules. El principal avantatge d'aquest mètode respecte els altres radica en la capacitat no només d'explorar tot l'espai conformacional, sinó també de superar mínims locals.

3.3.2 Estudi estructural de d<pTTGGTTGG>

3.3.2.1 Estudi d'estabilitat tèrmica per UV

En primer lloc s'han realitzat experiments de desnaturalització tèrmica per UV, ja que a part de ser la tècnica més accessible, permet obtenir informació valuosa sobre l'estabilitat de l'estructura formada. Els experiments s'han realitzat en presència del catió potassi, ja que aquest és que generalment estabilitza més els quàdruplex de G. S'han realitzat fusions a dues longituds d'ona diferents: 260 i 295 nm. Els resultats es mostren a la següent figura:

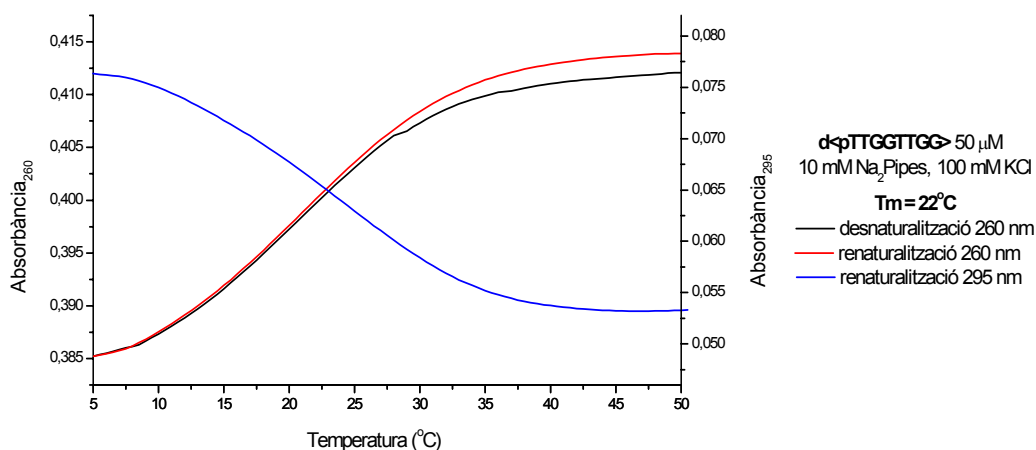


Figura 3.16 – Corbes de fusió i renaturalització de **d<pTTGGTTGG>** realitzades per absorció UV.

Es pot observar un canvi clar en ambdues longituds d'ona, presentant perfils inversos en cadascuna d'elles, i amb una T_m d'uns 22°C. Aquest fet ens indica que l'oligonucleòtid **d<pTTGGTTGG>** es troba estructurat a temperatures baixes, i sembla que podria tractar-se d'algun tipus de quàdruplex de G. No obstant, l'estructura és poc estable a aquesta concentració, ja que a 40°C pràcticament ens trobem amb l'oligonucleòtid desestructurat.

3.3.2.2 Estudi mitjançant DC

Els primers espectres de DC s'han realitzat en les mateixes condicions que l'estudi previ d'UV (100 mM KCl), per tal de veure si realment l'estructura formada és del tipus quàdruplex de G. S'han enregistrat dos espectres: un a 5°C i un altre a 85°C (fig. 3.17A).

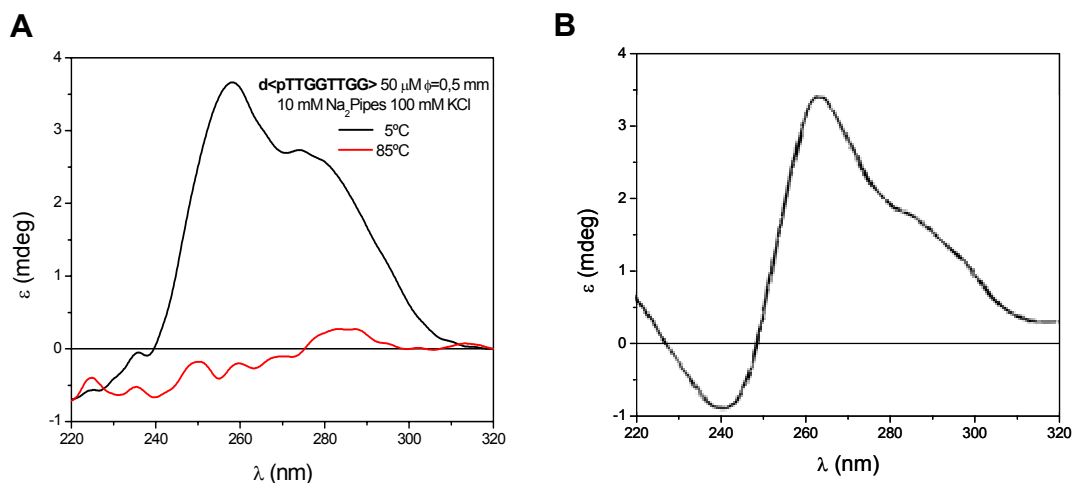


Figura 3.17 – Espectres de DC de **d<pTTGGTTGG>** a diferents temperatures (A) de l'oligonucleòtid **d[GGGG(TTTGGGG)₃]** en presència de K⁺ (B).

Com es pot observar, l'espectre obtingut a baixa temperatura no correspon a cap perfil típic de quàdruplex de G (fig.3.12), ja que presenta un màxim a 258 nm, i

una esquena amb un màxim poc definit al voltant de 274 nm. Aquest resultat és certament força desconcertant. Tanmateix, s'ha trobat descrit a la bibliografia un espectre de perfil molt similar però amb el màxim i l'esquena desplaçats a longituds d'ona sensiblement més elevades (265 i 285 nm respectivament)²⁶. Aquest espectre correspon a l'oligonucleòtid **d[GGGG(TTTTGGGG)₃]** en presència de K⁺ i s'ha interpretat com una mescla entre quàdruplex paral·lel i antiparal·lel. En el nostre cas, però, costa admetre aquesta possibilitat, ja que en principi si el quàdruplex és bimolecular, la presència d'un quàdruplex paral·lel és pràcticament impossible.

Per tal d'obtenir més informació sobre l'estructura que presenta **d<pTTGGTTGG>**, s'ha cregut interessant realitzar espectres a diferents concentracions d'oligonucleòtid, així com també en diferents condicions salines. S'han enregistrat espectres a concentracions 5, 10 i 50 μM d'oligonucleòtid en H₂O, en tampó Na₂Pipes 10 mM i en presència de NaCl 100 mM o KCl 100 mM. Aquests espectres es mostren a la següent figura:

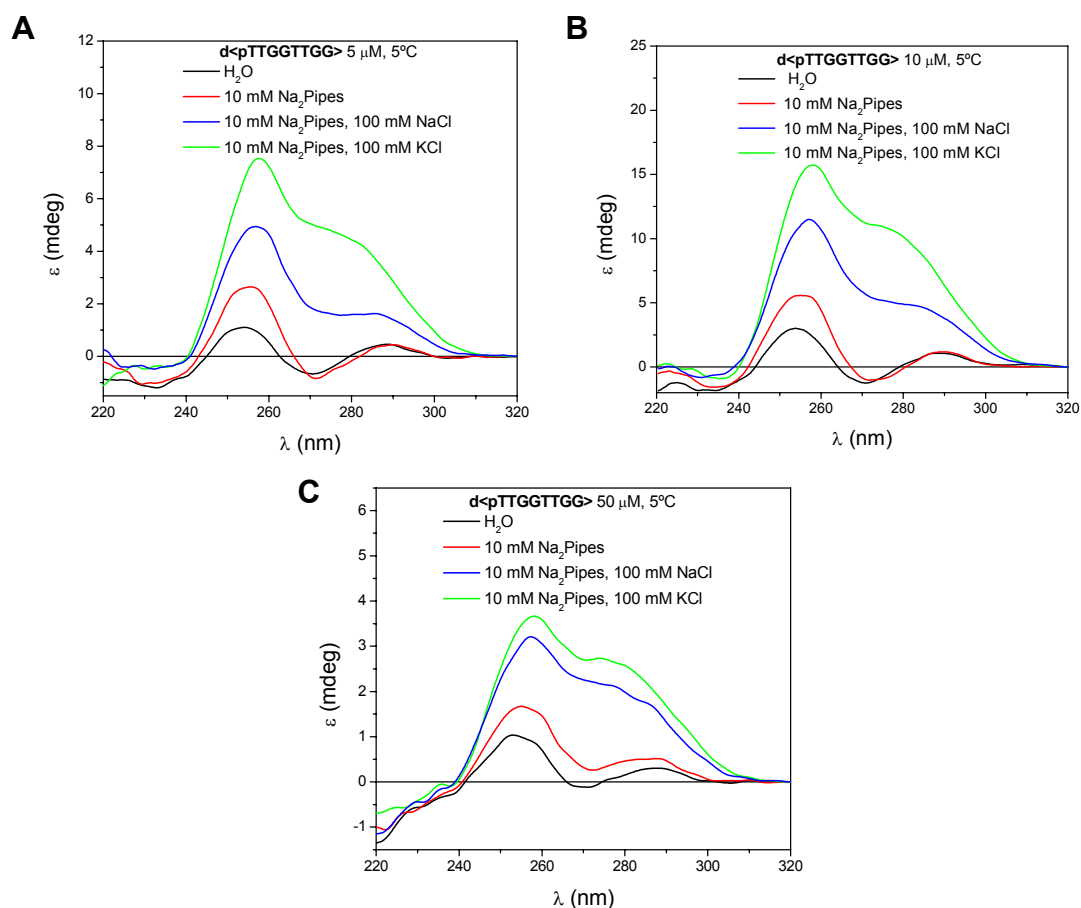


Figura 3.18 – Espectres de DC en diferents condicions salines de **d<pTTGGTTGG>** a 5 μM (A), 10 μM (B) i 50 μM (C).

Com es pot observar, per a cada concentració assajada el nivell d'estructuració augmenta segons el medi de la següent forma: H₂O < Pipes < Na⁺ < K⁺. En H₂O pràcticament no s'observa estructuració, mentre que en tampó Pipes sembla haver-n'hi ja una mica. No obstant, tant en presència de Na⁺ com de K⁺ l'el·lipticitat augmenta

de forma considerable i el perfil varia substancialment. Convé destacar que, mentre que a concentració 5 i 10 μM d'oligonucleòtid la diferència d'estructuració entre les mostres amb Na^+ i amb K^+ és notable, a 50 μM , els espectres en ambdues condicions salines són força semblants. Així doncs, la discriminació entre els diferents cations és més elevada en condicions de baixa concentració d'oligonucleòtid. Aquesta observació es podria relacionar d'alguna manera amb el fet que l'estructura formada no fos monomèrica sinó que impliqués almenys dues molècules. Així, com més baixa és la concentració d'oligonucleòtid, més difícil resulta l'estructuració d'aquest, i és per això, que la presència de ions és més decisiva en la formació de l'estructura. En canvi, a concentracions més elevades d'oligonucleòtid, l'estructuració ja està més afavorida i els cations no juguen un paper tan important. De totes maneres, i per tal de sortir de dubtes sobre la molecularitat de l'estructura, s'han tractat les dades obtingudes per tal d'obtenir espectres d'el·lipticitat molar respecte longitud d'ona. Al tractar-se d'el·lipticitat molar, el factor de la concentració d'oligonucleòtid queda corregit, de manera que els espectres enregistrats a concentracions diferents d'oligonucleòtid passen a ser del tot comparables entre ells (fig. 3.19).

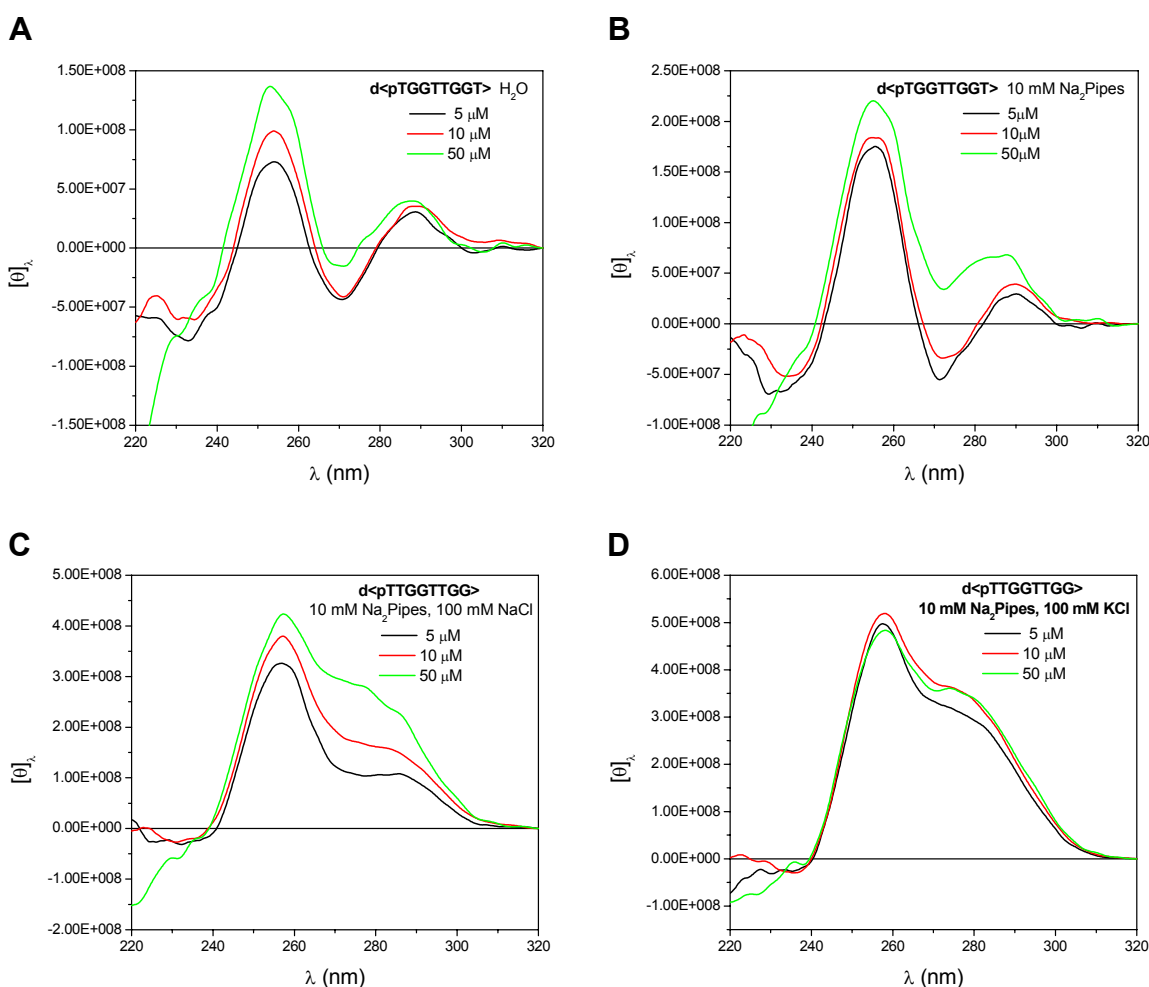


Figura 3.19 – Espectres de DC on es mostren les el·lipticitats molars per a cada concentració de $d\langle pTTGGTTGG \rangle$ en H_2O (A), en tampó Pipes (B), en presència de 100 mM NaCl (C) i 100 mM KCl (D).

A la vista d'aquests espectres (fig. 3.19), es pot concloure que l'oligonucleòtid en qüestió forma una estructura multimèrica, ja que per a cadascuna de les condicions salines assajades, com més concentrada és la mostra, més elevada és l'el·lipticitat, o sigui l'oligonucleòtid presenta un grau d'estructuració més elevat. Convé remarcar, no obstant, que en presència de K^+ aquesta diferència és molt menor que en les altres condicions assajades, esdevenint pràcticament inexistent. És a dir, es constata que la presència d'aquest catió afavoreix molt l'estructuració, ja que en aquestes condicions desapareix l'efecte dependent de la concentració d'oligonucleòtid.

Els resultats obtinguts tant per UV com per DC permeten concloure que l'oligonucleòtid **d<pTTGGTTGG>** presenta estructuració a baixa temperatura (5°C). El perfil obtingut per DC, però, no és assimilable a cap dels descrits a la literatura com a quàdruplex de G (paral·lels o antiparal·lels). S'ha observat que el grau d'estructuració presenta una dependència amb la concentració i que mostra una discriminació entre els diferents cations assajats. En aquest sentit, l'estructuració és afavorida per la presència del catió K^+ , característica típica dels quàdruplex. Així doncs, segurament ens trobem davant una mescla de diverses estructures, on almenys alguna, però potser totes són multimèriques, alguna de les quals podria ser un quàdruplex de G.

3.3.2.3 Estudi mitjançant RMN

Un cop realitzats els estudis preliminars mitjançant les tècniques d'UV i DC, s'ha realitzat un estudi per RMN per tal de poder aclarir certs aspectes de l'estructura (o estructures) que forma l'oligonucleòtid **d<pTTGGTTGG>**. En aquest sentit, en primer lloc s'ha enregistrat un espectre monodimensional de 1H en H_2O i en presència de catió sodi (fig. 3.20).

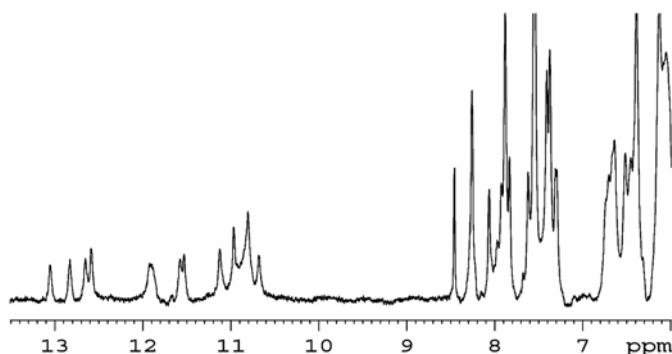


Figura 3.20 – Fragment de l'espectre d'RMN de 1H monodimensional de **d<pTTGGTTGG>** enregistrat en H_2O a una concentració de 0.21 mM en presència de Na^+ 108 mM.

Fixant-se en la zona de l'espectre que va de 6 a 14 ppm, s'observen diversos grups de senyals. Les senyals que apareixen entre 6 i 7 ppm corresponen als protons H_1' de les desoxiriboses, mentre que els que apareixen entre 7 i 9 corresponen als protons aromàtics de les diferents nucleobases. En aquest cas es tracta dels H_6 de les timines i dels H_8 de les guanines. A partir de 9 ppm, solen aparèixer els protons dels

grups imino, els quals presenten desplaçaments sensiblement diferents en funció de l'estructura secundària que presenta la molècula. En el cas dels quàdruplex de G, aquestes senyals es troben entre 10 i 12 ppm. Així doncs, en aquest espectre s'observen algunes senyals típiques de quàdruplex, per bé que també s'observen senyals a camps més baixos, al voltant de 13 ppm. Aquesta és la zona típica de parells de bases que es troben formant enllaços d'hidrogen tipus Watson-Crick. En el nostre cas, però, això no és possible, ja que l'oligonucleòtid només conté G i T.

A continuació, s'ha decidit enregistrar espectres monodimensionals a diferents concentracions d'oligonucleòtid, per tal de veure com afecta aquest paràmetre a l'estructuració de la mostra. El que s'ha observat, és que hi ha algunes senyals que varien substancialment d'intensitat amb la concentració (fig. 3.21), fet que referma la idea apuntada anteriorment que realment hi ha més d'una estructura en solució.

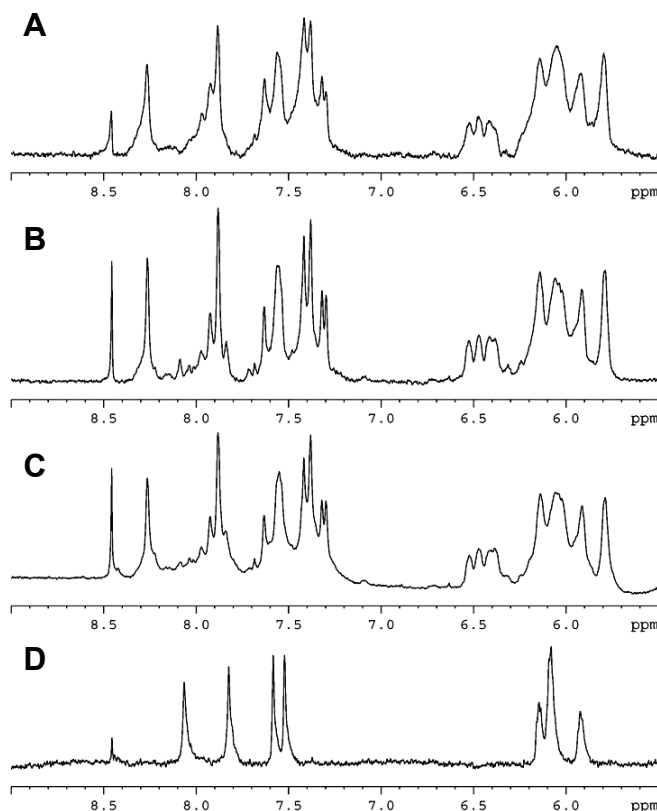


Figura 3.21 – Fragments dels espectres d'RMN de ^1H de $d\langle p\text{TTGGTTGG} \rangle$ enregistrats a les concentracions de 2 mM (A), 1 mM (B), 0.5 mM (C) i 0.05 mM (D) en presència de Na^+ 25 mM.

Un cop analitzats els espectres monodimensionals, s'ha passat a enregistrar espectres bidimensionals COSY i NOESY, tant en D_2O com en H_2O . Un cop processats els espectres, el primer que cal destacar és la presència de nombrosos pics en el NOESY, cosa que posa de manifest que l'oligonucleòtid presenta força estructuració. El que s'observa també d'entrada, no obstant, és l'existència d'un gran solapament en totes les zones de l'espectre, cosa que segurament en dificultarà

l'assignació. Aquest solapament es posa de manifest a la figura 3.22, on s'observa una distribució de pics molt simètrica.

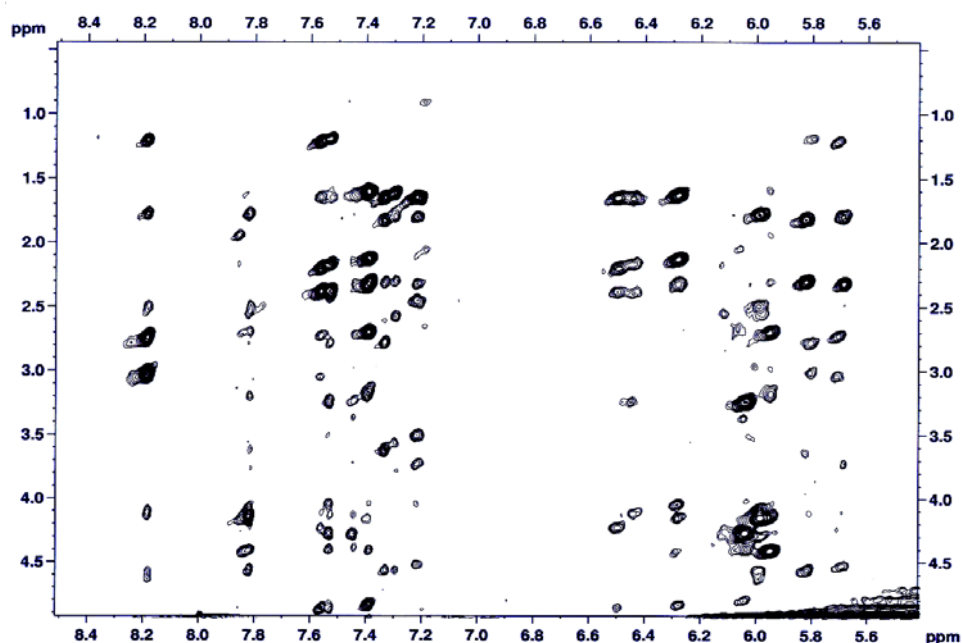


Figura 3.22 – Zona de l'espectre NOESY de $d\langle pTTGGTTGG \rangle$ enregistrat en D_2O a una concentració d'1 mM en presència de Na^+ 108 mM, a $5^\circ C$ i amb un τ_m de 200 ms, on apareixen els pics de correlació entre $H_{Ar}-H_{1'}$ i $H_{Ar}-H_{2'/2''}$.

A partir d'aquí, el primer pas ha estat intentar identificar el nombre de sistemes d'spin que formen l'espectre. En aquest cas, s'ha treballat tant amb els espectres COSY com amb els NOESY realitzats en D_2O , i s'han detectat entre 10 i 12 sistemes d'spin diferents, d'entre els quals 6 pertanyen a timines. L'assignació de les T és ràpida i inequívoca a partir de l'espectre COSY, ja que aquestes presenten un pic de correlació característic entre el metil i el protó $H_{1'}$ de la desoxiribosa. Així, sembla clar que el nombre exacte de sistemes d'spins és 12, distribuïts de la següent manera: 6T i 6G. El fet de presentar-ne 12 indica que com a mínim hi ha dues estructures en equilibri, ja que si només n'hi hagués una, el nombre total de sistemes d'spins seria 4, 8 o 16, en funció de la simetria de l'estructura.

Una altra evidència de l'espectre NOESY que referma l'existència de més d'una estructura en dissolució, és la presència de molts pics d'intercanvi. Aquests apareixen prop de la diagonal i correlacionen les senyals d'un mateix nucli en cadascuna de les diferents estructures o conformacions que adopta la molècula estudiada (fig. 3.23).

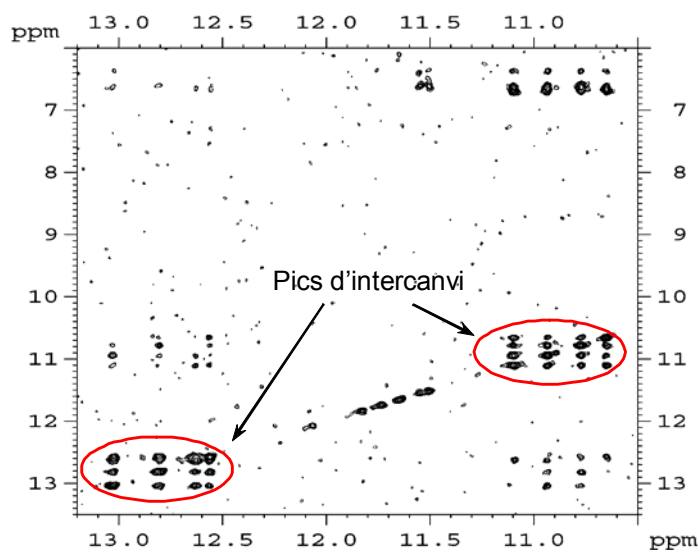


Figura 3.23 – Zona de l'espectre NOESY de $d\langle pTTGGTTGG \rangle$ enregistrat en H_2O a una concentració de 0.56 mM en presència de Na^+ 63.5 mM , a $5^\circ C$ i amb un τ_m de 300 ms , on apareixen els protons bescanviables. A l'espectre s'indiquen alguns dels pics que podrien ser d'intercanvi.

En vista d'aquests resultats, s'ha pensat en la possible existència de dues estructures en equilibri, una de les quals presenta molta simetria i només té 4 sistemes d'espins independents, i una altra que conté menys elements de simetria i, com a conseqüència, en té 8. Si ambdues estructures fossin de quàdruplex de G, podrien correspondre a les que es mostren a la figura 3.24

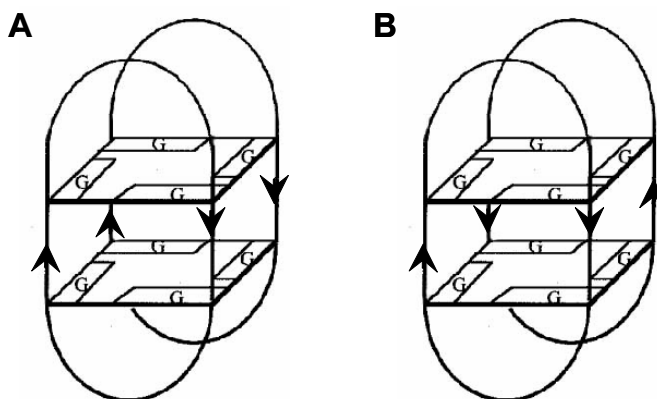


Figura 3.24 – Quàdruplex de G que pot formar $d\langle pTTGGTTGG \rangle$ en les quals els cicles es poden disposar de forma paral·lela (A) o antiparal·lela (B) entre sí.

Aquestes estructures es diferencien entre elles per l'orientació relativa dels cicles (paral·lels o antiparal·lels), essent ambdues, però, quàdruplex antiparal·lels. Tanmateix, amb els resultats obtinguts fins el moment, no es pot concloure que les

dues estructures presents en dissolució responguin al motiu estructural quàdruplex, ja que tot i haver-hi certs indicis de que sigui així, alguns dels resultats són contradictoris.

Per una banda s'observa la presència de guanines en conformació *syn* en cadascuna de les diferents estructures. En l'anàlisi dels espectres d'RMN de quàdruplex de G antiparal·lels, cal fixar-se en la zona on apareixen els pics de correlació entre el protó H_{1'} del sucre i els protons aromàtics H₆ i H₈. En aquestes estructures hi ha guanines en conformació *syn* (sG), absents en la majoria de les altres estructures secundàries que sol adoptar el DNA (dúplex, tríplex o quàdruplex paral·lels). La seva presència es posa de manifest perquè els pics de correlació H_{1'}-H₈ d'aquests nucleòtids són especialment intensos, i per tant fàcilment detectables. Així, en l'espectre NOESY de **d<pTTGGTTGG>** se n'observen 3, fet que concorda amb l'existència de 12 sistemes d'spin i dues estructures quàdruplex antiparal·lels diferents. D'aquesta manera, de les 6 G diferents que apareixen a l'espectre, 3 es troben en la conformació *anti* (aG) i 3 en la *syn* (sG).

Per altra banda, cal recordar que el perfil dels espectres de DC obtinguts no és el típic d'estructures quàdruplex antiparal·lel. A més a més, s'ha observat als espectres de RMN monodimensional senyals corresponents a protons que es troben a camps molt baixos per tractar-se d'un quàdruplex. En aquest sentit s'ha pensat que potser una de les estructures podria contenir parells no canònics G·T i no tractar-se, per tant, d'un quàdruplex de G.

Un cop arribats en aquest punt de l'estudi, s'ha intentat dur a terme l'assignació seqüencial de l'espectre NOESY. No obstant, aquesta ha resultat impossible degut a l'alt solapament que existeix en moltes de les regions dels espectres i a que pràcticament no s'observen NOEs seqüencials. Tanmateix, aquesta absència de pics de correlació entre bases consecutives es podria interpretar en el sentit que tots els passos G-G, són aG-sG en el sentit 5'→3', ja que aquesta disposició de dues guanines consecutives no presenta cap pic de correlació.

Finalment, s'han enregistrat múltiples espectres variant considerablement les condicions salines per tal d'intentar desplaçar l'equilibri i discriminar una de les estructures presents respecte l'altra. Així, s'han enregistrat espectres en presència de K⁺ i Mg²⁺, però no s'ha observat cap variació rellevant en els espectres obtinguts. També s'ha intentat desplaçar l'equilibri variant tant la concentració de la mostra com la temperatura d'enregistrament dels espectres. Tots els esforços, però, han resultat inútils, ja que no s'ha obtingut el resultat desitjat. Així doncs, s'ha decidit abandonar l'estudi estructural de l'oligonucleòtid en qüestió. Les dificultats trobades durant l'estudi (presència de més d'una estructura, alta simetria del sistema, baixa estabilitat i elevat grau de solapament de les senyals) semblen força insalvables de cara a la resolució d'alguna de les estructures que presenta l'oligonucleòtid **d<pTTGGTTGG>** en dissolució.

3.3.3 Estudi estructural de d<pTTAGGGTTAGGG>

En l'estudi estructural del dodecàmer d<pTTAGGGTTAGGG> s'ha seguit la mateixa estratègia utilitzada amb l'octàmer, començant amb un estudi d'estabilitat tèrmica per UV, seguit d'un estudi per DC i finalment, realitzant un estudi complet mitjançant l'RMN.

3.3.3.1 Estudi d'estabilitat tèrmica per UV

S'han realitzat experiments de desnaturalització tèrmica per UV de d<pTTAGGGTTAGGG> a concentració 50 μ M a dues longituds d'ona, 260 i 295 nm, en tampó Pipes 10 mM, i en presència de KCl 100 mM. En les corbes enregistrades (fig. 3.25) s'observa una sola transició amb una T_m al voltant de 44°C. Altre cop, aquesta transició presenta perfils diferents a les dues longitud d'ona: transició típica a 260 nm, i transició inversa a 295 nm. Aquest fenomen indica que l'oligonucleòtid en qüestió s'estructura en forma de quàdruplex de G.

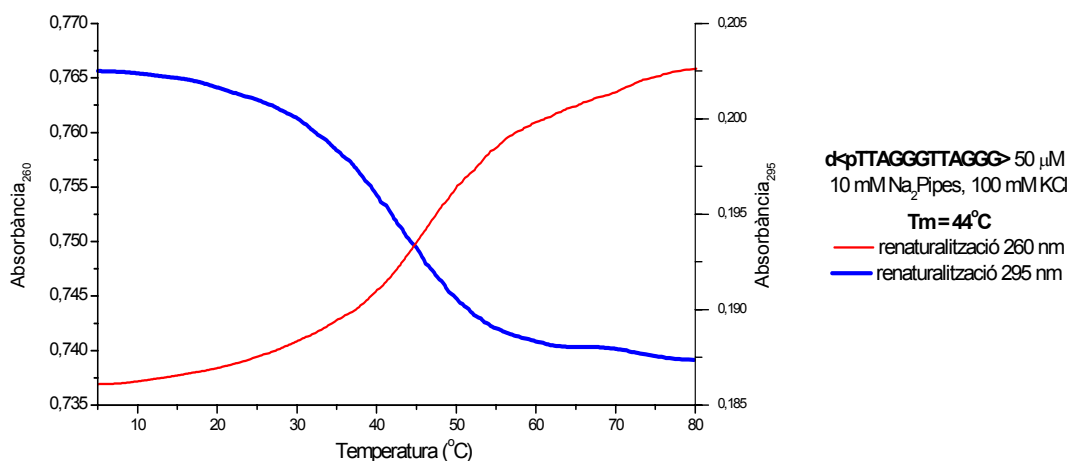


Figura 3.25 – Corbes de renaturalització realitzades per UV de d<pTTAGGGTTAGGG> a 260 i a 295 nm.

La diferència més significativa observada entre l'octàmer i el dodecàmer és l'elevada estabilitat tèrmica d'aquest últim, que té una T_m més de 20°C superior a l'octàmer. Aquest fet, que en primera instància es pot atribuir a la formació de tres tètredes de G enlloc de dues, és força positiu de cara a l'estudi estructural que es vol dur a terme, ja que d<pTTAGGGTTAGGG> presentarà a 5°C un nivell d'estructuració molt més elevat del que presentava d<pTTGGTTGG>.

3.3.3.2 Estudi mitjançant DC

L'estudi per DC del dodecàmer s'ha començat enregistrant espectres a concentració 50 μ M d'oligonucleòtid tant en presència de Na⁺ com de K⁺. És

interessant observar el perfil dels espectres obtinguts en ambdues condicions salines (fig. 3.26). L'enregistrat en presència de Na^+ presenta el perfil típic d'una estructura quàdruplex de G antiparal·lela amb dos màxims a 247 i 292 nm, i dos mínims a 233 i 267.5 nm. Per contra, l'enregistrat en presència de K^+ també presenta dos màxims (257 i 292 nm) i dos mínims (234.5 i 275 nm), però el perfil és força diferent. Aquest diferent perfil en funció de les condicions salines és certament sorprenent, i sembla indicar que en Na^+ l'oligonucleòtid s'estructura en forma de quàdruplex anti-paral·lel típic, mentre que en K^+ possiblement hi ha una mescla de conformacions en equilibri, una de les quals podria ser un quàdruplex antiparal·lel, ja que el màxim a 292 nm és característic d'aquest tipus de quàdruplex.

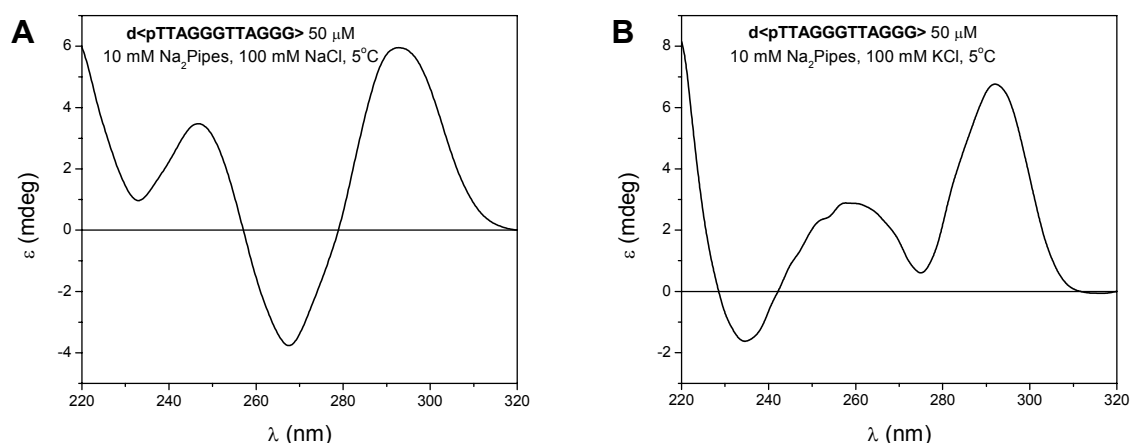


Figura 3.26 – Espectres de DC de **d<pTTAGGGTTAGGG>** en presència de Na^+ (A) i de K^+ (B).

A la vista d'aquests resultats, s'ha repassat detingudament la bibliografia i s'ha trobat un oligonucleòtid que es comporta de forma molt similar. Es tracta de **d(G₃T₄G₃)**, el qual presenta dos espectres diferents en funció del tipus de catió present en la mostra. Aquest oligonucleòtid presenta en Na^+ un espectre amb el mateix perfil que el que es mostra a la figura 3.26A, i en K^+ un altre de molt similar al de la figura 3.26B²⁷. S'ha vist per RMN que **d(G₃T₄G₃)** forma un quàdruplex bimolecular en ambdues condicions²⁸, i se n'ha resolt l'estructura en presència de Na^+ , la qual respon a un quàdruplex bimolecular tipus *cistella*²⁹. Tanmateix no s'ha trobat cap explicació sobre l'estructura quàdruplex que presenta aquest oligonucleòtid en presència de K^+ .

Posteriorment, s'ha realitzat un experiment de desnaturalització tèrmica de **d<pTTAGGGTTAGGG>** de la mostra que conté Na^+ per veure si l'estructura formada és més o menys estable que la formada en presència de K^+ , però s'ha obtingut una T_m molt similar, de 43°C. Així doncs, s'ha decidit centrar-se en l'estudi de l'estructura que presenta el dodecàmer en presència de Na^+ , ja que sembla que es pot tractar d'una única estructura ben definida, cosa que de per sí ja facilitaria enormement l'anàlisi.

S'han enregistrat espectres de DC a diferents concentracions d'oligonucleòtid, per tal de veure si el nivell d'estructuració varia amb la concentració (fig. 3.27A). Els resultats obtinguts semblen indicar que és així, però en aquest cas no són tant concloents com els obtinguts anteriorment amb l'octàmer, i és per això que s'han dut a

terme experiments de desnaturalització tèrmica a diferents concentracions d'oligonucleòtid. Si l'estructura formada fos bimolecular, la T_m hauria de presentar una forta dependència amb la concentració d'oligonucleòtid. A la figura 3.27B es mostren les fusions realitzades a 47.0, 22.5 i 6.5 μM de **d<pTTAGGGTTAGGG>**, sempre en presència de 100 mM NaCl.

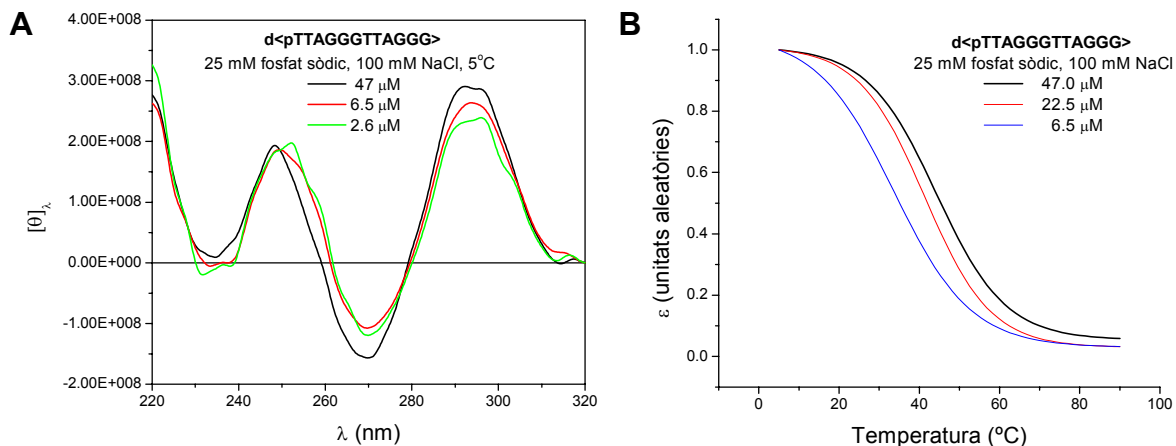


Figura 3.27 – Espectres de DC on es mostren les el·lipticitats molars (A) i corbes de fusió (B) per a diferents concentracions de **d<pTTAGGGTTAGGG>**.

A la taula 3.3 s'indiquen les T_m determinades en cada cas i, com es pot observar, aquesta disminueix considerablement al disminuir la concentració d'oligonucleòtid.

d<pTTAGGGTTAGGG> (μM)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
47.0	44.2
22.5	41.4
6.5	33.6

Taula 3.3 – Valors de T_m determinats per a cada concentració de **d<pTTAGGGTTAGGG>**.

Aquest resultat mostra que ens trobem altre cop davant d'una estructura multimèrica, que segurament és un dímer. Tanmateix, aquesta informació no permet aventurar l'estructura final, ja que aquest oligonucleòtid també pot presentar dues estructures quàdruplex bimoleculars diferents. Aquestes, que es diferencien per l'orientació relativa dels cicles, es mostren a la figura 3.28. Ambdós cicles es poden trobar orientats paral·lelament o antiparal·lela entre sí. En aquesta nova denominació respecte a l'orientació dels cicles, cal remarcar que encara que el cicles es disposin de forma paral·lela o antiparal·lela, el quàdruplex format sempre serà antiparal·lel. Convé no confondre aquests dos termes que són conceptualment molt diferents, d'una banda l'orientació relativa de les cadenes que formen el quàdruplex, i de l'altra l'orientació relativa dels cicles. Pel que respecte a l'orientació relativa de les 4 cadenes entre sí, o

sigui pel que fa a l'esquelet, aquestes dues estructures són equivalents als quàdruplex antiparal·lels tipus cistella (fig. 3.28A) i tipus cadira (fig. 3.28B).

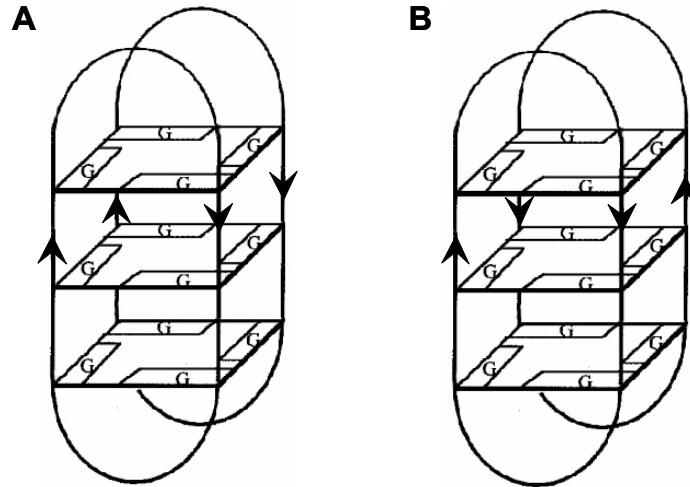


Figura 3.28 – Estructures quàdruplex de G que pot formar $d\langle pTTAGGGTTAGGG \rangle$ en les quals els cicles es poden disposar de forma paral·lela (A) o antiparal·lela (B) entre si.

Amb els valors de T_m determinats per a cada concentració de 12-mer (taula 3.3), és possible extreure certs paràmetres termodinàmics de l'estructura que adopta el dodecàmer mitjançant la representació de l'invers de la temperatura respecte el logaritme neperià de la concentració³⁰. La recta obtinguda es mostra a la figura 3.29 i respon a la següent equació: $1/T = A \ln(C) + B$. En ella, $A = R/\Delta H$ i $B = \Delta S/\Delta H$ on R és la constant dels gasos.

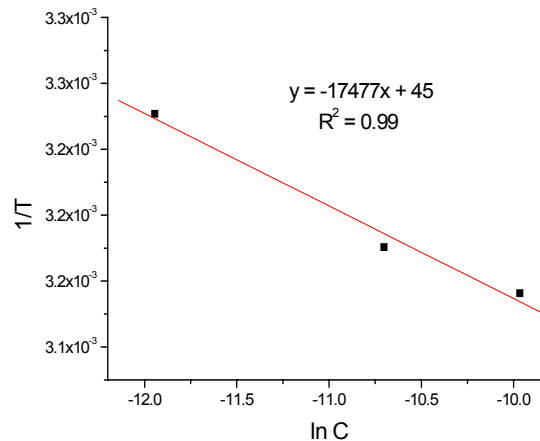


Figura 3.29 – Determinació dels paràmetres termodinàmics de l'estructura que adopta $d\langle pTTAGGGTTAGGG \rangle$.

A partir de la recta, s'han obtingut els següents valors: $\Delta H = -35.4$ Kcal/mol, $\Delta S = -92$ cal/mol⁰K i $\Delta G_{298} = -7.8$ Kcal/mol. Aquests valors s'ha comparat amb els descrits per al quàdruplex unimolecular format per la seqüència telomèrica humana³¹ ($\Delta H = -54$ Kcal/mol i $\Delta S = -163$ cal/mol⁰K). Com es pot observar, tant l'increment d'entalpia com d'entropia de l'estructura formada pel 12-mer és superior al del

quàdruplex format per un oligonucleòtid lineal de seqüència telomèrica. El fet que entàlpicament la nostra estructura sigui més desfavorable podria respondre al fet que els oligonucleòtids que hi participen siguin cíclics. Així, en aquest cas, existeixen unes restriccions conformacionals en els *loops* que produeixen un penalització energètica a l'estructura. Per altra banda, el fet que l'increment d'entropia sigui més favorable en la nostra estructura que en l'altra es podria relacionar amb el fet que en el nostre cas es tracta d'una estructura bimolecular, mentre que l'altra és unimolecular.

3.3.3.3 Estudi mitjançant RMN

Un cop realitzat l'estudi de DC, s'ha passat a realitzar un estudi mitjançant l'RMN. En aquest sentit, el primer que s'ha fet ha estat enregistrar un espectre monodimensional, per poder observar els trets generals de l'estructura que presenta l'oligonucleòtid en qüestió. A la figura 3.30 es mostra l'espectre monodimensional obtingut a una concentració 0.6 mM en presència de Na⁺ (25 mM), a 10°C i en H₂O.

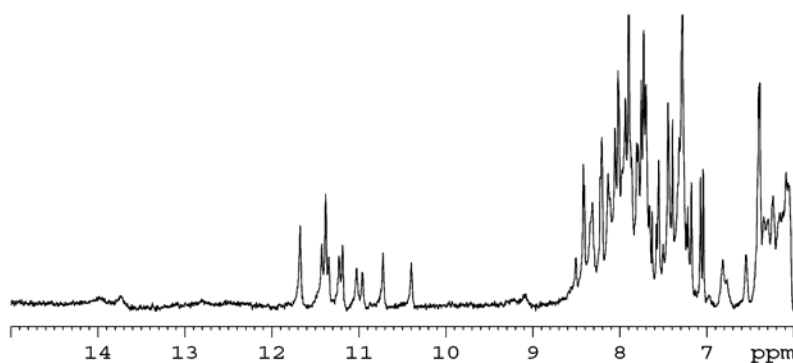


Figura 3.30 – Fragment de l'espectre d'RMN de ¹H monodimensional de *d*<pTTAGGGTTAGGG> enregirat en H₂O a una concentració de 0.64 mM i en presència de Na⁺ 25 mM.

A la figura es mostra la zona de l'espectre que va de 6 a 15 ppm. Entre 7 i 9 ppm apareixen els protons aromàtics, i s'observa una gran quantitat de senyals, fet que indica que l'estructura adoptada per l'oligonucleòtid no presenta massa simetria. Entre 10 i 12 ppm queden molt ben definides les senyals corresponents als protons dels grups imino que intervenen en la formació del quàdruplex. Finalment, més enllà de 13 ppm s'intueixen algunes senyals d'intensitat molt feble. Aquesta és la zona on solen aparèixer els protons dels grups imino que formen parells Watson-Crick. En aquest cas, sí que podria tenir lloc algun aparellament d'aquest estil, ja que la seqüència oligonucleotídica conté adenines i timines. Així doncs, observant aquest espectre es pot concloure que l'oligonucleòtid en qüestió s'estructura molt probablement formant un quàdruplex de G ben definit, de baixa simetria i que podria contenir algun parell Watson-Crick en algun dels *loops*.

A continuació, s'han enregirat més espectres monodimensionals a diferents concentracions d'oligonucleòtid i també a diferents temperatures. A la figura 3.31 es mostra un espectre enregirat en H₂O a una concentració d'oligonucleòtid de 60 μM.

En aquesta concentració l'oligonucleòtid es troba molt majoritàriament desestructurat i es poden veure tots els protons aromàtics que el formen. Entre 7 i 8.3 ppm es poden observar 5 pics, dels quals un es troba mig desdoblats i un altre és més ample i alt que els altres. Així doncs, aquestes senyals corresponen als 7 protons aromàtics esperats (els H₈ de tres guanines, els H₆ de dues timines i l'H₈ i l'H₂ d'una adenina), tenint present que en aquestes condicions una molècula d'oligonucleòtid conté dues repeticions equivalents de la seqüència TTAGGG.

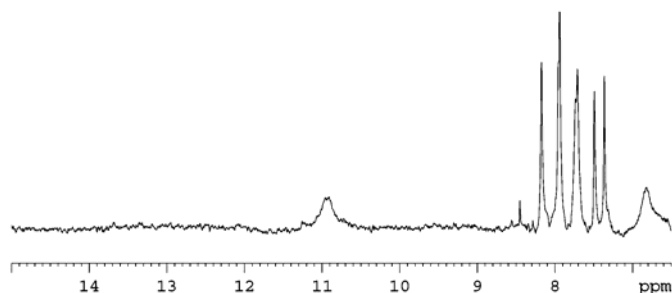


Figura 3.31 – Fragment de l'espectre d'RMN de ¹H monodimensional de **d<pTTAGGGTTAGGG>** enregistrat en H₂O a una concentració de 0.06 mM i en presència de Na⁺ 10 mM.

En els espectres enregistrats a concentració d'oligonucleòtid 0.64 mM a diferents temperatures (fig. 3.32), es pot observar la presència dels protons imino que participen en l'estructura. Aquestes senyals presenten cert grau de superposició entre elles depenent de la temperatura, però analitzant el conjunt dels diferents espectres es poden arribar a identificar 11 senyals diferents, una de les quals conté, a totes les temperatures, 2 protons superposats. Aquest fet mostra que la molècula no presenta gens de simetria i per tant, els 12 protons observats corresponen a les 12 G que formen les tres tètrades.

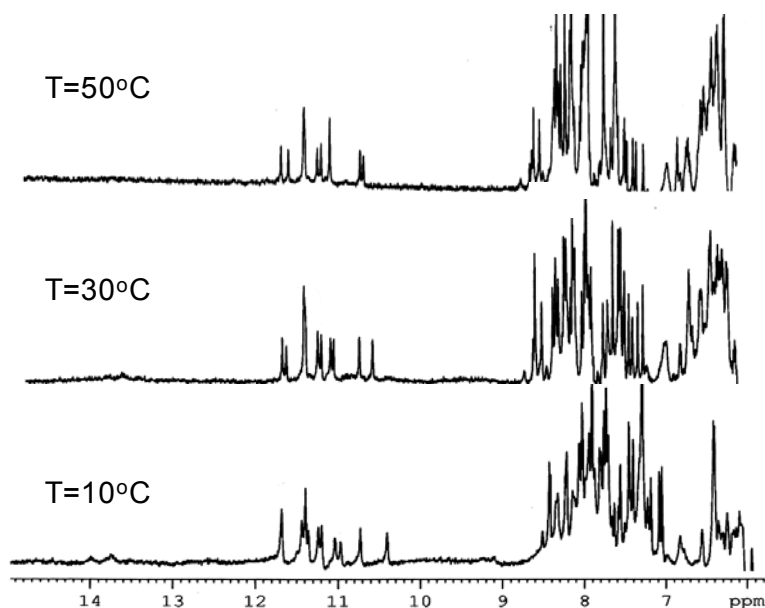


Figura 3.32 – Fragments dels espectres de **d<pTTAGGGTTAGGG>** a diferents temperatures enregistrats en H₂O a una concentració de 0.64 mM i en presència de Na⁺ 108 mM.

Un cop analitzats els espectres monodimensionals, s'han enregistrat espectres bidimensionals COSY i NOESY tant en H₂O com en D₂O, a diferents temperatures i a diferents temps de mescla. Un cop processats, s'ha començat per identificar els diferents sistemes d'spin. En aquest sentit, s'ha observat que l'estructura està formada per 24 sistemes d'spin diferents, 8 dels quals corresponen a timines. Així doncs, s'ha confirmat que l'estructura formada per **d<pTTAGGGTTAGGG>** en presència de Na⁺ és dimèrica i totalment asimètrica, de manera que cada nucleòtid apareix com un sistema d'spin completament independent. Posteriorment, s'ha analitzat la zona de l'espectre on apareixen els NOEs entre els protons aromàtics i els protons H_{1'}. En aquesta zona s'observen 6 senyals d'intensitat força més elevada que la resta (fig. 3.33), de manera que es pot concloure que en l'estructura hi participen 6 guanines amb una conformació *syn* (sG). Així, i per diferència, les altres 6 guanines es troben en conformació *anti* (aG). Aquesta observació ajuda a refinar l'anàlisi realitzada fins ara, i a més a més, és coherent amb els quàdruplex antiparal·lels resolts fins el moment, en els quals les diferents guanines que el formen apareixen sempre alternades, pel que fa a la conformació dels nucleòtids, al llarg d'una mateixa cadena.

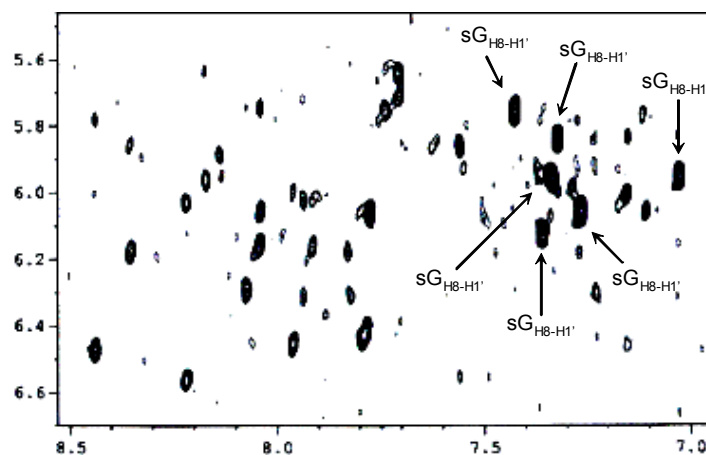


Figura 3.33 – Zona de l'espectre NOESY de **d<pTTAGGGTTAGGG>** enregistrat en D₂O a una concentració de 0.64 mM en presència de Na⁺ 64 mM, a 5°C, i amb un τ_m de 200 ms, on apareixen els pics de correlació H_{A'}-H_{1'}. En ella s'hi indiquen els pics corresponents a les 6 guanines en conformació *syn*.

Un cop identificats els sistemes d'spin i localitzades 6 T i 6 sG, s'ha començat a realitzar l'assignació seqüencial de l'espectre NOESY. A través d'aquesta ha estat possible assignar certs fragments de l'estructura. S'han pogut identificar 4 passos sG-aG, dos passos TTA, i alguns altres fragments curts. El fet d'observar 4 passos sG-aG, fa que quedin "aïllades" 2 sG i 2 aG. En aquest cas doncs, les 2 sG es trobarien darrera de dos dels passos sG-aG observats, i les 2 aG davant dels altres dos. Convé recordar que en els passos sG-aG no s'acostuma a observar cap pic de correlació en l'espectre NOESY. Al tractar-se d'un oligonucleòtid cíclic, és evident que els dos

fragments rics en G del mateix cicle es troben en disposició antiparal·lela. D'aquesta manera la distribució de G al llarg de cadascun dels oligonucleòtids és: aG-sG-aG-T-T-A-sG-aG-sG-T-T-A. A la figura 3.34 es mostra una ampliació de l'espectre on s'observen alguns dels NOEs seqüencials identificats.

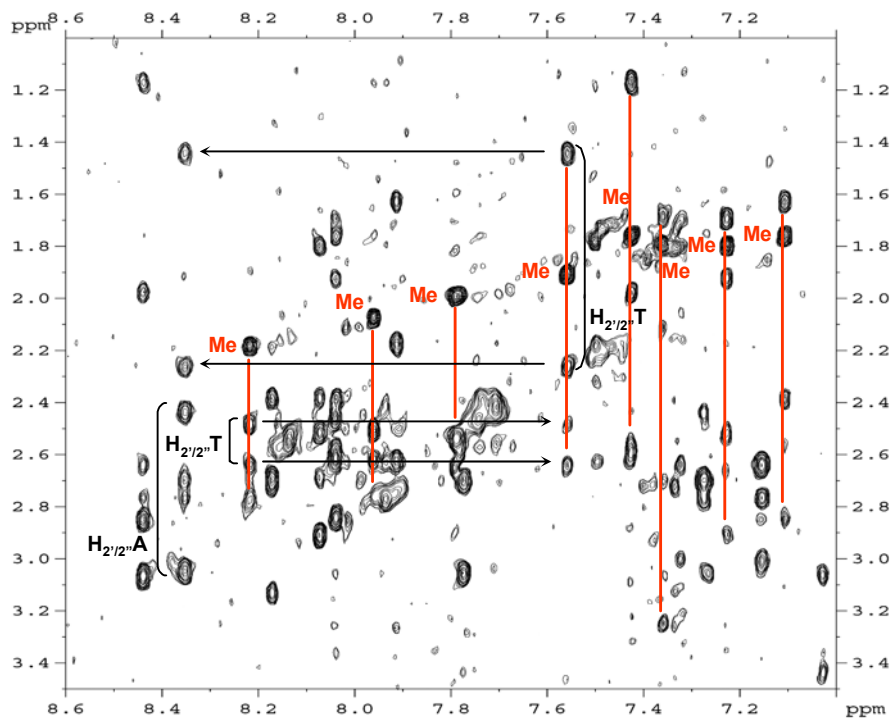


Figura 3.34 – Zona de l'espectre NOESY de $d\langle pTTAGGGTTAGGG \rangle$ enregistrat en D_2O a una concentració de 0.64 mM en presència de Na^+ 64 mM a $5^\circ C$, i amb un τ_m de 200 ms, on apareixen els pics de correlació $H_{Ar}-H_{2/2''}$ i $H_{Ar}-H_{Me}$. En ella s'indica el camí seguit per a l'assignació seqüencial, així com també els sistemes d'spin corresponents a les T.

Després d'analitzar tots els espectres enregistrats (en H_2O i en D_2O a diferents temps de mescla) l'assignació seqüencial completa de l'espectre no ha estat possible, degut a l'alt grau de complexitat d'aquest. El fet que apareguin 24 sistemes d'spin ja dificulta considerablement l'assignació, però el que ha resultat definitiu és la manca d'observació d'alguns NOEs, no només en els passos aG-sG, sinó també en dos dels *loops*. Aquestes dificultats, conjuntament amb les característiques intrínseques de l'oligonucleòtid (el fet de ser cíclic i estar format per dues repeticions idèntiques de la mateixa seqüència) han fet impossible l'assignació completa de l'espectre. Un espectre d'aquestes característiques presenta un problema addicional no gens trivial, com és el de no saber si els fragments identificats pertanyen o no al mateix oligonucleòtid. Aquest problema no es pot resoldre fins que no és possible assignar-ne completament les senyals d'un dels dos. Llavors, l'assignació de l'altre resulta força més fàcil. En el nostre cas, al no observar-se cap pic inequívoc de correlació en els passos aG-sG, ja queda pràcticament impossibilitada l'assignació completa. Cal afegir que, a més a més, tampoc s'observa cap tipus de NOE en dos dels quatre *loops* que formen l'estructura.

3.3.3.4 Conclusió de l'estudi estructural

Malgrat no haver estat possible assignar els espectres de RMN obtinguts, i per tant, resoldre l'estructura adoptada per **d<pTTAGGGTTAGGG>** en presència de Na⁺, sí que s'han pogut determinar vàries de les característiques que aquesta presenta.

- estructura asimètrica
- 3 tètades de G.
- 4 passos sG-aG.
- 0 passos aG-aG.
- 2 sG i 2 aG aïllades.
- almenys 2 parells A·T en els *loops*.

En primer lloc, en els espectres obtinguts s'han pogut identificar 24 sistemes d'spin independents. Això permet concloure que l'estructura adoptada pel 12-mer és dimèrica i totalment asimètrica. També ha estat possible determinar el nombre de tètades de G mitjançant l'anàlisi dels espectres realitzats en H₂O. L'anàlisi dels NOEs seqüencials ha permès observar la presència de 4 passos sG-aG i cap pas aG-aG ni sG-sG. Com que els passos aG-sG no s'observen, s'ha pogut concloure que per a cadascuna de les dues cadenes oligonucleotídiques que formen l'estructura, la distribució de guanines al llarg de la seqüència és: aG-sG-aG-T-T-A-sG-aG-sG-T-T-A. Finalment, s'ha observat també la presència d'almenys 2 parells A·T, els quals estarien col·locats en els *loops* del quàdruplex.

Tota aquesta informació, malgrat no ser suficient per a resoldre l'estructura, ha permès determinar la disposició que presenten els dos cicles entre sí: paral·lela o antiparal·lela (fig. 3.28). En aquest cas es tracta d'una qüestió de simetria, però degut a la complexitat de l'estructura, es fa difícil fer una anàlisi visual directe. Així, s'han construït dues estructures model amb el programa de modelat molecular DYANA, en les quals s'hi ha introduït totes les restriccions estructurals comentades anteriorment. Una estructura ha correspost al quàdruplex en que ambdós cicles es troben paral·lels entre sí, mentre que en l'altra aquests es troben orientats de forma antiparal·lela.

Un cop construïts ambdós models, s'ha dut a terme una minimització d'energia per tal d'obtenir conformacions estables d'ambdues i posteriorment, se n'ha analitzat la simetria global. Això s'ha dut a terme intentant superposar, per a cada model, un dels fragments oligonucleotídics que contenen 3 guanines consecutives amb qualsevol dels altres tres que formen el quàdruplex. A la figura 3.35 s'observa com en el cas dels cicles antiparal·lels (B) la superposició de les diferents guanines dels diferents fragments és gairebé perfecta. Contràriament, en el cas del quàdruplex que presenta els cicles orientats de forma paral·lela entre sí (A) la superposició dels fragments és completament impossible. Aquest fet, permet concloure que el quàdruplex que presenta els dos oligonucleòtids cíclics orientats de forma antiparal·lela entre sí, conté un eix de simetria, mentre que l'altre és completament asimètric.

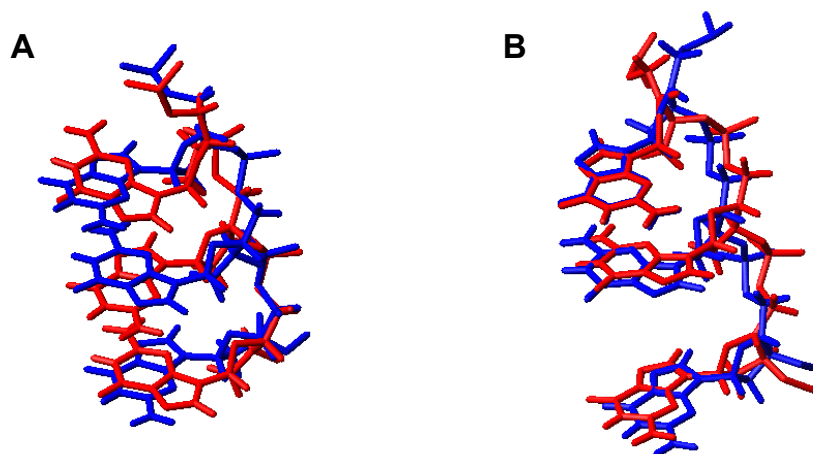


Figura 3.35 – Superposició de dues de les cadenes dels diferents cicles de les estructures model calculades i obtingudes mitjançant el programa DYANA, en el qual ambdós cicles es troben orientats de forma paral·lela (A) i antiparal·lela (B).

Així, l'estructura quàdruplex adoptada per $d\langle pTTAGGGTTAGGG \rangle$ en Na^+ presenta ambdós cicles orientats de forma paral·lela, i es pot assimilar a un quàdruplex tipus cistella. A la figura 3.36 es mostra una superposició de les 10 estructures finals del model construït en el qual l'oligonucleòtid $d\langle TTAGGGTTAGGG \rangle$ forma un quàdruplex bimolecular antiparal·lel amb una disposició paral·lela d'ambdós cicles, estructura que presenta un distribució de les cadenes típica dels quàdruplex tipus cistella. Convé remarcar que aquesta figura no és una estructura resolta d'RMN, sinó simplement un model construït a partir de les característiques estructurals bàsiques que s'han deduït a través dels espectres d'RMN obtinguts.

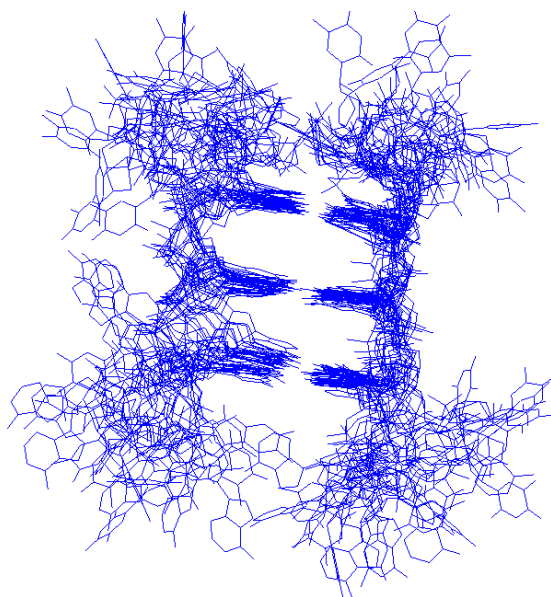


Figura 3.36 – Superposició de les 10 estructures finals de l'estructura model de $d\langle pTTAGGGTTAGGG \rangle$ calculada mitjançant el programa DYANA, en el qual ambdós cicles es troben orientats de forma paral·lela.

3.3.4 Discussió dels resultats obtinguts

Tot i que per cap dels dos oligonucleòtids cíclics estudiats s'ha pogut resoldre la seva estructura, sí que s'ha pogut extreure força informació estructural d'ambdós. Analitzant en global tots els experiments realitzats es pot concloure que els problemes més greus que s'han hagut de fer front han estat el gran nombre de senyals que apareixen als espectres d'RMN, l'elevat grau de solapament d'aquestes i la manca de NOEs seqüencials en llocs clau. Tots aquests problemes són força freqüents en la determinació estructural d'àcids nuclèics per RMN i es poden intentar solventar mitjançant dues estratègies:

- L'estudi estructural d'oligonucleòtids marcats isotòpicament.
- L'estudi estructural d'anàlegs dels oligonucleòtids estudiats amb substitucions puntuals d'algunes de les bases.

El marcatge isotòpic presenta l'inconvenient de ser molt car, però permet realitzar experiments de correlació heteronuclear, amb els quals normalment s'elimina força el solapament i es poden observar més pics de correlació que faciliten l'assignació seqüencial.

Per altra banda, el que se sol fer sovint en el cas de quàdruplex, és sintetitzar anàlegs en els quals se substitueixen certes bases, cosa que disminueix el solapament i permet assignar inequívocament cada nucleòtid. Les substitucions més típiques són les de guanina per inosina o les de timina per uracil. Un problema que presenta aquesta aproximació és que pot ser que amb la substitució s'estigui modificant l'estructura de l'oligonucleòtid.

En el nostre cas, l'aproximació de les substitucions puntuals és extremadament laboriosa, ja que suposa l'obtenció d'un oligonucleòtid diferent per a cada substitució, o sigui, l'obtenció de 12 anàlegs, en el cas del dodecàmer. Això es pot dur a terme més fàcilment en el cas d'oligonucleòtids lineals que en cíclics, que són molt més difícils d'obtenir. Pel que fa al marcatge isotòpic, s'ha tingut en consideració, però al final s'ha desestimat per manca de temps i perquè tampoc s'ha vist clar la forma de realitzar-lo per tal de poder arribar a assignar completament els espectres.

3.4 Síntesi i estudi estructural mitjançant DC de **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>**

S'ha anat comentant al llarg del capítol que tant **d<TTGGTTGG>** com **d<pTTAGGGTTAGGG>** poden presentar dues estructures quàdruplex bimoleculares diferents en funció de l'orientació relativa dels cicles. Aquestes dues estructures es corresponen, tenint en compte l'orientació relativa de les diferents cadenes, amb els quàdruplex antiparal·lels tipus cistella (cicles paral·lels) i tipus cadira (cicles antiparal·lels).

En el cas de l'octàmer, s'han obtingut espectres de DC força difícils d'interpretar, i segurament corresponents a una mescla d'estructures poc estables. Tanmateix, en el cas del dodecàmer la situació ha estat força diferent, ja que s'han obtingut espectres ben definits però de diferent perfil en funció de la naturalesa del catió utilitzat. A més a més, en ambdues condicions salines, les estructures formades han presentat una estabilitat similar, amb una T_m al voltant de 43°C. Una possibilitat que explicaria aquests resultats és que el dodecàmer presenti una estructura tipus cistella en presència de Na^+ i una de tipus cadira en presència de K^+ . D'aquesta manera, seria la naturalesa del catió el fet que dirigiria la disposició relativa d'ambdós cicles en la formació del quàdruplex. Si la hipòtesi plantejada fos correcta, el perfil de DC obtingut en presència de K^+ correspondria al d'una estructura quàdruplex tipus cadira, i seria la primera vegada que es descriu un espectre de DC diferent per a cadascun d'aquests dos tipus de quàdruplex.

Per tal d'aprofundir en aquesta qüestió, s'ha dissenyat un nou oligonucleòtid cíclic que es pugui estructurar en forma de quàdruplex antiparal·lel tipus cadira, però no en forma de quàdruplex antiparal·lel tipus cistella. Aquest oligonucleòtid és **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>**, el qual pot donar lloc a una estructura quàdruplex unimolecular tipus cadira formada per dues tètades en la qual tots els *loops* són laterals (fig. 3.37).

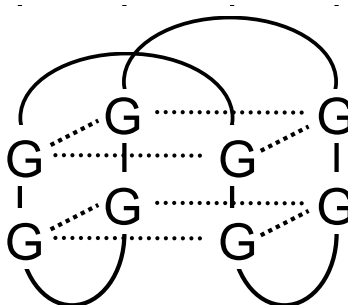


Figura 3.37 – Esquema de l'estructura quàdruplex unimolecular tipus cadira que pot formar **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>**.

3.4.1 Obtenció de **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>**

S'ha dut a terme la síntesi del 16-mer a escala 2 μmol i s'ha obtingut un rendiment del 15%. En aquest cas, preveient que el cru de síntesi seria força complicat degut a la mida de l'oligonucleòtid i a l'alt contingut de guanines present en la seqüència, l'anàlisi del producte s'ha dut a terme mitjançant una electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida (fig. 3.38). El cru de síntesi (carril A) es troba força impur, i s'ha realitzat la purificació del 16-mer mitjançant electroforesi en les mateixes condicions. El rendiment de purificació ha estat del 6%, obtenint-se un total de 3 OD de producte pur (carrils B i C).

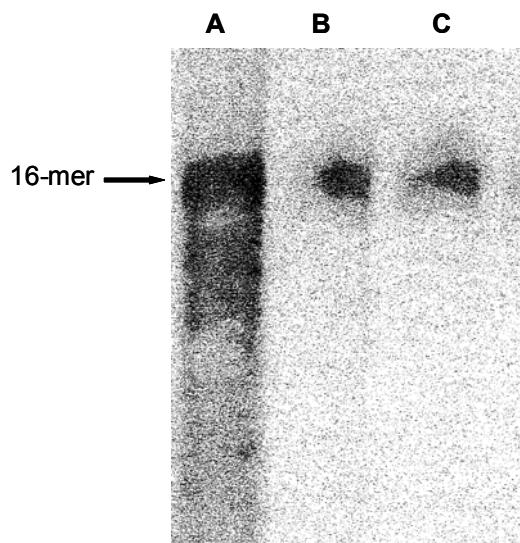


Figura 3.38 – Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida a escala analítica on s'observa el cru de desancoratge (carril A), així com també dues fraccions de les purificacions realitzades (carrils B i C) de $d\langle pTTGGTTGGTTGGTTGG \rangle$.

3.4.2 Estudi per DC de $d\langle pTTGGTTGGTTGGTTGG \rangle$

Un cop obtingut l'oligonucleòtid desitjat amb la puresa adequada, en primer lloc s'ha volgut avaluar l'estabilitat tèrmica de l'estructura que adopta. Així, s'han realitzat experiments de desnaturalització tèrmica de $d\langle pTTGGTTGGTTGGTTGG \rangle$ a una concentració $25 \mu\text{M}$ d'oligonucleòtid en presència tant de Na^+ 100 mM com de K^+ 100 mM (fig. 3.39). En aquests, s'ha constatat que l'estructura que adopta l'oligonucleòtid en presència de K^+ és força més estable que la que adopta en presència de Na^+ , determinant-se unes T_m de 26.0°C i de 19.5°C respectivament.

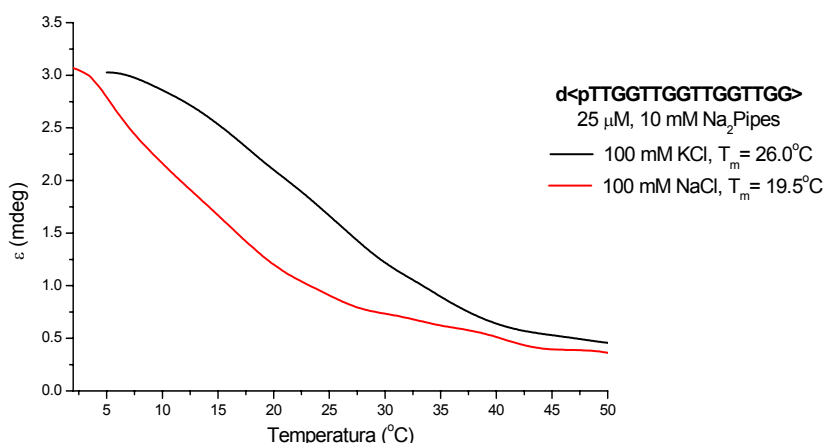


Figura 3.39 – Corbes de fusió obtingudes per DC de $d\langle pTTGGTTGGTTGGTTGG \rangle$.

Posteriorment, s'han enregistrat espectres de DC en les mateixes condicions que s'han dut a terme els estudis d'estabilitat tèrmica. Els espectres de DC dels altres oligonucleòtids (8-mer i 12-mer) s'havien enregistrat a una concentració de 50 μM , però cal tenir en compte que al tractar-se d'estructures bimoleculares, la concentració real de quàdruplex era 25 μM . A la figura 3.40 es mostren els espectres obtinguts per **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>** en cadascuna de les diferents condicions.

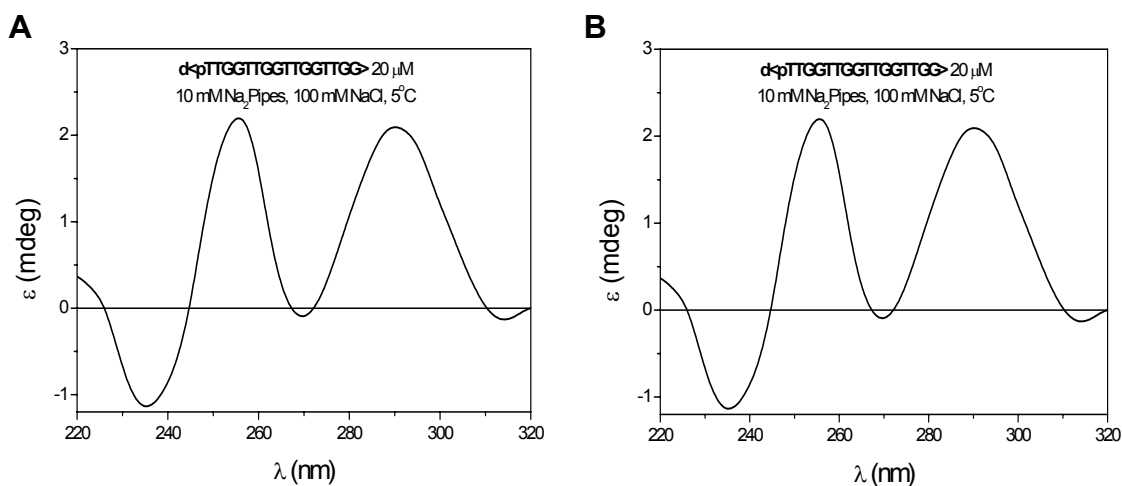


Figura 3.40 – Espectres de DC de **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>** en presència de Na⁺ (A) i de K⁺ (B).

El resultat obtingut és certament sorprenent, ja que els perfils d'ambdós espectres són diferents. Per una banda l'espectre en presència de potassi presenta el perfil típic de quàdruplex antiparal·lel. Per l'altra, el perfil de l'espectre enregistrat en presència de sodi no correspon a cap dels espectres típics de quàdruplex de G. D'entrada, aquest fet significa que l'oligonucleòtid en qüestió adopta estructures diferents en cadascuna de les condicions assajades. Tanmateix, s'havia dissenyat aquest oligonucleòtid perquè s'intuïa que només podia presentar un sol tipus de quàdruplex, en cas d'estructurar-se de forma monomèrica. Com que no es pot descartar que a aquesta concentració, **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>** es trobi formant estructures dimèriques, s'ha decidit registrar espectres de DC a concentracions menors d'oligonucleòtid. A la figura 3.41 es mostren els espectres obtinguts en presència de K⁺ a concentracions d'oligonucleòtid 20, 10, 5 i 3 μM . En ells s'observa una disminució progressiva en l'el·lipticitat a mesura que es va diluint la mostra, però no s'observa cap diferència en el perfil de l'espectre. S'han enregistrat també espectres en presència de Na⁺, a concentracions 20, 10 i 5 μM d'oligonucleòtid. El que s'ha observat és que en aquestes condicions el nivell d'estructuració disminueix dràsticament, però els espectres presenten el mateix perfil que l'espectre enregistrat a 25 μM . Aquests resultats semblen indicar que el perfil que s'observa a 25 μM correspon segurament al d'una estructura monomèrica adoptada pel 16-mer.

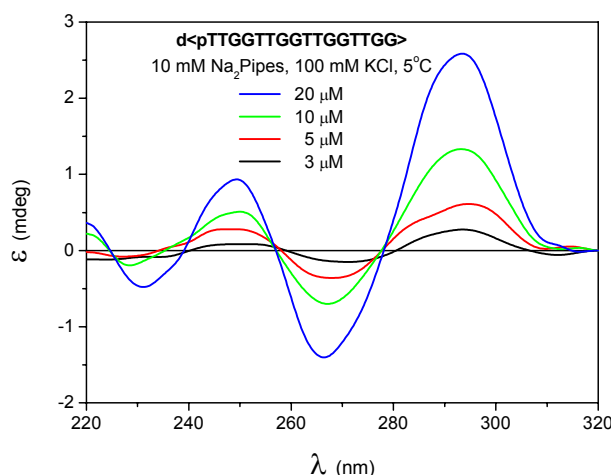


Figura 3.41 – Espectres de DC de **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>** a diferents concentracions.

En els espectres obtinguts en presència de K^+ , s'observa que el perfil és el típic dels quàdruplex antiparal·lels, com l'obtingut anteriorment per **d<pTTAGGGTTAGGG>** en presència de Na^+ . El 12-mer, en aquelles condicions, forma una estructura tipus cistella que aquest oligonucleòtid no pot adoptar. Així, en presència de K^+ , segurament el 16-mer es troba estructurat formant un quàdruplex tipus cadira com el que es mostra a la figura 3.36. Tanmateix, queda per resoldre quina és l'estructura que presenta **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>** en presència de Na^+ . En aquest sentit, cal comentar que el 16-mer podria adoptar també una estructura de quàdruplex paral·lel amb tots els *loops* externs (fig. 3.42).

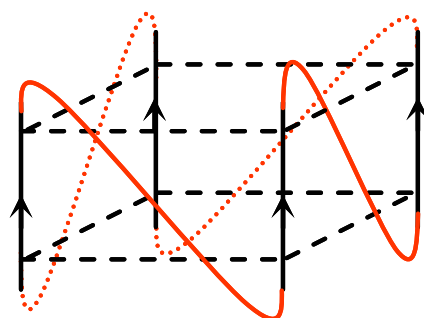


Figura 3.42 – Esquema de l'estructura quàdruplex paral·lel unimolecular que pot formar **d<pTTGGTTGGTTGGTTGG>**.

Si bé el perfil de l'espectre tampoc no és el de quàdruplex paral·lel (fig. 3.12A), cal tenir en compte que tots els espectres de DC descrits com a paral·lels fan referència a estructures tetramoleculares, en les quals no hi ha *loops*, de manera que es podria pensar en la possibilitat que el fet de presentar quatre *loops* externs (fig. 3.42) fes variar substancialment el perfil de l'espectre de DC. Tanmateix, són també possibles altres estructures en les quals es combinin *loops* externs amb *loops* laterals. En aquest sentit, l'espectre obtingut en Na^+ podria respondre a alguna estructura d'aquest estil o a alguna mescla de diferents conformacions. En tot cas, caldria realitzar un estudi estructural més detallat d'aquest oligonucleòtid en presència de K^+ .

3.5 Estudi de la interacció dels oligonucleòtids cíclics obtinguts amb derivats acridínics

3.5.1 Interacció dels quàdruplex de G amb diferents molècules

En els últims anys s'han descrit un gran nombre de molècules que interaccionen molt favorablement amb els quàdruplex de G. Donada la gran importància que sembla que poden tenir aquestes estructures en molts processos biològics, s'han centrat molts esforços en realitzar estudis sobre quina és la naturalesa d'aquesta interacció. Així doncs, s'han dut a terme múltiples estudis amb diverses seqüències oligonucleotídiques i diverses molècules estabilitzadores de quàdruplex per tal d'aprofundir en el coneixement d'aquest tipus d'interacció. En general, la majoria dels lligands descrits produeixen una estabilització de l'estructura, però també se n'han descrit alguns que no només estabilitzen, sinó que també indueixen la formació de l'estructura quàdruplex³².

Fins fa poc no s'havia aconseguit resoldre l'estructura de cap complex quàdruplex-ligand amb una resolució atòmica, i durant cert temps va haver-hi certes discrepàncies sobre si les molècules de lligand que interaccionaven amb els quàdruplex s'intercalaven entre dues tètades o simplement s'apilaven en un dels extrems. Posteriorment, es van realitzar estudis amb oligonucleòtids de seqüència telomèrica humana en presència de *N,N'*-Bis[2-(1-piperidino)etil]-3,4,9,10-perilentetracarboxílic diimida (PIPER)^{33,34}, els quals, tot i no permetre resoldre l'estructura, sí van permetre proposar alguns models estructurals dels complexos. En aquests semblava clar que la interacció tenia lloc per apilament, col·locant-se els lligands en un dels extrems del quàdruplex, entre una tètada i el *loop*. Aquests models, a més a més, coincidien amb estudis de modelat molecular realitzats per altres grups de recerca. Finalment, no ha estat fins el 2003 quan s'han pogut resoldre les primeres estructures de complexos quàdruplex-ligand tant per raigs X³⁵, com per RMN³⁶.

L'estructura resolta cristal·logràficament està formada per l'oligonucleòtid **d(TGGGGT)** i la daunomicina com a lligand. En ella, 3 molècules de daunomicina es disposen planarment en un dels extrems del quàdruplex tetramolecular paral·lel format per l'oligonucleòtid. Mentrestant, la part glucídica de la daunomicina es troba interaccionant amb els solcs del quàdruplex. Pel que fa a l'estructura resolta per RMN, la seqüència nucleotídica és **d(GGGGTTTTGGGG)** i el lligand és un derivat acridínic. En aquest cas el complex presenta una estequiometria d'1:1 i l'acridina es troba situada en un dels *loops*, apilada sobre una de les tètades de G de l'extrem del quàdruplex bimolecular, no observant-se cap interacció amb els solcs (fig. 3.43). En general, en l'estructura d'ambdós complexos s'observa que el quàdruplex no es troba pràcticament gens distorsionat respecte l'estructura que presenta la mateixa seqüència nucleotídica en absència de lligand. Tot i que encara farien falta més dades

estructurals abans d'establir una norma general, sí que sembla ser que realment en tots els casos la interacció de cromòfors amb quàdruplex de G és per apilament, ja que desapilar dues de les tètredes que formen un quàdruplex per tal d'intercalar-hi una molècula de lligand té un cost energètic realment extraordinari.

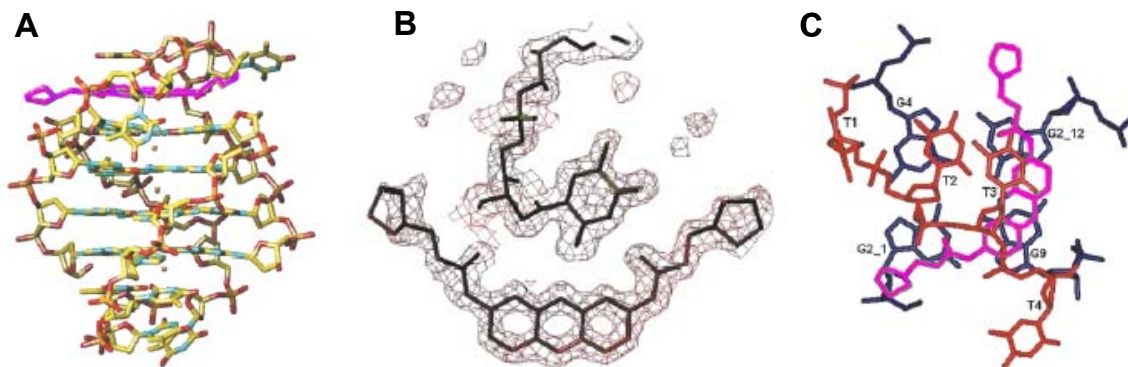


Figura 3.43– Imatge tridimensional del complex de **d(GGGGTTTGGGG)** amb un derivat acridínic, el qual es mostra en color violeta (A). Mapa de densitat electrònica en el pla on se situa el cromòfor acridínic (B). Vista vertical de part del complex on s'observa com el cromòfor acridínic (violeta) s'apila sobre la tètreda exterior de G (blau), i com s'ordenen les timines del loop (C).

3.5.2 Estudi de l'estabilització que produeixen alguns dels derivats acridínics obtinguts a les estructures adoptades pels oligonucleòtids cíclics **d<pTTGGTTGG>** i **d<pTTAGGGTTAGGG>**

Els estudis estructurals realitzats fins el moment amb els oligonucleòtids cíclics sintetitzats (8-mer i 12-mer), han posat de manifest que aquests s'estructuren en forma de quàdruplex de G en determinades condicions salines. En aquest sentit, **d<pTTAGGGTTAGGG>** presenta, en presència de Na^+ , una estructura de quàdruplex de G antiparal·lel bimolecular tipus cistella, en la qual els dos cicles es disposen de forma paral·lela entre ells. Tanmateix en presència de K^+ , sembla presentar una mescla d'estructures, una de les quals podria ser la mateixa que en Na^+ . Per la seva banda, **d<pTTGGTTGG>** sembla estructurar-se de forma similar tant en presència de Na^+ com de K^+ , presentant en ambdós casos una mescla d'estructures de baixa estabilitat.

Tenint en compte que en aquest treball s'han obtingut diverses acridines i s'ha comprovat que interaccionen favorablement amb estructures quàdruplex de G unimoleculars, s'ha cregut convenient estudiar si aquestes mateixes acridines també són capaces d'estabilitzar les estructures quàdruplex bimoleculars formades tant per l'octàmer, com per dodecàmer. Així doncs, s'ha decidit realitzar aquest estudi mitjançant la tècnica del DC, ja que a part de permetre avaluar l'estabilitat dels complexos formats mitjançant experiments de desnaturalització tèrmica, també permet obtenir informació sobre quin tipus de quàdruplex es forma en cada cas concret.

Abans de començar l'estudi, s'ha hagut de decidir quines acridines avaluar i en quines condicions salines. En aquest sentit, s'ha cregut convenient avaluar-ne alguna de les que millors resultats han donat en els estudis realitzats mitjançant FRET, i que a més a més presentin certa diversitat estructural entre elles. Així, s'ha decidit dur a terme l'estudi amb les acridines **A7**, **A18** i **A21**.

3.5.2.1 Estudi de l'estabilització que produeixen certes acridines a l'estructura adoptada per d<pTTGGTTGG>

S'ha començat estudiant l'efecte dels derivats acridínics **A7**, **A18** i **A21** sobre l'estructura que adopta d<pTTGGTTGG> a una concentració 50 μM en presència de KCl 100 mM i en tampó Na₂Pipes 10 mM, ja que aquestes són les condicions en les quals s'ha observat un grau més elevat d'estructuració per part d'aquest oligonucleòtid.

En primer lloc, s'ha realitzat una corba de fusió per DC a 258 nm, que és el màxim que presenta l'espectre de l'oligonucleòtid a 5°C, així com també espectres a diverses temperatures per tal de veure quina evolució presenta l'estructura en escalfar la mostra (fig. 3.44). La temperatura de fusió obtinguda ha estat de 20°C, pràcticament igual a l'obtinguda anteriorment mitjançant l'espectroscòpia UV, i en els diferents espectres s'observa que a mesura que augmenta la temperatura l'estructuració disminueix i el perfil de l'espectre varia molt sensiblement. A partir de 15°C, es pot considerar que l'esquena a 282 nm que presenta l'espectre a 2°C, deixa de ser una esquena per convertir-se en un nou pic. Apareix llavors també un mínim més pronunciat cap a 270 nm. Aquestes observacions són difícils de racionalitzar, però podrien respondre a una variació en la proporció de les diferents estructures presents en la mescla. De totes maneres aquesta diferència ha de ser molt subtil, ja que a la corba de fusió només apareix una transició clara (el canvi de pendent que s'observa al voltant de 58°C s'interpreta com un artefacte).

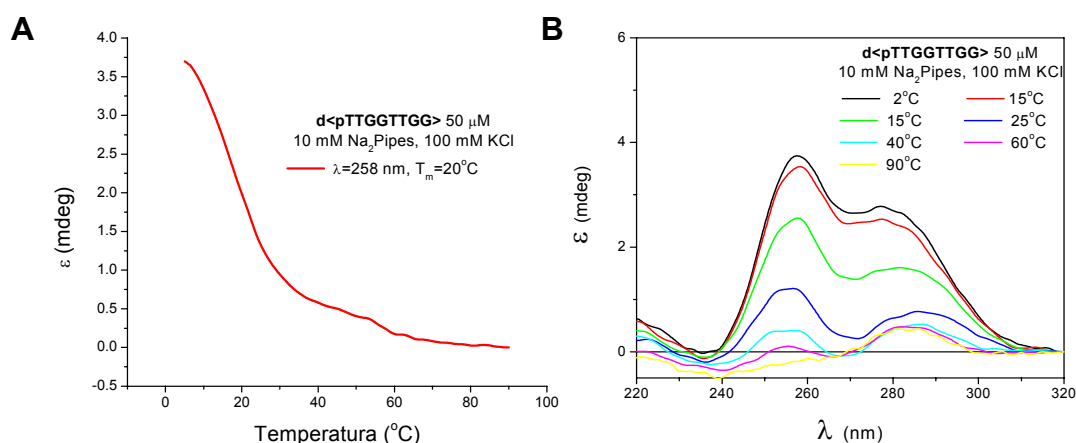


Figura 3.44 – Corba de fusió de d<pTTGGTTGG> realitzada per DC (A) i espectres de DC del mateix oligonucleòtid a diferents temperatures (B).

A partir d'aquí, s'ha avaluat l'estabilització que produeixen, en l'estructura formada, les 3 acridines anteriorment esmentades a concentracions 100, 250 i 500 μM . Per a cada concentració d'acridina diferent s'han enregistrat espectres a diferents temperatures i una corba de fusió per tal de calcular la T_m . A la taula 3.4 es mostren els increments de temperatura observats en cada assaig respecte a la T_m de l'oligonucleòtid sol, sense acridina, i a la figura 3.45 es mostren alguns dels espectres obtinguts amb cadascuna de les tres acridines avaluades, així com també les corbes de fusió obtingudes amb l'acridina **A18**.

Acridines	ΔT_m d<pTTGGTTGG> ($T_m=20^\circ\text{C}$)		
	100 μM	250 μM	500 μM
A7	15	18	22
A18	6	18	21
A21	7	18	25

Taula 3.4 – Incrementos en la T_m de d<pTTGGTTGG> produïts per les diferents acridines.

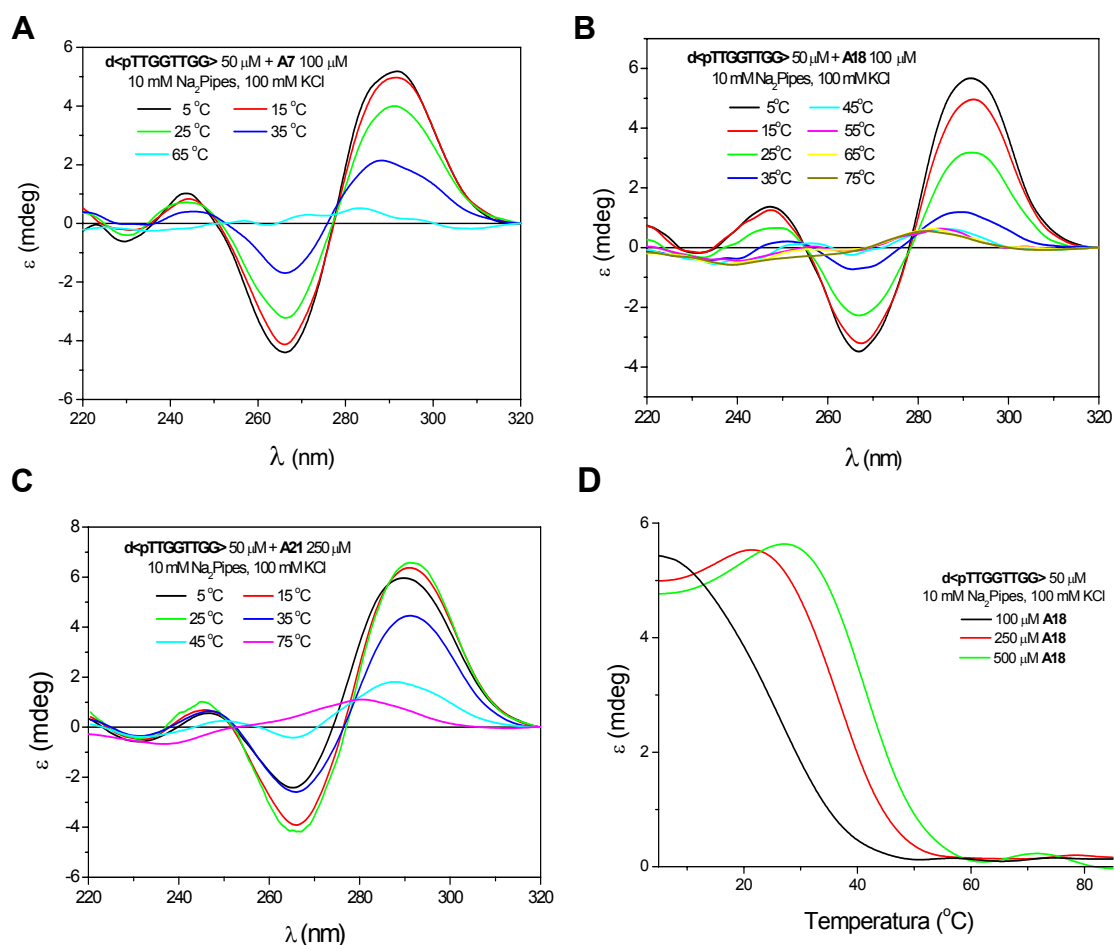


Figura 3.45 – Espectres de DC de d<pTTGGTTGG> a diferents temperatures en presència de les acridines **A7** (A), **A18** (B) i **A21** (C), i corbes de fusió de d<pTTGGTTGG> amb diferents concentracions de l'acridina **A18** (D).

El que s'observa d'entrada és, molt sorprenentment, un canvi radical en el perfil de l'espectre respecte al que presenta l'oligonucleòtid sol (fig. 3.44B). Amb cadascuna de les acridines i a totes les concentracions assajades, el perfil de l'espectre s'ha convertit en el típic d'un quàdruplex antiparal·lel, amb un màxim a 290 nm i un altre a 245 nm, separats per un mínim a 265 nm. Aquest fet indica que aquestes acridines no només interaccionen favorablement amb **d<pTTGGTTGG>** produint una estabilització de l'estructura que adopta, com es pot observar en els ΔT_m que apareixen a la taula 3.4, sinó que, a més a més, indueixen la formació d'un quàdruplex antiparal·lel. Podria ser que aquesta estructura ja fos present en la mescla observada amb l'oligonucleòtid sol, i que les acridines interaccionessin selectivament amb ella, discriminant així les altres i desplaçant l'equilibri.

Pel que fa a l'estabilització que produeixen aquestes acridines, s'observa que els increments de T_m són força considerables i similars entre les diferents acridines a partir d'una concentració 250 μM . A 100 μM , no obstant, **A7** destaca per sobre de les altres mostrant una estabilització força superior. Convé remarcar però, que aquests increments de T_m observats són en certa manera enganyosos, ja que responen a la transició d'una mescla d'estructures de poca estabilitat global a una estructura probablement única i ben definida. Així doncs, aquests resultats tenen bàsicament un valor orientatiu.

Fins ara, s'ha estudiat l'efecte que produeixen les diferents acridines en l'estructuració de **d<pTTGGTTGG>** en presència de K^+ . S'ha decidit doncs, estudiar si en presència de Na^+ també té lloc la inducció d'estructuració en forma de quàdruplex. Així, s'han enregistrat espectres de DC de **d<pTTGGTTGG>** a 50 μM en presència de NaCl 100 mM i a diferents concentracions d'**A21** (fig. 3.46).

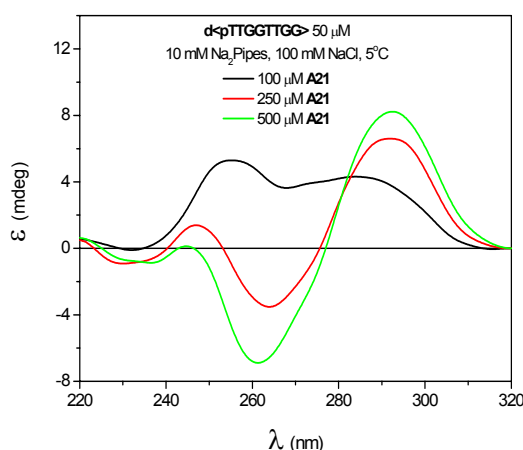


Figura 3.46 – Espectres de DC de **d<pTTGGTTGG>** en presència de Na^+ a diferents concentracions de l'acridina **A21**.

Resulta força interessant analitzar detingudament els espectres obtinguts. En primer lloc s'observa que l'octàmer presenta, a concentració 100 μM d'acridina, un perfil molt similar al que presenta en absència d'ella. No obstant, en incrementar

aquesta concentració a 250 μM , ja s'observa el canvi de perfil de l'espectre, el qual esdevé el típic dels quàdruplex antiparal·lels i que s'interpreta com un canvi d'estructura de l'oligonucleòtid. A partir d'aquí, en incrementar encara més la concentració d'acridina s'observa un augment en l'el·lipticitat de la mostra que implica un augment en el grau d'estructuració d'aquesta. Així doncs, es pot concloure que la transició observada per l'octàmer a l'interaccionar amb les acridines, té lloc tant en presència de Na^+ , com de K^+ , per bé, que amb Na^+ , la transició és més difícil i requereix una concentració major d'acridina perquè tingui lloc.

Finalment, per tal d'acabar d'estudiar aquesta interacció entre oligonucleòtid i acridina, s'ha decidit enregistrar espectres d'RMN monodimensional de **d<pTTGGTTGG>** sol en presència de Na^+ i de la mateixa mostra després de successives addicions d'acridina **A21**, per tal d'observar com es veu afectat l'espectre de l'octàmer sol (fig. 3.47).

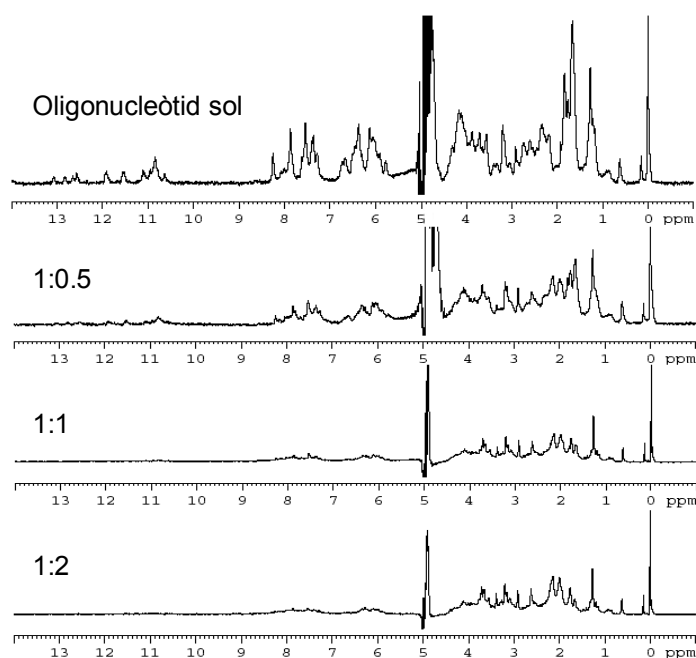


Figura 3.47 – Espectres d'RMN de ^1H de **d<pTTGGTTGG>** sol i en presència d'**A21** en diferents relacions estequiomètriques oligonucleòtid:acridina enregistrats en H_2O a 5°C a una concentració d'oligonucleòtid 0.30 mM i en presència de Na^+ 100 mM.

El que s'observa és una desaparició de les senyals de l'oligonucleòtid a mesura que augmenta la proporció d'acridina en la mostra. Aquest fet es pot interpretar com la formació d'agregats d'alt pes molecular, ja que les estructures molt grans desapareixen dels espectres d'RMN. En aquest sentit, sembla que els possibles agregats que es formen presenten certa ordenació, i per tant que no es tracta d'una agregació inespecífica. Aquesta hipòtesi sorgeix del fet que en les condicions on hi ha més oligonucleòtid que acridina, s'observen perfectament les senyals del primer.

Anteriorment, s'ha observat per DC que l'estructura que forma **d<pTTGGTTGG>** en presència d'**A21** és algun tipus de quàdruplex antiparal·lel. Així, una possible explicació dels resultats obtinguts per RMN seria la formació d'associacions entre diferents estructures quàdruplex, donant lloc a cables de G, tires molt llargues de quàdruplex superposats en un mateix eix. Aquest tipus d'estructura supramolecular es troba descrita en la literatura, però majoritàriament en quàdruplex paral·lels³⁷.

Convé remarcar, no obstant, que els espectres de DC i d'RMN s'han enregistrat a concentracions d'oligonucleòtid molt diferents, de manera que no és obvi que a 0.3 mM l'estructura que adopti l'octàmer sigui la mateixa que a 50 μ M. És per això que s'ha decidit registrar un espectre de DC de la mostra emprada en l'enregistrament dels espectres d'RMN. Aquest es mostra en la figura 3.48 i presenta el perfil típic de quàdruplex antiparal·lel. Així doncs, la hipòtesi d'agregació de diferents quàdruplex sembla verosímil.

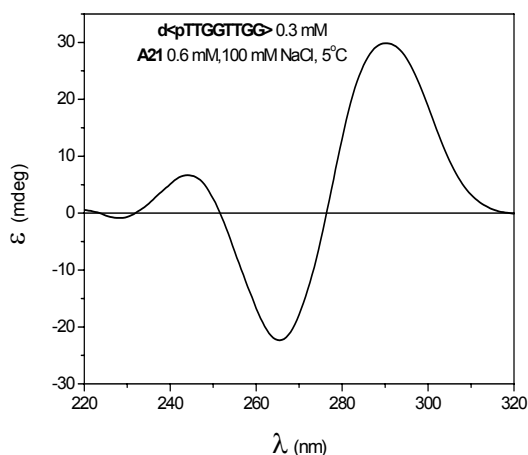


Figura 3.48 – Espectre de DC de **d<pTTGGTTGG>** en presència de Na^+ i de l'acridina **A21**.

3.5.2.2 Estudi de l'estabilització que produeixen certes acridines a l'estructura quàdruplex adoptada per **d<pTTAGGGTTAGGG>**

En l'estudi d'estabilització de l'estructura adoptada pel dodecàmer **d<pTTAGGGTTAGGG>** s'ha seguit una estratègia similar a l'utilitzada amb l'octàmer. Els canvis principals han estat que tant els espectres de DC com les corbes de fusió s'han enregistrat majoritàriament en presència de Na^+ . El motiu és que en aquestes condicions, s'ha vist que aquest oligonucleòtid presenta una estructura quàdruplex de G bimolecular antiparal·lela ben definida i que es pot assimilar als quàdruplex tipus cistella. Així, l'estudi en aquestes condicions sembla més interessant que en presència de K^+ , on no se sap exactament quina estructura adopta, però que una possibilitat és que presentés una mescla d'estructures.

Per altra banda, s'ha decidit començar a avaluar les diferents acridines a una concentració menor que en els experiments realitzats amb l'octàmer per tal de poder

afinar més en l'estudi comparatiu entre les diferents acridines. A més a més, l'oligonucleòtid **d<pTTAGGGTTAGGG>** a una concentració de 50 μM presenta una estructura molt més estable que la de **d<pTTGGTTGG>**, de manera que els increments que s'observaran segurament seran més subtils. A la taula 3.5 es mostren els increments observats per cadascuna de les 3 acridines a les diferents concentracions assajades.

Acridines	ΔT_m d<pTTAGGGTTAGGG> ($T_m=43^\circ\text{C}$)			
	50 μM	100 μM	250 μM	500 μM
A7	11	15	18	18
A18	6	11	14	15
A21	2	7	9	9

Taula 3.5 – Incrementos en la T_m de **d<pTTAGGGTTAGGG>** produïts per les diferents acridines.

En aquest cas, sí que els valors obtinguts per cadascuna de les acridines són força diferents. Com es pot observar, la que presenta una capacitat d'estabilització més elevada continua sent l'acridina **A7**, amb valors superiors als 10°C en totes les concentracions assajades. Mitjançant els experiments de FRET, s'havia observat que d'aquestes 3 acridines, l'**A21** era la que menys capacitat d'estabilització posseïa, de manera que els resultats obtinguts amb aquests experiments són coherents amb els descrits anteriorment en el capítol 2. Cal recordar que l'acridina **A7** conté anells de piperidina en ambdós extrems, mentre que tant **A18** com **A21**, només contenen un braç estabilitzador. En aquest cas, el que sembla clar, és que ja a 250 μM s'arriba a una mena de saturació, no observant-se ja cap increment de T_m .

Pel que fa als perfils dels espectres, en aquest cas no s'observa cap canvi significatiu respecte a l'espectre obtingut per l'oligonucleòtid sol. A la figura 3.49 es recullen alguns dels espectres obtinguts.

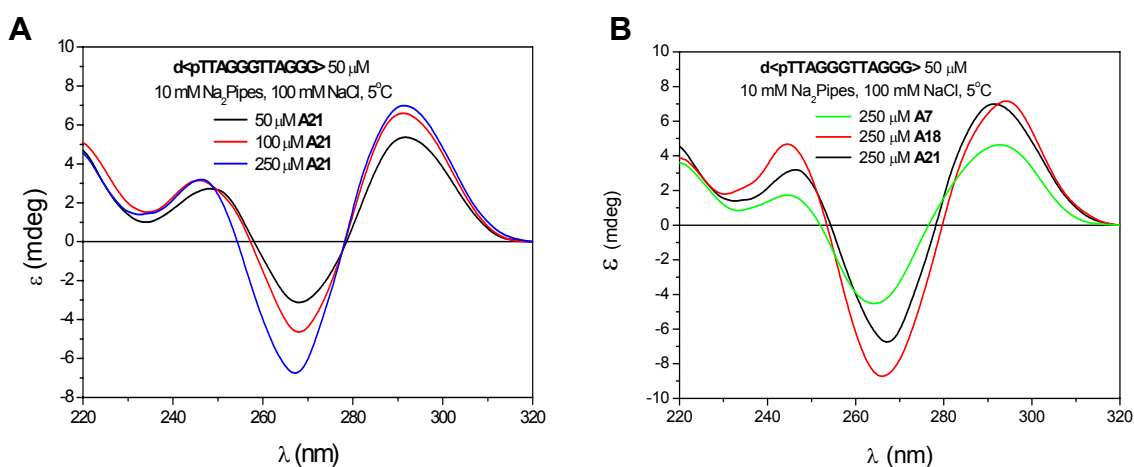


Figura 3.49 – Espectres de DC de **d<pTTAGGGTTAGGG>** a diferents concentracions de l'acridina **A21** (A), i a concentració 250 μM de cadascuna de les acridines assajades (B).

En els espectres de la figura 3.49A, és interessant observar que a mesura que augmenta la concentració d'acridina **A21** també augmenta l'el·lipticitat de la mostra, fet que normalment s'associa a una major estructuració. Així doncs, tal i com és d'esperar un augment en el grau d'estructuració de la mostra va lligat amb un augment en l'estabilitat. Sorprenentment, però, en els espectres de la figura 3.49B, aquests dos paràmetres no segueixen el mateix comportament. Si comparem els espectres de DC obtinguts per a cadascuna de les diferents acridines a la mateixa concentració, ens adonem que l'el·lipticitat major s'aconsegueix amb les acridines **A18** i **A21**, que són les que presenten capacitats d'estabilització menors. Aquest comportament és difícil d'explicar, però algunes explicacions podrien ser que l'el·lipticitat molar de cada complex oligonucleòtid-acridina fos diferent, o que tingués lloc la formació també d'estructures supramoleculares.

Finalment, s'ha cregut interessant enregistrar espectres de DC del dodecàmer **d<pTTAGGGTTAGGG>** amb alguna de les acridines en presència de K^+ , condicions en les quals l'oligonucleòtid sol presenta un espectre de DC que s'ha associat a l'existència d'una mescla de conformacions. Aquests s'han enregistrat a diferents concentracions d'**A21**, i es mostren a la figura 3.50.

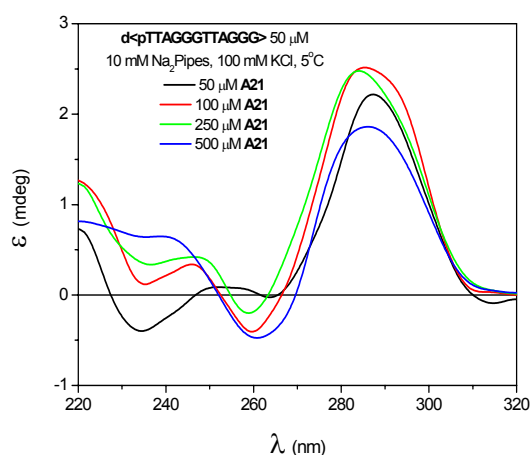


Figura 3.50 – Espectres de DC de **d<pTTAGGGTTAGGG>** en presència de K^+ a diferents concentracions de l'acridina **A21**.

En aquests, s'observa una transició de l'espectre que presentava l'oligonucleòtid sol cap a un espectre més similar als típics descrits per quàdruplex antiparal·lels. De totes maneres, les intensitats relatives entre els màxims i mínims de l'espectre no acaben de ser les habituals. Així, sembla ser que la interacció amb l'acridina comporta una evolució en l'estructura de **d<pTTAGGGTTAGGG>**, però es fa difícil assegurar de que es tracti d'un quàdruplex ben definit, com el que forma en presència de Na^+ .

3.6 Bibliografia

- ¹ Salisbury, S.A.; Wilson, S.E.; Powell, H.R.; Kennard, O.; Lubini, P.; Sheldrick, G.M.; Escaja, N.; Alazzouzi, E.; Grandas, A.; Pedroso, E. **The bi-loop: a new general four-stranded DNA motif.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**, *94*, 5515-5518
- ² Leonard, G.A.; Zhang, S.; Peterson, M.R.; Harrop, S.J.; Helliwell, J.R.; Cruse, W.B.T.; Langlois d'Estaintot, B.; Kennard, O.; Brown, T.; Hunter, W.N. **Self-association of a DNA loop creates a quadruplex: crystal structure of d(GCATGCT) at 1.8 Å resolution.** *Structure*, **1995**, *3*, 335-340
- ³ Thorpe, J.H.; Teixeira, S.C.M.; Gale, B.C.; Cardin, C.J. **Crystal structure of the complementary quadruplex formed by d(GCATGCT) at atomic resolution.** *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 844-849
- ⁴ de Vroom, E.; Broxterman, H.J.G.; Sliedregt, L.A.J.M.; Van der Mrel, G.A.; Van Boom, J.H. **Synthesis of cyclic oligonucleotides by a modified phosphotriester approach.** *Nucleic Acids Res.*, **1988**, *16*, 4607-4627
- ⁵ Barbato, S.; De Napoli, L.; Mayol, L.; Piccialli, G.; Santacroce, C. **Solid phase synthesis of cyclic oligodeoxyribonucleotides.** *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 5727-5728
- ⁶ Beaucage, S.L.; Iyer, R.P. **Advances in the synthesis of oligonucleotides by phosphoramidite approach.** *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 2223
- ⁷ Alazzouzi, E.; Escaja, N.; Grandas, A.; Pedroso, E. **A straightforward solid-phase synthesis of cyclic oligodeoxyribonucleotides.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1997**, *36*, 1506-1508
- ⁸ Frieden, M.; Pedroso, E.; Kool, E.T. **Making cyclic RNAs easily available.** *Chem. Comm.*, **1999**, 1593-1594
- ⁹ Micura, R. **Cyclic Oligoribonucleotides (RNA) by Solid-Phase Synthesis.** *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 2077-2082
- ¹⁰ Dolinnaya, N.G.; Blumenfeld, M.; Merenkova, I.N.; Oretskava, T.S.; Krynetskaya, N.F.; Ivanovskaya, M.G.; Vasseur, M.; Shabarova, Z.A. **Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation.** *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*, 5403-5407
- ¹¹ Rubin, E.; Rummey, S.; Kool, E.T. **Convergent DNA synthesis: a non-enzymatic dimerization approach to circular oligodeoxynucleotides.** *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 3547-3553
- ¹² Li, T.; Liu, D.; Chen, J.; Lee, A.H.F.; Qi, J.; Chan, A.S.C. **Construction of Circular Oligodeoxyribonucleotides on the New Structural Basis of i-Motif.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 12901-12902
- ¹³ Liu, D.; Chen, J.; Lee, A.H.F.; Chow, L.M.C.; Chan, A.S.C.; Li, T. **Small Circular Oligodeoxyribonucleotides Achieved from Self-Assembling Entities.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 797-799
- ¹⁴ Chen, J.; Liu, D.; Lee, A.H.F.; Qi, J.; Chan, A.S.C.; Li, T. **G-quadruplex as a new class of structural entities for directing the formation of circular oligodeoxyribonucleotides.** *Chem. Comm.*, **2002**, 2686-2687
- ¹⁵ Zhou, T.; Chen, G.; Wang, Y.; Zhang, Q.; Yang, M.; Li, T. **Synthesis of unimolecularly circular G-quadruplexes as prospective molecular probes.** *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, e173
- ¹⁶ Escaja, N. **Síntesis de oligonucleótidos cíclicos y su utilización en el estudio de nuevos motivos estructurales de DNA.** *Tesi Doctoral*, **1999**, Universitat de Barcelona
- ¹⁷ Reese, C.B.; Titmas, R.C.; Yau, L. **Oximate ion promoted unblocking of oligonucleotide phosphotriester intermediates.** *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *30*, 2727-2730
- ¹⁸ Germann, M.W.; Pon, R.T.; van de Sande, J.H. **A General Method for the Purification of Synthetic Oligodeoxyribonucleotides Containing Strong Secondary Structure by**

- Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography on PRP-1 Resin. *Anal. Biochem.*, **1987**, *165*, 399-405
- 19 Agrawal, S.; Iadarola, P.L.; Tamsamani, J.; Zhao, Q.; Shaw, D.R. **Effect of G-rich sequences on the synthesis, purification, hybridization, cell uptake, and hemolytic activity of oligonucleotides.** *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 2219-2224
- 20 Arghavani, M.B.; Romano, L.J. **A Method for the Purification of Oligonucleotides Containing Strong Intra- or Intermolecular Interactions by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography.** *Anal. Biochem.*, **1995**, *231*, 201-209
- 21 Mergny, J.L.; Phan, A.T.; Lacroix, L. **Following G-quartet formation by UV-spectroscopy.** *FEBS Letters*, **1998**, *435*, 74-78
- 22 Hardin, C.C.; Henderson, E.; Watson, T.; Prosser, J.K. **Monovalent Cation Induced Structural Transitions in Telomeric DNAs: G-DNA Folding Intermediates.** *Biochemistry*, **1991**, *30*, 4460-4472
- 23 Jin, R.; Gaffney, B.L.; Wang, C.; Jones, R.A.; Breslauer, K.J. **Thermodynamics and structure of a DNA tetraplex: A spectroscopic and calorimetric study of the tetramolecular complexes of d(TG₃T) and d(TG₃T₂G₃T).** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1992**, *89*, 8832-8836
- 24 Oliviero, G.; Borbone, N.; Galeone, A.; Varra, M.; Piccialli, G.; Mayol, L. **Synthesis and characterization of a bunched oligonucleotide forming a monomolecular parallel quadruplex structure in solution.** *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 4869-4872
- 25 Đapić, V.; Abdomerović, V.; Marrington, R.; Peberdy, J.; Rodger, A.; Trent, J.O.; Bates, P.J. **Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides.** *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 2097-2107
- 26 Giraldo, R.; Suzuki, M.; Chapman, L.; Rhodes, D. **Promotion of parallel quadruplexes by a yeast telomere binding protein: A circular dichroism study.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, *91*, 7658-7662
- 27 Đapić, V.; Abdomerović, V.; Marrington, R.; Peberdy, J.; Rodger, A.; Trent, J.O.; Bates, P.J. **Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides.** *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 2097-2107
- 28 Scaria, P.V.; Shire, S.J.; Shafer, R.H. **Quadruplex structure of d(G₃T₄G₃) stabilized by K⁺ or Na⁺ is an asymmetric hairpin dimer.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1992**, *89*, 10336-10340
- 29 Keniry, M.A.; Strahan, G.D.; Owen, E.A.; Shafer, R.H. **Solution structure of the Na⁺ form of the dimeric guanine quadruplex [d(G₃T₄G₃)₂].** *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *233*, 631-643
- 30 Breslauer, K. J. **Extracting thermodynamic data from equilibrium melting curves for oligonucleotide order-disorder transitions.** *Methods in Enzymology*, **1995**, *259*, 221-242
- 31 Hardin, C.C.; Perry, A.G.; White, K. **Thermodynamic and Kinetic Characterization of the Dissociation and Assembly of Quadruplex Nucleic Acids.** *Biopolymers*, **2001**, *56*, 147-194
- 32 Rangan, A.; Fedoroff, O.Y.; Hurley, L.H. **Induction of Duplex to G-quadruplex Transition in the c-myc Promoter Region by a Small Molecule.** *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 4640-4646
- 33 Han, H.; Cliff, C.L.; Hurley, L.H. **Accelerated Assembly of G-Quadruplex Structures by a Small molecule.** *Biochemistry*, **1998**, *38*, 6981-6986
- 34 Fedoroff, O.Y.; Salazar, M.; Han, H.; Chemeris, V.V.; Kerwin, S.M.; Hurley, L.H. **NMR-Based Model of a Telomerase-Inhibiting Compound Bound to a G-Quadruplex DNA.** *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12367-12374
- 35 Clark, G.R.; Pytel, P.D.; Squire, C.J.; Neidle, S. **Structure of the First Parallel DNA Quadruplex-Drug Complex.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4066-4067
- 36 Haider, S.M.; Parkinson, G.N.; Neidle, S. **Structure of a Quadruplex-Ligand Complex.** *J. Mol. Biol.*, **2003**, *326*, 117-125
- 37 Davis, J.T. **G-Quartets 40 Years Later: From 5'-GMP to Molecular Biology and Supramolecular Chemistry.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 668-698