

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Dinámica de sistemas de interés biológico.  
Estudios de flexibilidad y estabilidad en sistemas  
de puente de hidrógeno.**

JOSÉ RAMÓN BLAS PASTOR

2006

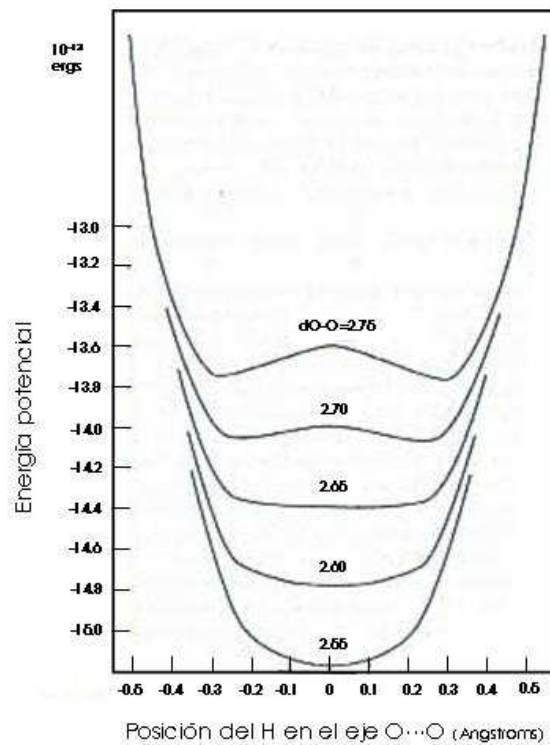
## **3. Sistemas de puente de hidrógeno en biología**

## 3.1. El puente de hidrógeno

### 3.1.1. Introducción histórica

La aparición histórica del puente de hidrógeno en la escena de la química resulta difícil de determinar. Gran número de estudios de finales de siglo XIX recogen observaciones que pueden considerarse como las primeras evidencias de este tipo de interacciones. La designación de un término específico para ellas es algo más tardía. Trabajos de químicos alemanes (Werner 1902; Hantzsch 1910; Pfeiffer 1914) se refieren a ellas empleando los términos *nebenvalenz* (“*próximo a la valencia*”) e *innere kompleksalzbildung*. (que podría traducirse como “*formación interior de una sal compleja*”). Trabajos simultáneos realizados en Inglaterra sobre las propiedades de las aminas en disolución acuosa (Moore and Winmill 1912) hablan de esta interacción mediante el término de *weak union* (unión débil). Según la explicación de Linus Pauling, el origen del concepto de puente de hidrógeno, tal y como se emplea actualmente, se debe a dos trabajos paralelos e independientes: una tesis del 1919 de M. L. Huggins de la Universidad de California, que se conoce únicamente por referencias posteriores (Huggins 1971), y el trabajo de Latimer y Rodebush (Latimer and Rodebush 1920). Sin embargo, parece que fue Pauling en su exposición general sobre la naturaleza del enlace químico (Pauling 1931) quien hizo aparecer el término “hydrogen bond” por primera vez en la literatura científica.

Varias contribuciones posteriores consolidaron la importancia del puente de hidrógeno. Algunos de estos trabajos (Huggins 1936a; b) no sólo lo introducen por primera vez de cara a explicar fenómenos químicos comunes, como la elevada constante dieléctrica del agua, sino que muestran por primera vez la existencia de puentes de hidrógeno de baja energía (*low-barrier hydrogen bonds*) y describen la variación de la energía en función de la distancia entre los átomos implicados (ver Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Variación de la energía asociada a la interacción  $\sim O-H \cdots O \sim$  en agua en función de la posición del H en el eje principal. Se muestran las curvas correspondientes a diferentes distancias  $O \cdots O$  (tomada de (Huggins 1936a)).

Sin olvidar todas las aportaciones que la preceden, podría considerarse la obra de Linus Pauling *The Nature of Chemical Bond* (Pauling 1939) como el lugar en el que el puente de hidrógeno, como concepto, queda establecido definitivamente para la comunidad científica, expresado como sigue: “*Under certain conditions an atom of hydrogen is attracted by rather strong forces to two atoms instead of only one, so that it may be considered to be acting as a bond between them. This is called a hydrogen bond*”.

### 3.1.2. Naturaleza y principales propiedades del puente de hidrógeno

Podría definirse inicialmente un puente de hidrógeno como aquella interacción entre un grupo químico dador (A-H) y un aceptor (B) que cumpla dos requisitos:

- la electronegatividad de A ha de ser elevada, de forma que pueda apropiarse parcialmente el electrón del átomo de hidrógeno, habilitándolo para unirse débilmente a B.
- B ha de poseer pares electrónicos libres o electrones  $\pi$  polarizables.

No resulta sencillo establecer la naturaleza electrónica del puente de hidrógeno, dado que bajo este término se engloban un amplio espectro de interacciones. Como extremos de esta serie se encuentran los puentes de hidrógeno más fuertes, semejantes a enlaces covalentes, y los más débiles, similares a interacciones de van der Waals.

Diferentes metodologías experimentales asocian diversas señales como indicadoras de este tipo de interacción. Así pues, desde un punto de vista espectroscópico, se reflejan en una variación de las frecuencias de vibración de los enlaces implicados. Estudios de resonancia magnética nuclear (*NMR*) observan el desplazamiento químico causado por la variación de la distribución electrónica alrededor del protón. La difracción de rayos X detecta la modificación estructural básica del complejo A-H $\cdots$ B (distancias de enlace, o ángulos). Todos estos efectos pueden detectarse hoy a partir de cálculos teóricos que nos permiten clasificar los puentes de hidrógeno en tres categorías (ver Tabla 3.1).

	<b>Fuertes</b>	<b>Moderados</b>	<b>Débiles</b>
Longitud del enlace B $\cdots$ H (Å)	~1.2-1.5	~1.5-2.2	2.2-3.2
Longitud del enlace A $\cdots$ B (Å)	2.2-2.5	2.5-3.2	3.2-4.0
Ángulo (A-H $\cdots$ B) (°)	175-180	130-180	90-150
Energía de enlace (kcal·mol <sup>-1</sup> )	14-40	4-15	<4
Frecuencia de vibración IR (% de variación relativa)	25%	10-25%	<10%
Descenso del desplazamiento químico (H <sup>1</sup> -NMR) (ppm)	14-22	<14	-

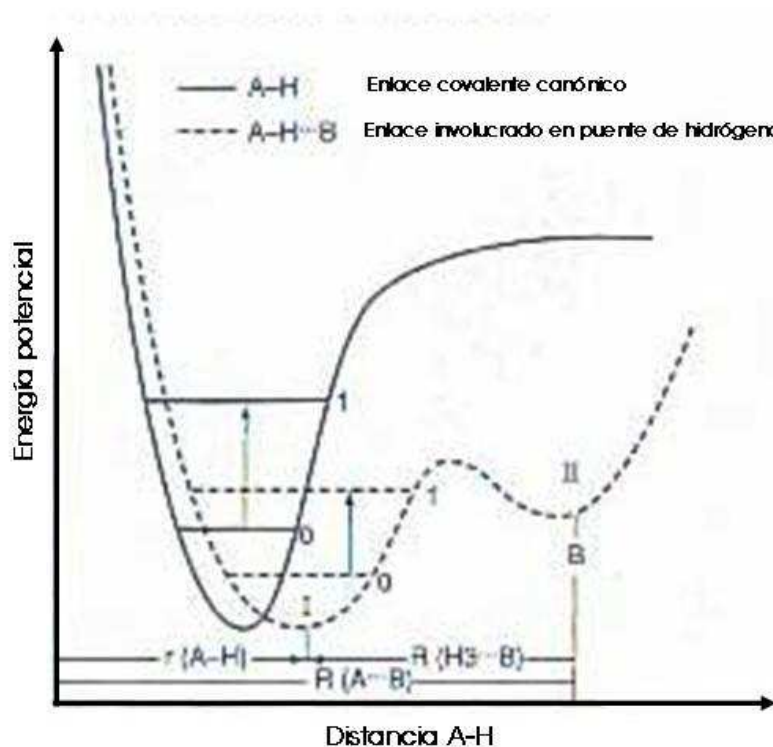
**Tabla 3.1.** Clasificación de las interacciones de puente de hidrógeno según Jeffrey (Jeffrey 1997).

Encontramos ejemplos de sistemas de interés biológico dentro de las tres categorías. Las interacciones de aniones muy electronegativos (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>) con grupos dadores neutros ( $\sim$ N-H,  $\sim$ O-H,...) entrarían en la primera. La mayoría de interacciones de puente de hidrógeno en biomoléculas implican dadores y aceptores neutros y se clasificarían propiamente como moderadas. El último grupo recoge interacciones A-H $\cdots$ B muy débiles en las que suele cumplirse alguna de estas dos condiciones:

- el átomo A es sólo ligeramente más electronegativo que el átomo de hidrógeno

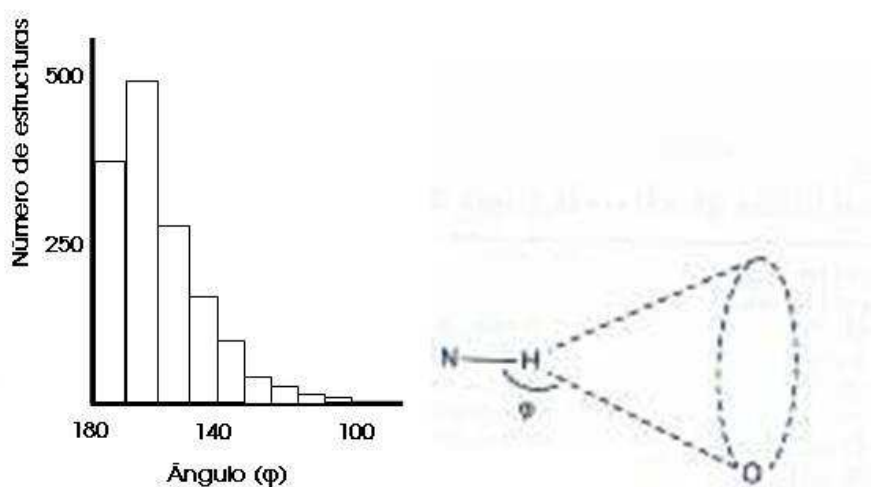
- el grupo aceptor B no presenta pares electrónicos libres sino un sistema polarizable de electrones  $\pi$

En general, tras la formación de un puente de hidrógeno ( $\sim\text{A-H}\cdots\text{B}\sim$ ), la energía del enlace A-H varía con la distancia de enlace de una forma característica. Concretamente, se ensancha la superficie de energía potencial, aparece un segundo mínimo y las energías asociadas a los diferentes niveles de vibración de *stretching* se aproximan entre sí (ver figura 3.2). No obstante, debe remarcarse que la magnitud de estos cambios varía en función del tipo de puente de hidrógeno. En las interacciones moderadas, aparecen dos mínimos asimétricos. Éstos tienden a igualarse en el caso de interacciones más fuertes, en las que también se produce una disminución de la barrera energética entre los mínimos, llegando a formarse los denominados puentes de hidrógeno de barrera baja (*low barrier H-bonds; LBHB*).



**Figura 3.2.** Energía potencial asociada a un enlace A-H en condiciones normales (línea continua) e involucrado en un puente de hidrógeno (línea discontinua). Modificado de (Jeffrey 1997).

El ángulo formado entre los átomos A-H...B determina la energía asociada a esta interacción para una distancia A-B fija y, consecuentemente, la frecuencia de aparición en la naturaleza. Las primeras exploraciones teóricas de este fenómeno situaban el mínimo de energía en  $163^\circ$  para el enlace O-H...O, como puede verse en estudios experimentales de muestreo masivo de estructuras (Newton et al. 1979) (ver figura 3.3)



**Figura 3.3.** Distribución de los ángulos asociados a 1509 estructuras cristalográficas en las que se produce un puente de hidrógeno del tipo  $\sim\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}\sim$ . Figura modificada a partir de (Jeffrey 1997).

Uno de los fenómenos, no obstante, más característicos de estas interacciones es la notable modificación de la atmósfera electrónica del átomo de hidrógeno, fenómeno que ha sido ampliamente definido en estudios teóricos. Partiendo de la observación experimental de la distribución electrónica en complejos de formamida (Stevens 1978), puede observarse una acumulación de carga en la zona del enlace covalente (A-H) y una desprotección electrónica del átomo de hidrógeno. Este efecto genera la aparición de un dipolo puntual en el extremo del grupo A-H de aproximadamente 1 D (Craven 1987).

Estudios más recientes han mostrado que la teoría de “átomos en moléculas” (*Atoms in Molecules; AIM*) (Bader 1990) proporciona una caracterización de los puentes de hidrógeno basada únicamente en la densidad de carga. Extendiendo esta estrategia, Koch y Popelier definieron una serie de ocho efectos que, al manifestarse en la densidad de carga, resultan indicativos de la existencia de un puente de hidrógeno. Según estos criterios, en toda verdadera interacción por puente de hidrógeno, se han de reflejar las siguientes características (Koch and Popelier 1995):

- una topología adecuada del gradiente de densidad electrónica, que permita una conexión topológica entre el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor
- la densidad de carga en el punto crítico de enlace ha de ser aproximadamente un orden de magnitud menor a la observada para un enlace covalente
- la laplaciana de la densidad de carga evaluada en el punto crítico de enlace ha de ser positiva y pertenecer a un determinado rango de valores
- los radios del átomo aceptor y del hidrógeno, medidos como la distancia desde el núcleo hasta un determinado contorno de densidad de carga (generalmente 0.001 u.a.), han de ser menores en el complejo que los de cada átomo por separado
- ha de disminuir la carga del átomo de hidrógeno
- el átomo de hidrógeno ha de quedar energéticamente desestabilizado al formar el complejo
- la polarización dipolar del átomo de hidrógeno ha de disminuir
- el volumen del átomo de hidrógeno ha de encontrarse ligeramente disminuido

### 3.1.3. Importancia del puente de hidrógeno en biología

La intuición de que los puentes de hidrógeno afectan muy notablemente a los fenómenos biológicos es una idea surgida de forma paralela a su descripción histórica. Ya en sus trabajos iniciales, Huggins (Huggins 1936a; b) predice que el comportamiento de muchas macromoléculas orgánicas y biológicas se entenderá mejor si se incluyen estas interacciones en su descripción química. En base a esta idea, el



mismo autor (Huggins 1943) intentó explicar los experimentos clásicos de plegamiento de  $\alpha$ -queratinas (Astbury and Street 1931; Astbury and Woods 1933), acercándose de forma muy aproximada al modelo de  $\alpha$ -hélice propuesto años más tarde.

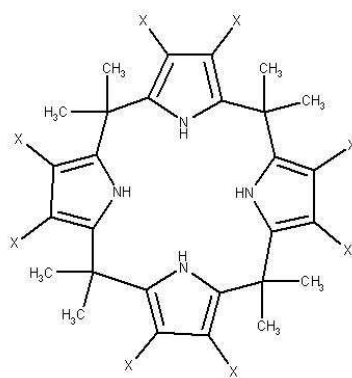
De cualquier modo, es la verificación de que este tipo de interacciones resultaban cruciales para la estabilidad de las principales estructuras secundarias de proteínas (Pauling and Corey 1951; Pauling et al. 1951) y ácidos nucleicos (Watson and Crick 1953) lo que debe considerarse como el paso fundamental en el reconocimiento de su importancia biológica. En la actualidad, no sólo se considera al puente de hidrógeno como elemento clave para entender la estructura de macromoléculas, sino también como componente de mecanismos catalíticos de enzimas, como es el caso de los puentes de hidrógeno de barrera baja.

En los siguientes apartados se estudiarán una serie de sistemas de interés biológico cuyas propiedades vienen determinadas en gran medida por la presencia de puentes de hidrógeno. Inicialmente, se verá su papel en la modulación del reconocimiento de especies aniónicas por receptores orgánicos. A continuación, se explorará el comportamiento dinámico de los ácidos nucleicos, directamente influenciado por la presencia de estas interacciones. Finalmente, se examinará cómo el grado de estabilidad o variabilidad de las pautas de puente de hidrógeno influye en el mantenimiento del código genético y en el funcionamiento correcto de aplicaciones biotecnológicas.

## 3.2. Uniones dirigidas por puente de hidrógeno en sistemas modelo: interacción anión $\cdots$ calix-[4]-pirrol

### 3.2.1. La detección de aniones mediante calix-[4]-pirrol: importancia y evolución histórica

La unión de pequeñas especies químicas (*binding*) a receptores sintéticos de tamaño medio es un objetivo particularmente importante por sus posibles aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, y hacia él se han encaminado grandes esfuerzos de investigación en los últimos años (Beer and Gale 2001; Schmidtchen 2005). Entre los esqueletos químicos más empleados en esta tarea, se encuentran los calix-[4]-pirroles (CP) (Gale et al. 1996a; Gale et al. 1998), moléculas constituidas por cuatro anillos de pirrol unidos entre sí mediante grupos metileno (ver figura 3.4).



**Figura 3.4.** Estructura básica del octametilcalix-[4]-pirrol. Las posiciones  $\beta$  (señaladas con una X) corresponden a hidrógenos en el receptor canónico y pueden encontrarse modificadas químicamente.

Se trata de un sistema asimétrico en cuanto a la naturaleza de las interacciones de puente de hidrógeno que puede formar, dado que únicamente presenta grupos dadores (A-H). Esta característica lo convierte en una herramienta especialmente adecuada para

la unión específica de grupos químicos con exceso de densidad electrónica (aniones, moléculas neutras dipolares,...) mediante la adopción de una estructura que permite la formación de cuatro puentes de hidrógeno simultáneos (ver figura 3.5).

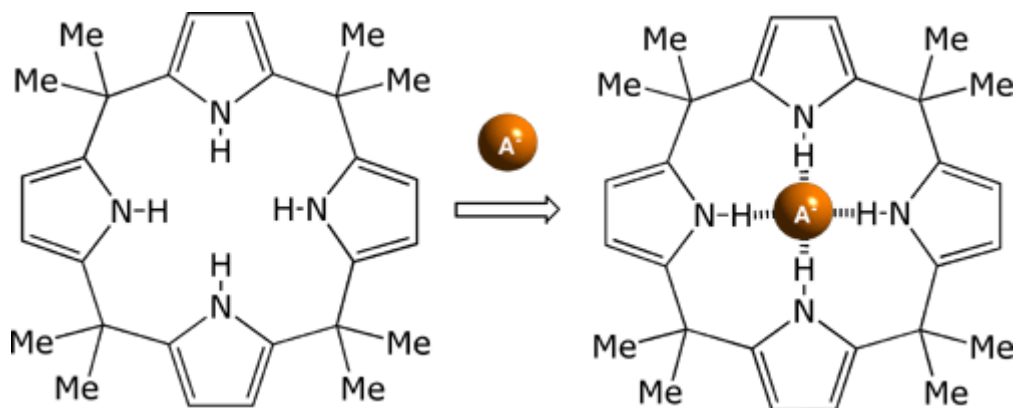


Figura 3.5. Proceso de unión de aniones por un calix-[4]-pirrol.

A pesar de que fue sintetizado por primera vez, a partir de la condensación de pirrol y acetona en medio ácido, en el siglo XIX (Baeyer 1886), el CP ha permanecido como una molécula prácticamente olvidada para la química durante más de 100 años. En la década de los 90, sin embargo, creció bruscamente su interés con la finalidad de obtener, a partir de modificaciones en su esqueleto, receptores orgánicos para la detección de una gran variedad de moléculas en diversos entornos de solvatación.

La capacidad de los CP como receptores de aniones fue descrita por primera vez hace unos 10 años (Gale et al. 1996a). De forma prácticamente inmediata, se iniciaron diversas estrategias encaminadas a optimizar esta propiedad. En un primer intento (Sessler et al. 1997), se unió el CP a un residuo de ferroceno, con el fin de cuantificar la fuerza de la unión de aniones mediante la observación de las fluctuaciones *redox* de este sistema. Los resultados fueron, no obstante, muy difíciles de racionalizar, induciendo la aparición de una nueva tendencia en el diseño de CP modificados: la transformación de estos macrociclos incoloros en moléculas capaces de cambiar sus propiedades ópticas en respuesta a una reacción de *binding* (Miyaji et al. 2000a; Beer and Gale 2001; Nishiyabu and Anzenbacher 2005). La adición covalente de marcadores químicos al CP permite detectar el *binding* mediante cambios en la fluorescencia

(Miyaji et al. 1999; Anzenbacher et al. 2000a) o en el color (Miyaji et al. 2000a; Miyaji et al. 2000b), lo que mejora su potencialidad como sensores.

No obstante, las aplicaciones comentadas se basan en la adición de grupos cromóforos pre-existentes al esqueleto básico CP, vía que resulta costosa desde el punto de vista sintético y genera receptores no siempre utilizables en entornos acuosos. Una idea muy reciente (Nishiyabu and Anzenbacher 2005) resuelve el problema de la solubilidad por la vía de introducir uno de los anillos de pirrol del CP como parte del grupo cromóforo, lo que conlleva dos ventajas adicionales: i) trabajar con moléculas de síntesis sencilla, y ii) aumentar la sensibilidad, ya que la transferencia electrónica desde el anión al grupo cromóforo asociada al proceso de *binding* es directa. Esta estrategia permite la detección colorimétrica de aniones con gran sensibilidad.

Otras mejoras importantes de cara a mejorar la especificidad de la detección de aniones han venido de la mano de los *cryptand-like receptors* (Bucher et al. 2001) y los receptores *double-cavity* (Danil de Namor and Shehab 2005), que se han revelado especialmente útiles en la discriminación entre aniones pequeños.

Una tendencia alternativa en la mejora de los CP se ha dirigido hacia la expansión de la cavidad de reacción, dando lugar a los calix-[n]-pirroles extendidos, donde  $n > 4$  (Gale et al. 1996b; Turner et al. 1998). El éxito de esta estrategia vino gracias a los trabajos de Sessler y colaboradores, que descubrieron una ruta sintética que permite su obtención de forma directa (Sessler et al. 2000a). Algunos de estos receptores expandidos se han mostrado más eficientes que los canónicos en el transporte de aniones desde fase acuosa a medios orgánicos (Cafeo et al. 2000). Una modificación interesante ha sido la introducción de residuos no-pirrólicos en la expansión de la cavidad. En concreto, la introducción de dos residuos carbazol ha conseguido mejorar la discriminación entre algunos aniones de interés biológico (Piatek et al. 2004). En esta línea, encontramos la estrategia de sustituir alguno de los anillos pirrólicos por subunidades de bipirrol o furano (Sessler et al. 2003a; b; Sessler et al. 2005b; Chen et al. 2006a), que mejora la detección de grupos carboxilato y similares (aniones “*Y-shaped*”), o la construcción de los bis-pirrolilbencenos, receptores que pueden competir con el CP canónico en la captación de aniones de pequeño tamaño (Sessler et al. 2005a).

Un recorrido más exhaustivo por la versatilidad que el esqueleto de CP ofrece para la innovación química nos llevaría a hablar de los *strapped-receptors* (Lee et al. 2005; Zhao et al. 2006), su potencial utilidad como máquinas moleculares moduladas por la unión de aniones y cationes (Miyaji et al. 2005), el desarrollo de derivados con elevada afinidad por moléculas neutras (Nielsen et al. 2004), la obtención de materiales con propiedades eléctricas singulares (Chen et al. 2005; Chen et al. 2006b) o el desarrollo de pequeñas piezas que puedan, en un futuro, acoplarse a herramientas más sofisticadas de aplicación biotecnológica, como podría ser la idea de fabricar detectores de nucleótidos basados en CP (Sessler et al. 2002).

Una ventaja importante a favor del uso de estos receptores como sensores de aniones es su facilidad de síntesis, que permite obtenerlos con alto rendimiento. Esto hace que se trate de un instrumento muy manejable en procesos industriales (Lozovanu et al. 2004). En este sentido, desde los inicios de su desarrollo como receptores aniónicos se incorporaron a soportes sólidos de cromatografía líquida de alto rendimiento (*High Performance Liquid Chromatography; HPLC*), permitiendo la detección de moléculas polianiónicas como oligonucleótidos (Gale et al. 1998; Sessler et al. 1998; Sessler et al. 2000b), y fueron la base de la construcción de electrodos sensibles a aniones (Kral et al. 1999).

Entre las modificaciones químicas que han mejorado la detección de aniones vía CP, encontramos el producto de la fluoración de las 8 posiciones beta del receptor canónico. Este nuevo macrociclo, el octafluoro-octametilcalix-[4]-pirrol (8F), proporciona un incremento notable de la avidéz por aniones pequeños, detectable experimentalmente mediante resonancia magnética ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{19}\text{F-NMR}$ ) y análisis de emisión de fluorescencia (Sessler et al. 2005c). Paralelamente, cuando estos receptores modificados fueron expuestos por primera vez (Anzenbacher et al. 2000b), se observó un enorme incremento de la afinidad por el anión dihidrógenofosfato, que los hace particularmente interesantes, al ser posible aplicarlos como sensores para fluidos biológicos.

Pese a la gran cantidad de estudios experimentales acerca de estos receptores y sus derivados químicos, muchos aspectos de su funcionamiento permanecen aún inciertos. No se conoce con precisión, por ejemplo, la influencia que tiene la naturaleza del solvente en las diferencias de afinidad de unión de varios aniones, ni hasta qué grado

pueden éstas verse afectadas por la presencia de cosolutos catiónicos o cantidades minúsculas de agua, inevitablemente añadidas junto al anión en los protocolos experimentales. Se conocen también muy parcialmente las razones que explican la peculiar afinidad del derivado 8F por el anión dihidrógenofosfato. De la misma manera, no existe una descripción detallada del escenario conformacional del receptor en su forma no unida, imprescindible para conocer la energía libre del proceso de unión. Finalmente, existe controversia entre los estudios experimentales acerca de la gran fuerza de unión del anión fluoruro ( $F^-$ ) a los receptores CP, que parece detectarse únicamente en determinados entornos de experimentación (Schmidtchen 2002).

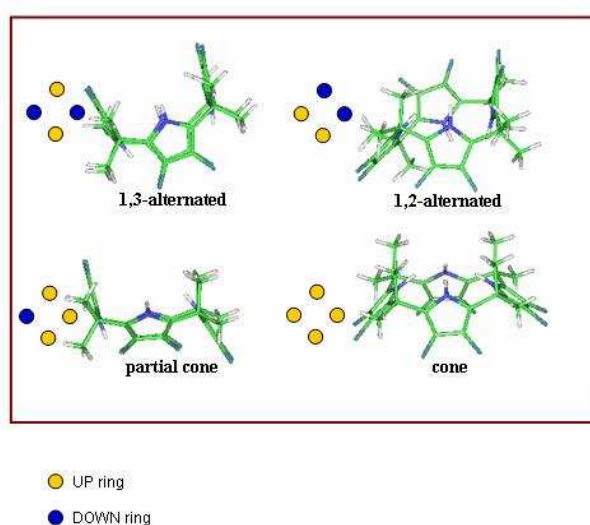
Pueden recogerse en la literatura diversos estudios teóricos surgidos en respuesta a estas cuestiones. Mediante cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad, se ha tratado de racionalizar la unión de aniones monoatómicos a CP y la preorganización del receptor en fase gas y en diclorometano, empleando métodos de solvente continuo (Wu et al. 2001; Wang and Wu 2004). Se han utilizado también metodologías clásicas, simulaciones Monte Carlo (MC) acopladas a perturbación de la energía libre (FEP), en la descripción de la unión de varios aniones al receptor pre-organizado en acetonitrilo (van Hoorn and Jorgensen 1999) o en DMSO, empleando la metodología WHAM acoplada a MC (Woods et al. 2002).

### 3.2.2. Flexibilidad del octametilcalix-[4]-pirrol

La afinidad del CP por los diferentes ligandos viene principalmente determinada por la energía libre asociada a dos procesos: i) llevar al receptor orgánico a aquella disposición tridimensional que concentre un mayor número de grupos dadores de puente de hidrógeno dirigidos a un punto común, y ii) extraer al ligando de su entorno de solvatación y hacerlo interaccionar de forma óptima con el receptor pre-organizado. Se hablará en este apartado del primer aspecto, mientras que el siguiente apartado se centrará en la unión de aniones al receptor preorganizado.

Siguiendo la tendencia general de la familia de los receptores calix-[n]-aromáticos, los CP son moléculas altamente flexibles debido especialmente a la libertad conformacional

de las uniones metilénicas que enlazan los anillos de pirrol. En base a la orientación relativa de estos anillos entre sí, pueden definirse cuatro conformaciones básicas para estos compuestos (ver figura 3.6). Cada conformación localiza un número diferente de grupos dadores de puente de hidrógeno que señalan a un punto concreto del espacio (zona óptima de unión), lo que se relaciona directamente con la afinidad por la captación de especiesceptoras. De este modo, la eficiencia para la unión de ligandos con exceso de carga negativa es máxima en la forma *cone*, media en la forma *partial cone* y menor en las conformaciones alternadas.



**Figura 3.6.** Esquema que muestra las cuatro conformaciones principales en que puede encontrarse el CP.

Pese a que se ha detectado que la conformación *cone* es la predominante en complejos 1:1 con aniones monoatómicos, las evidencias provenientes de trabajos experimentales y teóricos nos refieren un escenario estructural mucho más diverso, donde los CP no se encuentran mayoritariamente en la conformación que les permite la unión óptima. Así, la conformación 1,3-alternada predomina al cristalizar la molécula aislada (Allen et al. 1996; Gale et al. 1996a) o al analizar datos energéticos provenientes de cálculos teóricos en fase gas y medios muy apolares (Wu et al. 2001). Los datos teóricos obtenidos por Wu y colaboradores señalan a la forma *partial cone* como la segunda más probable en estas condiciones. Algunos solventes, sin embargo, preorganizan el receptor CP hacia conformaciones muy desfavorecidas en vacío, como la 1,2-alternada, que se ve estabilizada por la presencia de N,N-dimetilformamida (Allen et al. 1996).

Las diferencias energéticas entre los estados conformacionales del CP han sido evaluadas en vacío y solventes de baja polaridad (Wu et al. 2001), concediéndose, no obstante, una predominancia exagerada a la forma 1,3-alternada, que de ser cierta impediría la unión del ligando a la forma *cone*.

### 3.2.3. El octametilcalix-[4]-pirrol pre-organizado: diferencias de afinidad en la unión de aniones y otros ligandos

La mayor parte de la evidencia experimental referente a la acción de los CP como receptores aniónicos proviene de los trabajos del grupo de J.L.Sessler en la Universidad de Texas. Empleando técnicas de titración mediante resonancia magnética ( $^1\text{H-NMR titration}$ ) fueron los primeros en informar sobre la capacidad de estos macrociclos para formar complejos estables 1:1 con aniones en disolución y, lo que resultó de mayor interés, la elevada preferencia que mostraban por el anión fluoruro ( $\text{F}^-$ ) en comparación con otros aniones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HSO}_4^-$ ), como se muestra en la tabla 3.2 (Gale et al. 1996a). Análisis simultáneos en diferentes solventes muestran que el rango de ligandos que se unen con aceptable afinidad a CP es mucho más amplio, extendiéndose a moléculas como alcoholes de cadena corta, amidas y otras especies de naturaleza neutra (Allen et al. 1996) (véase tabla 3.3). En estos estudios se observa una dependencia entre solvente y energía libre de unión no siempre fácil de racionalizar.

Anión	Constante de estabilidad ( $\text{M}^{-1}$ )
$\text{F}^-$	17170 ( $\pm 900$ )
$\text{Cl}^-$	350 ( $\pm 5.5$ )
$\text{Br}^-$	10 ( $\pm 0.5$ )
$\text{I}^-$	<10
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	97 ( $\pm 3.9$ )
$\text{HSO}_4^-$	<10

**Tabla 3.2.** Constantes de estabilidad de los complejos formados entre diferentes aniones y CP en diclorometano ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) a 298 K (Gale et al. 1996a).

Análisis de rayos X (Gale et al. 1996a) sobre los complejos CP $\cdots$ anión revelaron que, tanto en el caso de  $\text{F}^-$  como de  $\text{Br}^-$ , el receptor unía los ligandos empleando una



conformación *cone*. Las distancias desde los grupos NH del pirrol al anión eran cercanas a 2.8 Å para CP...F<sup>-</sup> y alrededor de 3.3 Å en el segundo caso, lo cual subrayaban la mayor fuerza de unión del F<sup>-</sup>. Esta preferencia fue puesta, no obstante, en entredicho a raíz de un estudio calorimétrico de F.P. Schmidtchen (Schmidtchen 2002), donde se determinaron constantes de afinidad usando el mismo sistema CP...anión. Al tratar de reproducir para otros solventes más polares (en este caso, acetonitrilo) los datos obtenidos por Sessler en diclorometano, se observaron incongruencias demasiado grandes como para ser atribuidas *a priori* al diferente entorno químico, sugiriendo que tal vez el contraión estaba teniendo un papel no considerado pero clave para modular la unión.

Ligando	Constante de estabilidad (M <sup>-1</sup> )
MeOH (metanol)	12.7 ± 1.0
EtOH (etanol)	10.7 ± 0.7
BuOH (butanol)	9.7 ± 0.7
Pr <sup>i</sup> OH (isopropanol)	7.0 ± 0.4
Bu <sup>s</sup> OH (sec-butanol)	6.2 ± 0.4
Éster etílico de N-formilglicina	13.3 ± 1.0
DMF (N,N-Dimetilformamida)	11.3 ± 0.8
N,N-Dimetilacetamida	9.0 ± 0.9
1,1,3,3-Tetrametilurea	2.2 ± 0.1
DMSO (Dimetilsulfóxido)	16.2 ± 1.1
1,2-Dimetilimidazol	5.4 ± 0.3
Acetona	2.2 ± 0.2

**Tabla 3.3.** Constantes de estabilidad de los complejos formados entre diferentes moléculas neutras y CP en hexano (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) a 298 K (Allen et al. 1996)

El escenario conformacional del CP unido a compuestos neutros es mucho más rico que en el caso de especies aniónicas. La unión de metanol, por ejemplo, parece estabilizar la conformación 1,3-alternada, mientras que los cristales en presencia de DMF muestran muy frecuentemente la conformación 1,2-alternada (Allen et al. 1996). Asimismo, mientras que las moléculas de metanol no quedan excesivamente unidas al receptor (distancias N...O alrededor de 3.2 Å), las moléculas de DMF sí lo están (distancias N...O de 2.9 Å). Estos datos sugieren la presencia de alguna interacción estabilizante, posiblemente del tipo π-π, entre la N,N-dimetilformamida y los anillos de pirrol.

En resumen, a pesar del volumen de datos disponible, muchos aspectos permanecen sin ser entendidos, planteando cuestiones relativas a la influencia del solvente en la unión

CP-ligando, la afinidad relativa de  $F^-$  vs otros ligandos, las diferencias observadas al utilizar diferentes técnicas experimentales, el papel de la fluoración del receptor o el mecanismo cinético que modula la unión ión-CP. En este punto los estudios teóricos pueden proporcionar información útil e inasequible para los métodos experimentales.

### **3.3. Comportamiento de sistemas biológicos basados en puente de hidrógeno: estructura y flexibilidad de los ácidos nucleicos**

*“¿Cómo podemos, desde el punto de vista de la física estadística, conciliar el hecho de que en la estructura genética parece participar un número relativamente pequeño de átomos [...] con que, sin embargo, exhiba una actividad de lo más regular y sujeta a ley, con una durabilidad o permanencia que roza lo milagroso?”* (Schrödinger 1944).

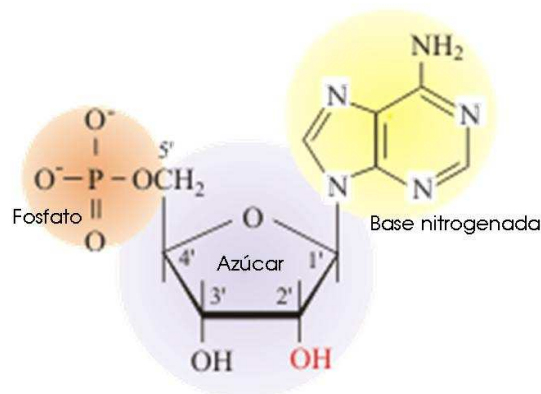
Poco antes de las primeras evidencias experimentales contundentes acerca de la naturaleza química del material genético (Avery et al. 1944) y de la publicación del modelo teórico de su estructura tridimensional (Watson and Crick 1953), Erwin Schrödinger expresaba con esta frase, sin aún conocer con precisión a qué sistema se refería, su asombro acerca de las propiedades del ADN, cuya estructura química permite a los seres vivos conservar generación tras generación sus rasgos estructurales.

La descripción de la naturaleza química de este biopolímero, cuya estructura viene marcada por una compleja pauta de puentes de hidrógeno, sus diferentes posibilidades de disposición tridimensional, su flexibilidad esencial y la reactividad química de sus componentes, serán los puntos tratados en este apartado, con el propósito de acercarnos a una mejor comprensión de su funcionamiento en los sistemas vivos.

#### **3.3.1. Naturaleza química de los ácidos nucleicos**

### 3.3.1.1. Componentes estructurales básicos

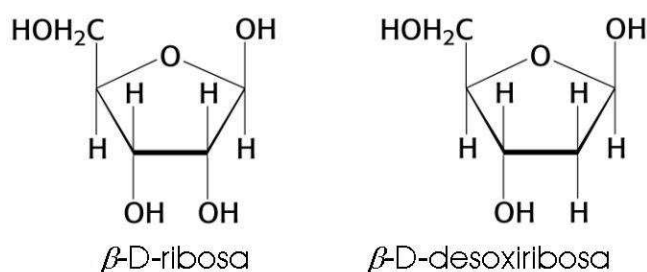
La unidad fundamental de los ácidos nucleicos es el *nucleótido*. Consta de tres subunidades: un anillo flexible de naturaleza glucosídica, un grupo fosfato con carga negativa y un heterociclo aromático (ver figura 3.7).



**Figura 3.7.** Estructura química básica del nucleótido 2'-deoxi-timidina, en la que pueden observarse los tres componentes principales de un nucleótido genérico.

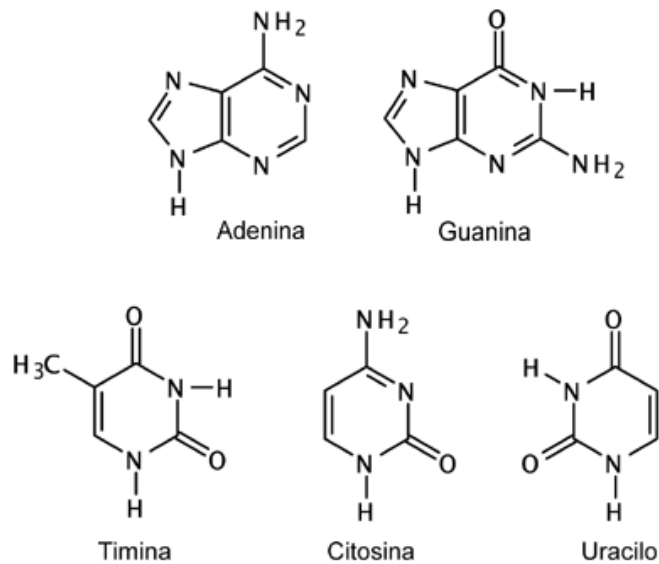
La naturaleza química de cada uno de estos componentes puede ser muy variable, dando lugar a los diferentes tipos de ácidos nucleicos que podemos encontrar, tanto en los seres vivos como provenientes de síntesis artificial. De todos ellos, nos centraremos en aquellos esqueletos que constituyen los ácidos nucleicos de mayor relevancia biológica.

Como anillos glucosídicos más frecuentes se encuentran la  $\beta$ -D-ribosa (constituyente del ARN) o  $\beta$ -D-desoxirribosa (en el ADN), cuya estructura se muestra en la figura 3.8.



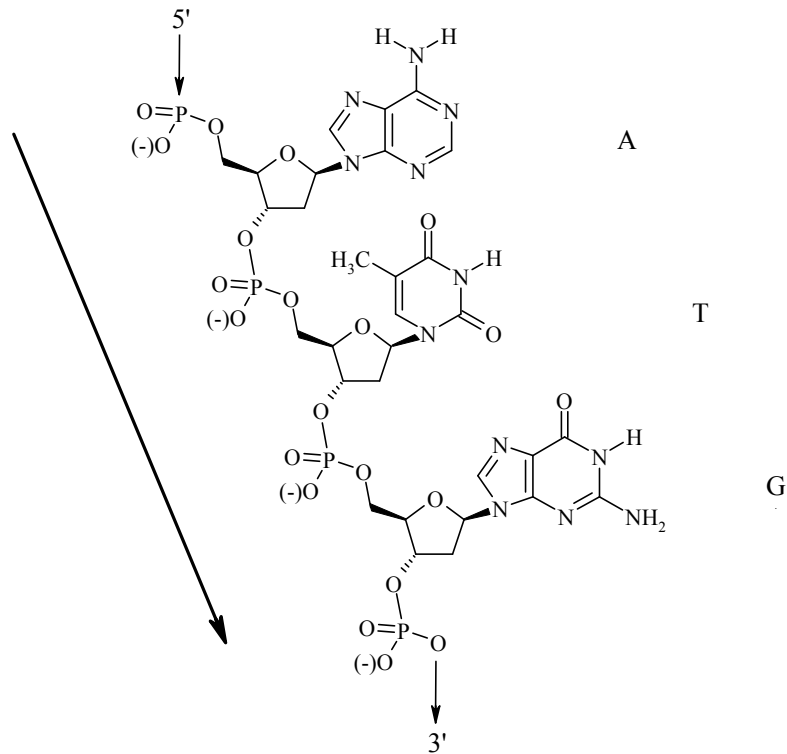
**Figura 3.8.** Estructura química básica de los azúcares cíclicos que constituyen los ácidos nucleicos principales (ARN y ADN).

Las bases nitrogenadas son heterociclos aromáticos planos. En función de su esqueleto químico se clasifican en bases púricas y pirimidínicas. En la figura 3.9 se muestran aquellas bases que encontramos de forma mayoritaria en el ADN (Adenina, Guanina, Citosina, Timina) y en el ARN (donde Uracilo sustituye a Timina).



**Figura 3.9.** Estructura química de las bases nitrogenadas más frecuentes en ADN y ARN. En adelante se abreviarán como sigue (A, Adenina; C, Citosina; G, Guanina; T, Timina; U, Uracilo).

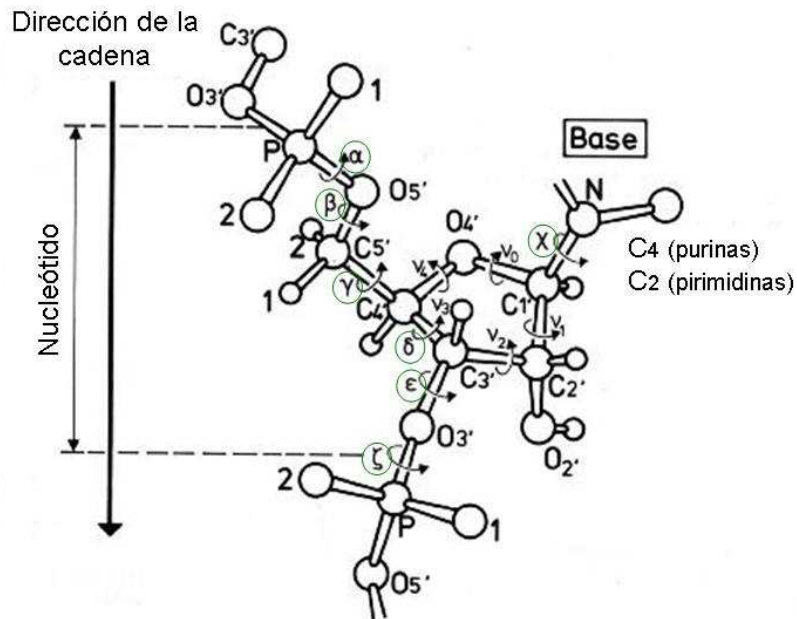
En un nucleótido codificante, la base nitrogenada se une al azúcar mediante un enlace  $\beta$ -glucosídico y el fosfato se une por esterificación al carbono 5'. El ensamblaje de varios nucleótidos para formar una cadena se realiza por medio de enlaces fosfodiéster, en los que el grupo fosfato conecta los carbonos 5' y 3' de los nucleótidos adyacentes. Este mecanismo de polimerización da lugar a cadenas que presentan una direccionalidad química (véase figura 3.10), que resulta determinante para el reconocimiento de los ácidos nucleicos y el desarrollo de sus funciones biológicas.



**Figura 3.10.** Fragmento de un ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena sencilla con la secuencia adenina, timina y guanina unido por enlaces 3', 5'-fosfodiéster. La flecha indica la direccionalidad química (5'→3') de la cadena.

### 3.3.1.2. Flexibilidad conformacional

Existen diversos puntos generadores de flexibilidad conformacional en los ácidos nucleicos. Estos son, principalmente, la variación estructural del anillo glucosídico, la isomería estructural *syn/anti* entre base y azúcar, y la fluctuación del valor de diversos ángulos diedros como el definido por el enlace C4'-C5' o los enlaces del grupo fosfato. En resumen, como se muestra en la figura 3.11 (Saenger 1984), es necesario especificar el valor de siete ángulos diedros ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\chi$ ) y la conformación del anillo furanósico para que la estructura secundaria del ácido nucleico quede caracterizada.



**Figura 3.11.** Detalle del esqueleto de una cadena de ADN. Indicados en verde se muestran los diedros responsables de su flexibilidad conformacional (modificada a partir de (Saenger 1984)).

### 3.3.1.2.1. Conformación del anillo de azúcar

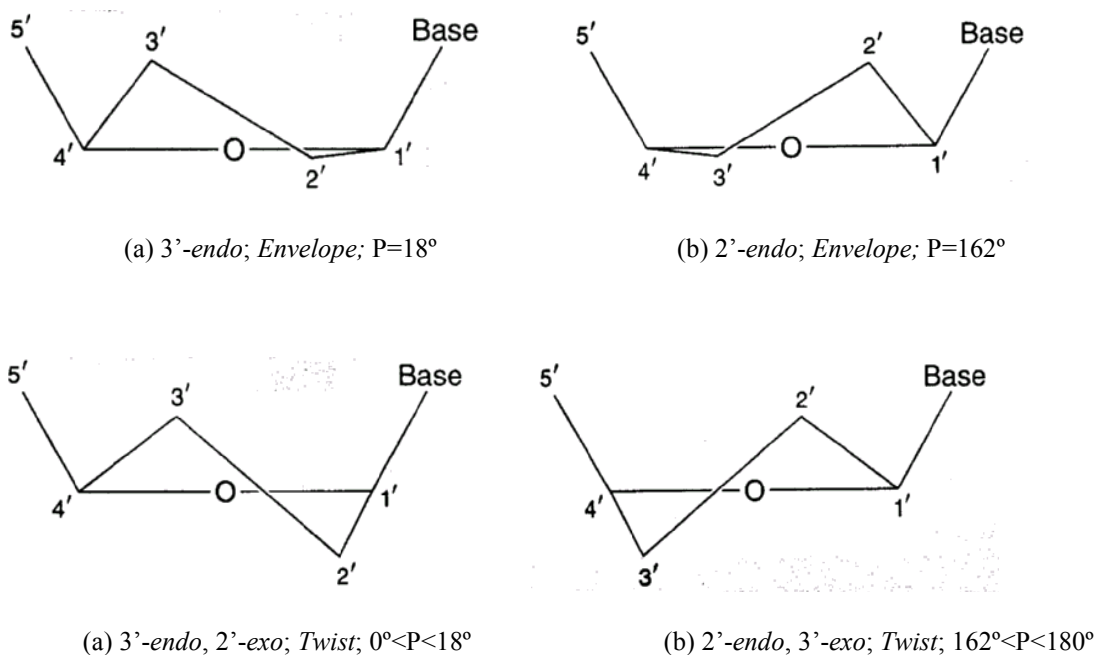
La disposición estructural del anillo glucosídico en los ácidos nucleicos se conoce normalmente con el nombre de *puckering* (empaquetamiento). Al tratarse de una estructura cíclica, la rotación de los diedros queda más restringida y las fluctuaciones de un diedro están correlacionadas con las del resto. En este sentido, la definición de parámetros como el ángulo de pseudorrotación o ángulo de fase ( $P$ ) (ecuación 3.1) y la amplitud de *puckering* ( $v_m$ ) (ecuación 3.2), ayuda a simplificar la descripción conformacional de estos ciclos (Altona et al. 1968; Altona and Sundaralingam 1972). El primero de estos parámetros informa sobre qué átomos quedan fuera del plano y el segundo indica el grado de desviación de la planaridad. Ambos pueden obtenerse mediante las siguientes expresiones

$$\tan P = \frac{(v_4 + v_1) - (v_3 + v_0)}{2v_2(\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)} \quad (3.1)$$

$$v_m = \frac{v_2}{\cos P} \quad (3.2)$$

donde los diferentes  $v_i$  hacen referencia a cada uno de los diedros mostrados en la figura 3.11.

El anillo de azúcar suele presentarse en conformaciones no planares tipo *envelope* (E; un átomo queda fuera del plano definido por los otros cuatro) o *twist* (T; dos átomos quedan fuera del plano) (ver figura 3.12), siendo los conformeros E ligeramente más estables.



**Figura 3.12.** Nomenclatura referente a los tipos de *puckering* del azúcar presentes en los ácidos nucleicos.

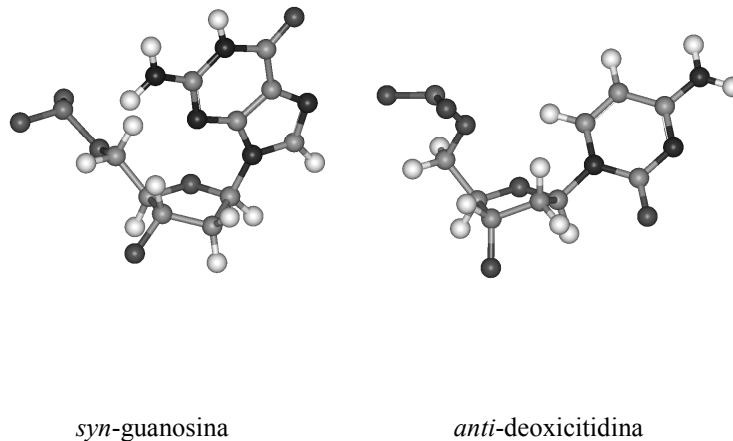
Resulta frecuente la utilización de una nomenclatura alternativa que indica el nombre del átomo que se desvía del plano y la dirección de esta desviación. Así pues, en las formas *endo* el átomo desviado se encuentra en la misma cara que el átomo C5', mientras que en las formas *exo* la desviación es opuesta (Jardetzky 1960). Adicionalmente, puede emplearse otra nomenclatura más simple, basada únicamente en el valor del ángulo de fase (P). El valor de éste puede oscilar entre 0 y 360 grados, proporcionando información sobre todos los posibles tipos de *puckerings* de la ribosa. A partir de aquí, pueden definirse cuatro zonas principales: Norte (N,  $P \approx 0^\circ$ ), Sur (S,  $P \approx 180^\circ$ ), Este (E,  $P \approx 90^\circ$ ) y Oeste (W,  $P \approx 270^\circ$ ).

Experimentalmente se detectan dos familias conformacionales mayoritarias, la C2'-*endo* ( $P = 144-190^\circ$ ) o sur (S), y la C3'-*endo* ( $P = 0-36^\circ$ ) o norte (N) (de Leeuw et al. 1980). En el caso de nucleótidos simples en solución, se da una fluctuación equilibrada

entre ambas conformaciones. En el caso de cadenas polinucleotídicas, no obstante, se generan poblaciones mayoritarias de uno u otro isómero estructural. La vía de transición conformacional entre ambos, que presenta una barrera energética modesta de alrededor de 1-2 kcal/mol, pasa de modo predominante por la conformación O4'-*endo*, indicando que las conformaciones de la zona W presentan mayor inestabilidad.

### 3.3.1.2.2. Isomería estructural *syn/anti* entre base y azúcar

La posición relativa de la base respecto al azúcar viene determinada por el valor del ángulo  $\chi$  y se designa mediante los términos *syn/anti* (Donohue and Trueblood 1960; Haschemeyer and Rich 1967), que indican, respectivamente, si la ribosa eclipsa la base o si quedan ambas en posiciones opuestas (ver figura 3.13).



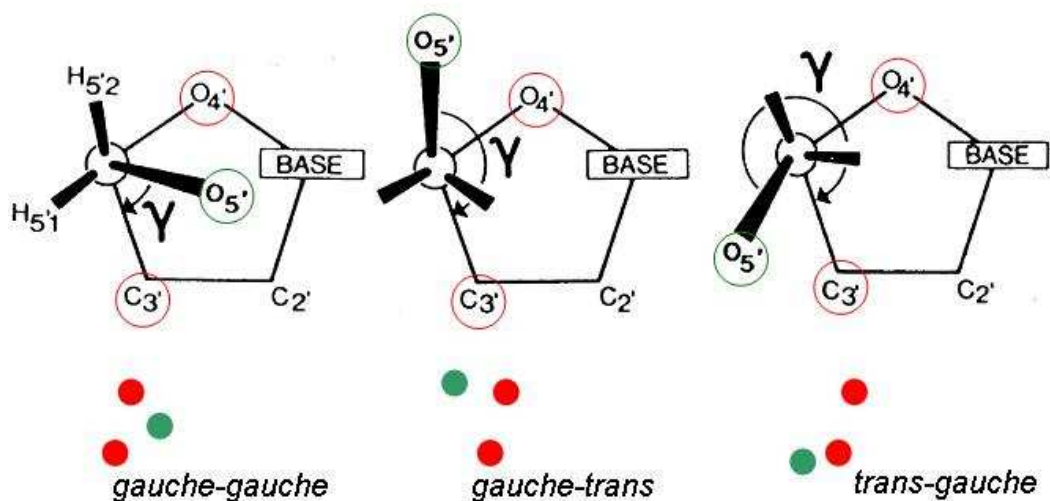
**Figura 3.13.** Conformaciones *syn* y *anti* de los nucleósidos dG y dC.

El valor del diedro  $\chi$  para las conformaciones *syn* está en torno a 49°, siendo ~210° en las *anti*. Debido a la presencia de choques estéricos, los nucleósidos pueblan casi exclusivamente la zona *anti* (Sundaralingam 1976), siendo la guanosina la única base que visita con baja frecuencia conformaciones *syn* (Young et al. 1974). La diferencia energética en disolución acuosa, no obstante, no resulta especialmente elevada (1-2 kcal/mol) (Saran et al. 1973), lo que permite que la formación de interacciones favorables entre base y azúcar pueda revertir las preferencias conformacionales.



3.3.1.2.3. Rotaciones del enlace C4'-C5' ( $\gamma$ )

La observación del enlace C4'-C5' mediante una proyección de Newmann permite definir tres conformaciones alternadas en base a la posición del átomo C5' respecto a los átomos C3' y O4' del anillo, cuya nomenclatura se muestra en la figura 3.14.



**Figura 3.14.** Nomenclatura de los diferentes isómeros rotacionales del diédrico  $\gamma$  en ácidos nucleicos: gauche-gauche (gg), gauche-trans (gt) y trans-gauche (tg) (modificada a partir de (Saenger 1984)).

La flexibilidad de este diédrico juega un papel crucial en el posicionamiento del grupo fosfato respecto al azúcar y la base nitrogenada. La población relativa de los tres conformeros depende del pucker de la ribosa y de la naturaleza de la base. Si la base es del tipo purina y el *pucker* es canónico (C2'-endo o C3'-endo), las formas gg y gt presentan una frecuencia similar, mientras que la conformación tg resulta muy extraña y sólo aparece con *puckerings* C2'-endo. Si la base es pirimidínica, la conformación gg es la mayoritaria independientemente de la estructura de la ribosa. La formación de interacciones de puente de hidrógeno de tipo débil (interacciones  $\sim\text{O}\cdots\text{H}-\text{C}\sim$ ) entre el

O5' y la base nitrogenada parece ser la causa de la estabilización de la conformación *gg* frente al resto.

#### 3.3.1.2.4. Rotación respecto a los enlaces del grupo fosfato ( $\alpha, \beta, \delta, \varepsilon$ )

Los enlaces rotables del esqueleto fosfodiéster (figura 3.11) confieren una flexibilidad adicional a las cadenas polinucleotídicas. Los valores de estos ángulos están fuertemente correlacionados entre sí y con el *puckering* y el ángulo  $\chi$  (Olson 1982). Según la estructura secundaria que adopte el ácido nucleico, la naturaleza de la base nitrogenada y las condiciones experimentales, su valor puede ser muy variable. En la tabla 3.4 se muestran valores promedio para cada uno de los diedros en diferentes condiciones (Blackburn and Gait 1990).

Tipo de estructura	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\varepsilon$	$\zeta$
A-ADN (fibras)	-50	172	41	79	-146	-78
GGCCGGCC	-75	185	56	91	-166	-75
B-ADN (fibras)	-41	136	38	139	-133	-157
CGCGAATTCGCG	-63	171	54	123	-169	-108
Z-ADN (residuos C)	-137	-139	56	138	-95	80
Z-ADN (residuos G)	47	179	-169	99	-104	-69
híbrido ADN-ARN	-69	175	55	82	-151	-75
A-ARN	-68	178	54	82	-153	-71

**Tabla 3.4.** Valores promedio (en °) de los diedros del grupo fosfodiéster en diferentes tipos de ácidos nucleicos.

#### 3.3.1.3. Propiedades fisicoquímicas

Las interacciones de las bases nitrogenadas entre sí y el reconocimiento de la fibra por factores externos, fenómenos cruciales en la funcionalidad biológica del ADN, están enormemente influenciados por las características fisicoquímicas de los nucleótidos individuales. Propiedades como la densidad de carga, el valor de  $pK_a$  o el estado tautomérico de las bases, deben ser conocidos de cara a una mejor comprensión del comportamiento de esta biomolécula.

#### 3.3.1.3.1. Densidad de carga

Los nucleótidos son moléculas polares con una distribución heterogénea de la densidad electrónica, lo que determina la localización de las interacciones con ligandos cargados o polares. Diversos átomos aglutinan un exceso de carga, actuando como aceptores de posibles interacciones de puente de hidrógeno o de tipo iónico. En concreto, las bases nitrogenadas presentan momentos dipolares elevados por su distribución asimétrica de carga. Los pares de electrones libres de los grupos carbonilo ( $\sim\text{C}=\text{O}$ ) y de los átomos de nitrógeno hacen a estos grupos buenos aceptores de puente de hidrógeno, siendo buenos dadores los grupos amino ( $\sim\text{N}-\text{H}$  o  $\sim\text{N}-\text{H}_2$ ).

El patrón de reconocimiento de los ácidos nucleicos mediante puente de hidrógeno es aún más rico si consideramos la presencia en el esqueleto de azúcar-fosfato de átomos que pueden actuar como grupos aceptores. Los átomos terminales del grupo fosfato serían los que presentan mayor densidad de carga negativa, siendo de menor importancia el resto de átomos de oxígeno del esqueleto ( $\text{O}2'$ ,  $\text{O}3'$ ,  $\text{O}4'$  y  $\text{O}5'$ ).

#### 3.3.1.3.2. Ionización

La variación del estado de protonación de un nucleótido modifica fundamentalmente su escenario tautomérico, comprometiendo sus propiedades de reconocimiento y su función biológica. En un amplio rango alrededor del pH fisiológico ( $\text{pH}\sim 5-9$ ), las bases nitrogenadas permanecen en estado neutro (Saenger 1984). Resulta aún más estable el estado de protonación de las pentosas, que precisan pH cercanos a 12 para ionizarse. En condiciones de neutralidad, los grupos fosfatos de un polinucleótido presentan una carga de -1, confiriéndole al ADN su naturaleza polianiónica.

#### 3.3.1.3.3. Tautomería

La población de las diferentes formas tautoméricas de un nucleótido, resulta determinante en sus propiedades de reconocimiento molecular. Tanto en su función de transmisor de información biológica como en la capacidad de ser “leído” por la maquinaria celular, el ADN precisa de la estabilidad tautomérica de sus constituyentes.

Pueden distinguirse, en las bases nitrogenadas, dos tipos básicos de equilibrio tautomérico el equilibrio ceto-enol y el equilibrio amino-imino. Una gran evidencia experimental (Saenger 1984) indica claramente la predominancia de las formas ceto-amino para las bases canónicas. Como se verá en el apartado 3.3.4, cambios en la estructura química de las bases (oxidaciones, metilaciones, introducción de átomos pesados...) o condiciones de entorno muy especiales (presencia de iones, secuencias determinadas,...) pueden estabilizar otras formas como las enol-inmino, cambiando radicalmente las pautas de reconocimiento molecular del nucleótido.

### 3.3.2. Principales fuerzas que determinan la estructura secundaria de los ácidos nucleicos

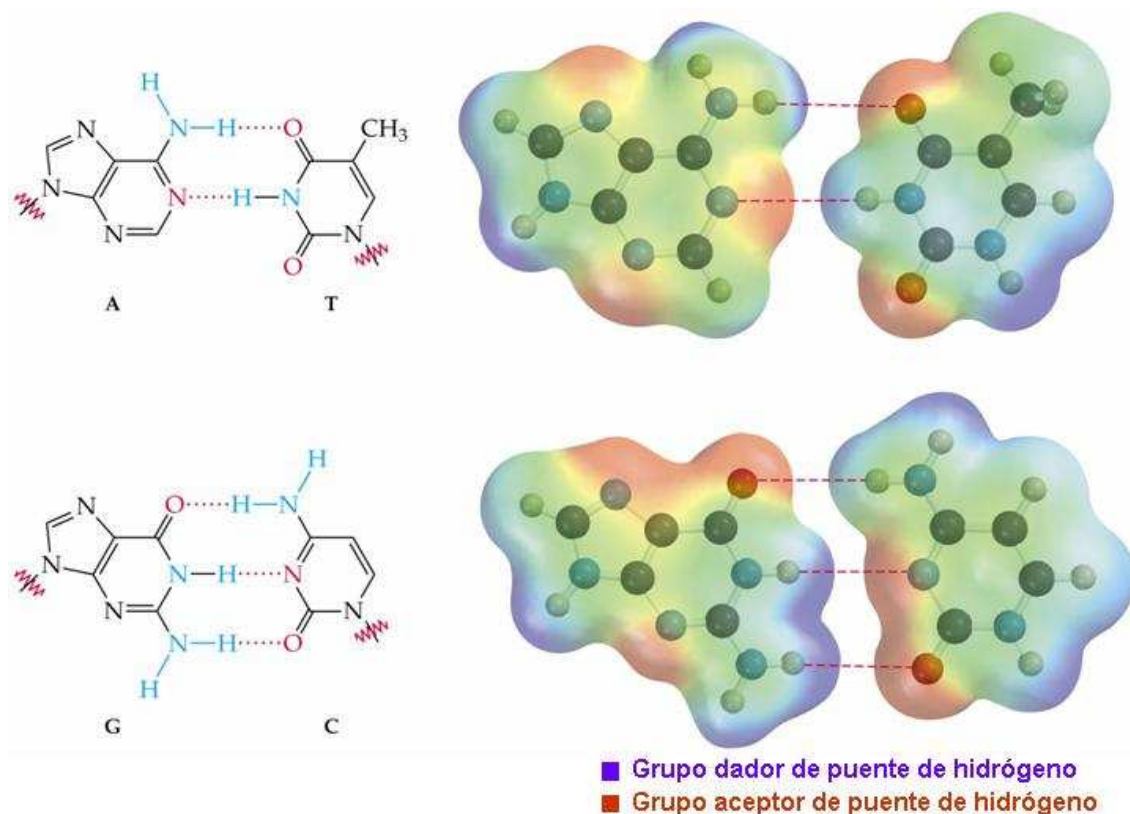
Los requerimientos estructurales de los ácidos nucleicos son el fruto de la necesidad de estabilizar zonas cercanas con una elevada densidad de carga negativa (grupos fosfato), sosteniendo una estabilidad mecánica suficientemente intensa que no evite la flexibilidad necesaria para permitir los procesos de replicación, transcripción o recombinación. La estructura y la flexibilidad de este sistema tan peculiar se modelan gracias al concurso de varias fuerzas. Principalmente, podemos distinguir tres tipos de interacciones responsables de definir y estabilizar la conformación del ADN:

- interacciones de puente de hidrógeno entre bases
- interacciones de apilamiento o *stacking* entre las bases
- efecto del solvente

#### 3.3.2.1. Interacciones de puente de hidrógeno

En este apartado se expondrá brevemente la acción moduladora de las interacciones por puente de hidrógeno en la estructura del ADN, y en la sección 3.3.4. se examinarán los problemas asociados a la presencia de anomalías causadas por la inestabilidad tautomérica de las bases en las pautas de reconocimiento por puente de hidrógeno.

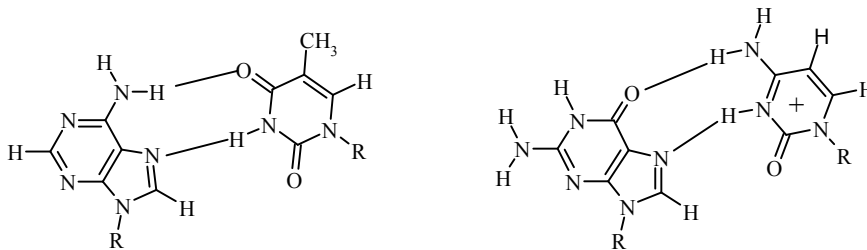
La disposición de grupos dadores y aceptores de puente de hidrógeno hace que cada base presente un perfil de reactividad único, que le permite establecer contactos específicos con otras moléculas. El reconocimiento de las bases canónicas entre sí a través de los denominados pares Watson-Crick (WC) (Watson and Crick 1953) define los apareamientos más frecuentes del ADN (Adenina·Timina y Guanina·Citosina) en condiciones fisiológicas (ver figura 3.15).

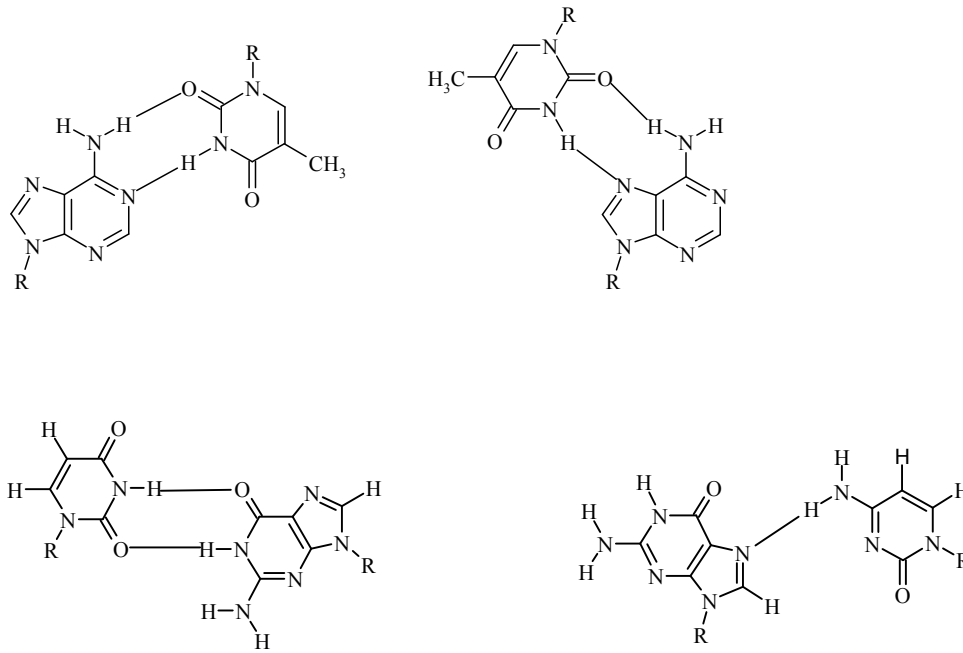


**Figura 3.15.** Interacciones canónicas WC entre las bases del ADN. Representación de la estructura química de las bases y de los puentes de hidrógeno formados (izquierda), así como de la propensión a la donación/acepción de este tipo de interacciones (derecha).

Las interacciones WC, al condicionar la estabilidad del mensaje genético, presentan una notable importancia. No obstante, el perfil de reactividad de las caras externas de las bases es otra valiosa fuente de información, pues modula el reconocimiento de la fibra de ADN por factores externos (moléculas de solvente, iones, fármacos, proteínas reguladoras...) y es determinante en la formación de estructuras helicoidales de ADN de orden superior a las bicatenarias (*tríplexes, tetráplexes,...*).

A pesar de su importancia, los pares WC no son los únicos posibles, pudiendo formarse complejos alternativos. Así, tenemos pares que surgen de rotar  $180^\circ$  una de las bases implicadas (*reverse Watson-Crick ; rWC*), interacciones donde intervienen las posiciones 6, 7 y 8 de purinas (interacciones tipo *Hoogsteen*), que también pueden presentarse en su forma invertida (*reverse Hoogsteen; rH*), o aquéllas donde el reconocimiento entre las caras (WC o *Hoogsteen*) está desplazado, formando un menor número de puentes de hidrógeno estables (interacciones tipo *wobble*) (ver figura 3.16). En ocasiones, tales apareamientos favorecen la estabilidad de formas tautoméricas o estados de protonación inexistentes en otras condiciones. Finalmente, no podemos olvidar la posibilidad de reconocimientos incorrectos del tipo Pur·Pyr, Pyr·Pyr o Pur·Pur, lo que constituye un mosaico de interacciones complejísimo.





**Figura 3.16** Apareamientos no canónicos entre bases del ADN. Arriba pueden verse los del tipo *Hoogsteen* entre pares A·T y entre G y la citosina protonada. En medio se muestran apareamientos entre A·T de tipo rWC y de tipo rH y abajo aparece el tipo ‘*wobble*’ entre U·G y G·C (*Hoogsteen*).

### 3.3.2.2. Interacciones de apilamiento (*stacking*)

Experimentalmente, los oligonucleótidos de cadena simple tienden a disponer sus bases de forma apilada (Kool 1997). Este hecho revela la importancia del apilamiento o *stacking* entre las bases como factor en la estabilización de la estructura secundaria del ADN. La naturaleza de esta interacción es compleja, pues intervienen principalmente tres contribuciones: i) la interacción entre las distribuciones de carga electrostática de las bases, ii) la interacción debida a las fuerzas de dispersión de ambos sistemas  $\pi$  y iii) la desestructuración del conjunto de moléculas de agua cercanas a los anillos aromáticos (efecto hidrofóbico).

Diversas técnicas experimentales, como la osmometría, la ultracentrifugación, la calorimetría, la desnaturalización térmica y la resonancia magnética nuclear (RMN), se han empleado en la descripción termodinámica de este tipo de interacciones (Tribolet and Sigel 1987; Guckian et al. 1996). Los datos de RMN han sido confirmados por estudios teóricos (Cieplak and Kollman 1988; Friedman and Honig 1995; Alhambra et

al. 1997; Hobza and Spöner 1999). Según las evidencias obtenidas, los apilamientos que involucran G son los más estables, siendo los de menor estabilidad los que contienen T. Existe una disminución progresiva de la estabilidad a medida que se reduce el tamaño de los anillos implicados. De este modo, puede establecerse la siguiente gradación de *stacking*: purina:purina > purina:pirimidina > pirimidina:pirimidina.

En fase gas, la fuerza de las interacciones de puente de hidrógeno supera a la estabilización producida por el *stacking*. Sin embargo, en solventes polares como agua, las bases no interactúan mayoritariamente por puente de hidrógeno, dado que implica la desaparición de intensas interacciones nucleobase-agua. Por ello, el *stacking* cobra una enorme importancia en medio acuoso, considerándose de hecho actualmente como la principal fuerza directora de la estructuración del ADN en entornos polares.

### **3.3.2.3. Efecto del entorno químico: agua e iones**

El entorno acuoso juega un papel decisivo en la definición de la estructura final de los ácidos nucleicos. Una de sus acciones más relevantes es la moderación de las interacciones entre los grupos fosfato del ADN, cuya repulsión electrostática desestructuraría la hélice a falta del efecto apantallador de las moléculas de agua.

Las moléculas individuales de agua se estructuran alrededor del ADN formando dos capas de hidratación. En la capa más interna se ubican un promedio de 11 a 20 moléculas por nucleótido, que se unen directamente mediante puentes de hidrógeno a átomos del esqueleto azúcar-fosfato o de las bases, formando *espinas de hidratación* presentes como elemento constituyente en varios tipos de ácido nucleicos. La segunda capa está mucho más poblada y, pese a que sus propiedades (movilidad del agua, difusión de aniones,...) difieren muy poco de las del resto del solvente, resulta indispensable en la estabilización de la estructura secundaria.

Los iones presentes en disolución también modulan la estructura del ADN. Los más abundantes son los cationes inorgánicos, aunque cualquier especie cargada (cadenas laterales de aminoácidos, fármacos...) puede establecer interacciones similares. Los cationes monovalentes realizan una lectura electrostática de la fibra de ADN fijándose



principalmente en la distribución homogénea de los grupos fosfato, sin mostrar especial sensibilidad por la secuencia de bases. Su presencia en el interior de las espigas de hidratación y la influencia general que tienen en la estructura del ADN son cuestiones actualmente sujetas a debate científico (Rueda et al. 2004). Los cationes divalentes, en cambio, interactúan simultáneamente con los fosfatos y con algunas aguas de la primera esfera de hidratación, actuando como estabilizador de formas específicas del ADN. La posición de estas aguas depende de la naturaleza del par de bases, lo que confiere a estos cationes cierta especificidad de secuencia, fenómeno que ha sido asociado a la generación de curvatura en algunos sistemas (Dickerson 1998).

#### **3.3.2.4. Estructura secundaria del ADN**

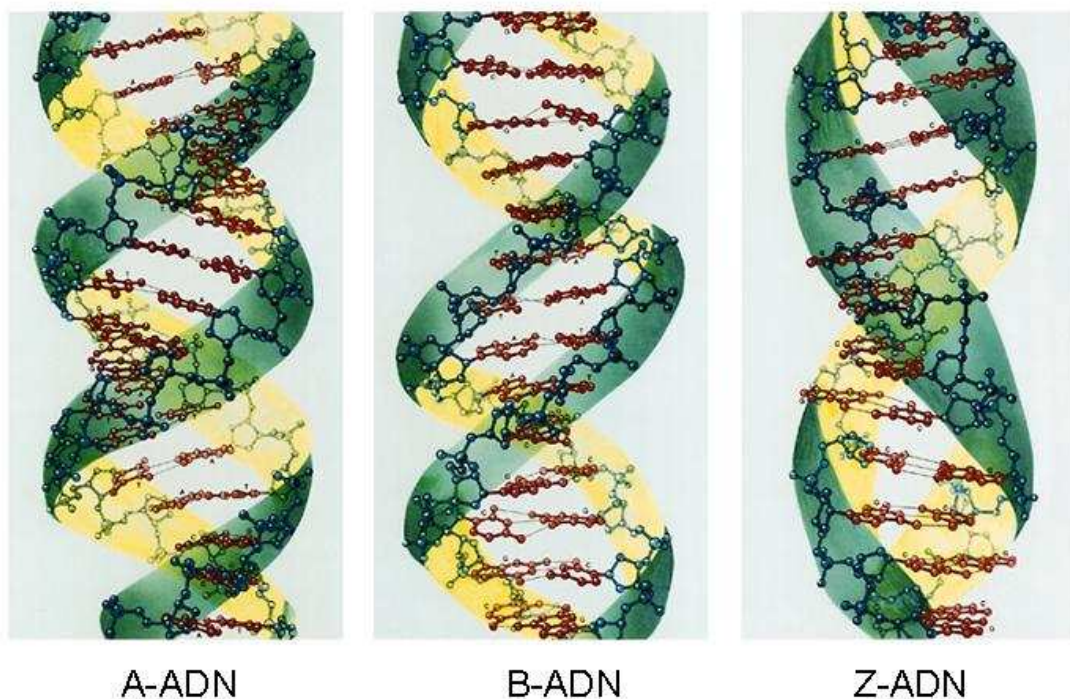
Tras el modelo teórico de doble hélice propuesto por Watson y Crick para la estructura del ADN, la idea de que esta biomolécula puede explorar disposiciones tridimensionales alternativas ha ido consolidándose. De hecho, el ADN puede adoptar una gran diversidad de formas en función de las condiciones experimentales, de la secuencia de bases o del proceso biológico en que esté involucrado. En todas ellas se conserva una estructura general helicoidal, lo que parece una consecuencia directa de las interacciones de *stacking* entre las bases y de la minimización de la repulsión electrostática entre grupos fosfato.

Una clasificación aceptable de las estructuras secundarias podría ser aquella que considera, por un lado, las conformaciones canónicas (formadas por dos cadenas antiparalelas), y por otro las conformaciones no-canónicas (en las que no se cumple esta sencilla regla). Hablaremos brevemente de cada grupo.

##### 3.3.2.4.1. Conformaciones canónicas (familias A,B,Z):

Existen tres grandes familias conformacionales para los dúplexes de ADN (ver figura 3.17): B y A, donde las cadenas se disponen de modo dextrógiro, y Z, donde su orientación es levógira. La forma B constituye la conformación más habitual en

condiciones normales de hidratación y la que suele asumirse que adopta al desempeñar la mayoría de funciones biológicas. La disposición tridimensional presenta la forma estilizada típicamente asignada al ADN, donde se distinguen dos surcos: el surco ancho o *major groove* y el surco estrecho o *minor groove*. Además, presenta los pares de bases perpendiculares al eje de la hélice y un elevado grado de compactación. Existen algunas variantes conformacionales de la forma B, que suelen englobarse dentro de la misma familia, como son el C-ADN (estructura de la sal de litio del ADN natural en condiciones de baja humedad), el D-ADN (con 8 bases por vuelta, detectado en zonas con regiones A:T alternadas) y el T-ADN (muy semejante al D-ADN, detectado en el ADN del fago T2).

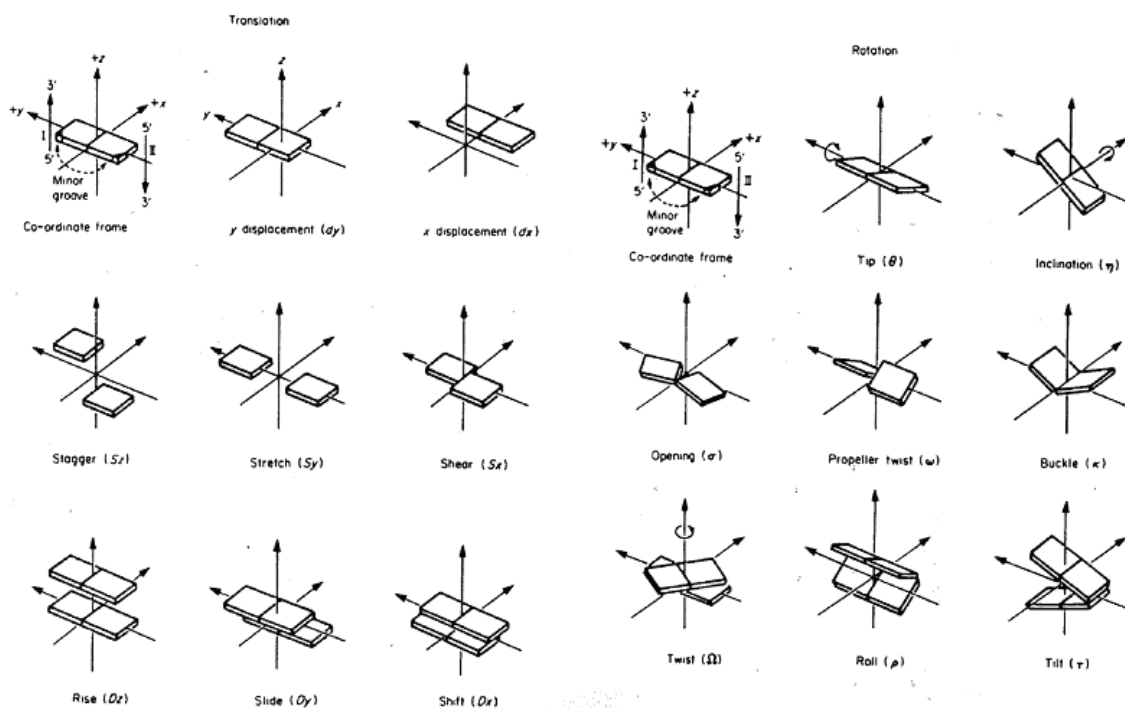


**Figura 3.17.** Estructura de las tres conformaciones canónicas del ADN (formas A, B y Z).

En condiciones de baja hidratación, el ADN suele adoptar la forma A. Se trata de una conformación más corta y ancha ( $\phi = 24 \text{ \AA}$ ), que presenta un hueco central de  $3 \text{ \AA}$  de diámetro en su sección transversal. Es la forma más habitual en que se disponen las moléculas de ARN o los híbridos ADN·ARN, y resulta particularmente favorecida, en el caso del ADN, en secuencias ricas en C·G.

La forma Z fue detectada ya en 1979 (Wang et al. 1979) como una estructura anómala que puede aparecer en secuencias alternadas (purina, pirimidina) en condiciones de alta concentración de sal, presencia de algunos cationes o superenrollamiento de la fibra de ADN. La propensidad del ADN para migrar a la forma Z ha sido evaluada a escala genómica mediante técnicas computacionales, encontrándose valores elevados en las zonas de regulación génica (Champ et al. 2004). Este hecho, junto a la observación del reconocimiento específico que algunas proteínas muestran hacia este tipo de estructura secundaria (Ha et al. 2004), puede justificar un papel del Z-ADN como intermedio en procesos biológicos, tema que aún no ha podido ser verificado de manera inequívoca.

Las estructuras canónicas del ADN presentan todas ellas una fuerte repetitividad helicoidal, lo que facilita describirlas mediante una serie de coordenadas internas, que tras un proceso de refinado y estandarización han conducido a un sistema asumido por todos los investigadores. En base a este sistema, se clasifica la estructura de acuerdo a parámetros de traslación y de rotación, y dentro de cada uno de ellos se subclasifica según su modo de desplazamiento/rotación respecto al par de bases vecino, el eje de la hélice o de una base respecto a su complementaria (ver figura 3.18).



**Figura 3.18.** Definición gráfica de los parámetros de hélice empleados en la clasificación de las diferentes estructuras secundarias de los ácidos nucleicos (Dickerson 1989).

De acuerdo a estos parámetros conformacionales, podemos definir las hélices canónicas como se indica en la tabla 3.5, donde se incluyen los valores promedio de algunos parámetros de hélice para cada estructura secundaria canónica.

Propiedad	A-ADN	B-ADN	Z-ADN
Diámetro	25.5 Å	23.7 Å	18.4 Å
Nucleótidos por vuelta (longitud de 1 vuelta de hélice)	11 (24.6 Å)	8-10 (34 Å)	12 (45.6 Å)
Giro de la hélice	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Amplitud de surcos	Major (2.7 Å)	Major (11.7 Å)	
	Minor (11.0 Å)	Minor (5.7 Å)	
Profundidad de surcos	Major (13.5 Å)	Major (8.5 Å)	
	Minor (2.8 Å)	Minor (7.5 Å)	
Conformación del enlace glucosídico	Anti	Anti	Anti/Syn (alternadas en un mismo par de bases)
<i>Puckering</i> de la ribosa	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo (anti) C2'-exo (syn)
Inclinación de un par respecto al eje de la hélice	19°	1.2°	9°
Unidad repetitiva	1 par de bases	1 par de bases	2 pares de bases
Rotación por par de bases ( <i>twist</i> )	32.7°	34.6°	30°
Pares de bases por vuelta	~11	10.4	12
Mínima distancia entre los planos de las bases ( <i>rise</i> )	2.6 Å	3 - 3.4 Å	3.7 Å

**Tabla 3.5.** Detalle de las características estructurales principales del A-ADN, B-ADN y Z-ADN.

#### 3.3.2.4.2. Conformaciones no-canónicas:

“...el ADN prolifera, emite directivas, se abre, se cierra, se retuerce y se endereza. Estamos cayendo en la cuenta de lo maravillosamente comunicativo que es y de que no se trata de un material intocable, metabólicamente inerte, sino que se le atiende y equilibra con meticulosidad en un *statu quo* activamente preservado” (Hotchkiss 1968).

Esta referencia, escrita pocos años después del descubrimiento de su estructura tridimensional canónica (Watson and Crick 1953), muestra cómo ya se tenía conciencia de que la función biológica del ADN requería de una versatilidad conformacional muy elevada y que esta variabilidad era mantenida por mecanismos celulares aún a costa de una importante inversión energética. Resulta lógico pensar, por tanto, que el polimorfismo estructural del ADN es mucho mayor del que se dibuja al considerar sólo las estructuras canónicas. De este enorme abanico de posibilidades estructurales, seguramente incompleto, que posibilita la función biológica del ADN o su utilidad biotecnológica, hemos señalado algunos ejemplos a continuación:

- Estructuras de ADN *slipped* (lazos) se relacionan con la maquinaria de lectura del ADN (nucleasas de escisión, factores de transcripción).
- ADN curvado, bien de curvatura leve (*bent ADN*), asociados a efectos de secuencia o a interacción con proteínas o poliaminas, o bien con una elevada curvatura (*kinked ADN*), formando un ángulo cercano a 90°, fruto en general de su interacción con algunas proteínas.
- ADN cruciforme, formado en zonas de *inverse repeat*, preferiblemente palindrómicas.
- ADN con mutaciones que preserven la estructura global de doble hélice, que pueden ser causadas por apareamientos incorrectos entre bases (*mismatchings*) o inserciones/deleciones de un único residuo.
- ADN de cadenas paralelas, que puede ser de intra- o intermolecular y basándose en motivos de puente de hidrógeno tanto *Hoogsteen* como *reverse-WC*.

- zonas de transición entre estructuras secundarias, como las uniones entre B-ADN y Z-ADN
- ADN de triple cadena, cuya existencia *in vivo* ha sido demostrada, y que puede emplearse como una herramienta biotecnológica muy versátil (Robles et al. 2002).
- ADN de cuatro cadenas (ADN tetraplexes), presentes en telómeros y detectados recientemente en regiones reguladoras de la expresión de oncogenes (Siddiqui-Jain et al. 2002).

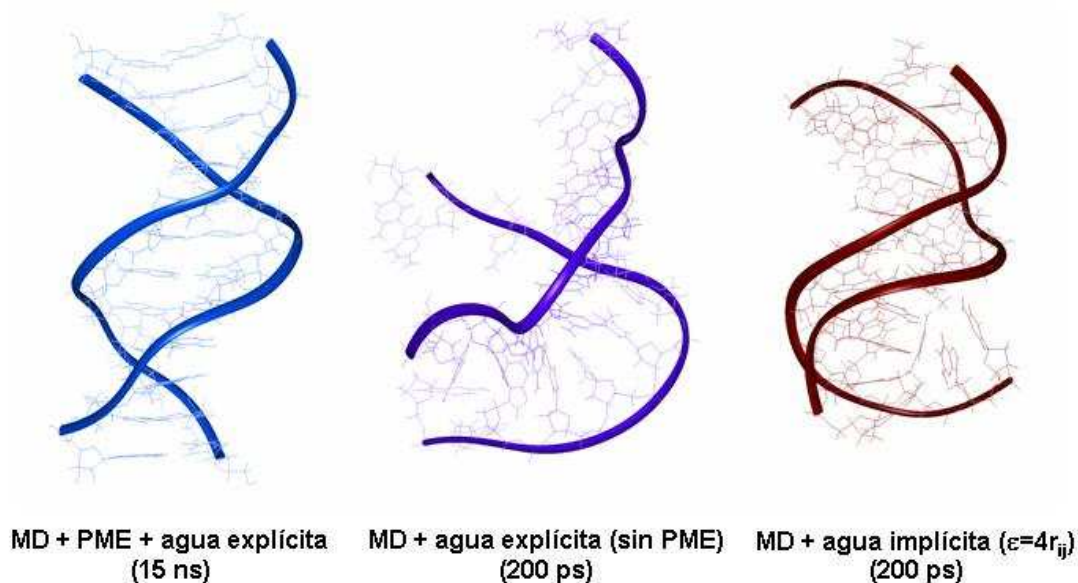
### 3.3.3. Simulación del movimiento de los ácidos nucleicos por dinámica molecular

#### 3.3.3.1. Evolución y estado actual de la simulación de ácidos nucleicos

Existen diferentes protocolos para simular el movimiento de los ácidos nucleicos, que difieren básicamente en dos factores: i) el detalle empleado en la descripción de la molécula y ii) el tamaño de los sistemas y escalas temporales que se simulan. Los modelos macroscópicos describen fragmentos muy grandes de ADN mediante un conjunto ecuaciones diferenciales que emplean parámetros ajustados a propiedades experimentales. Con ellos puede obtenerse información acerca de procesos como la migración electroforética de grandes fragmentos de ADN, el superenrollamiento de esta molécula en plásmidos bacterianos o su empaquetamiento en cápsidas de virus, propiedades que se asumen independientes de la secuencia nucleotídica (Orozco et al. 2004). Los modelos mesoscópicos dividen la molécula de ADN en una serie de fragmentos estructurales que se consideran internamente estáticos, conectados por uniones flexibles. El movimiento global se genera mediante el uso de expresiones analíticas calibradas para reproducir datos experimentales. Empleando estos modelos, se han estudiado las propiedades conformacionales de los ácidos nucleicos introduciendo los efectos de la secuencia de forma aproximada (Olson 1996; Bruant et al. 1999; Olson

and Zhurkin 2000; Wattis et al. 2001; Matsumoto and Olson 2002; Orozco et al. 2003). No obstante, ninguna de las metodologías presentadas se apoya en una descripción del ADN a nivel atómico, lo cual impide conocer el detalle químico asociado a esta deformabilidad y el efecto preciso que sobre ella puedan tener perturbaciones químicas concretas (neutralización de cargas, interacción con aguas e iones concretos, reconocimiento por fármacos, variación de la naturaleza química de las bases, etc...). Por ello, el presente trabajo se ha centrado en el uso de simulaciones por dinámica molecular de ácidos nucleicos representados a nivel atómico (modelos microscópicos).

Las virtudes de la dinámica molecular (MD) en la obtención de descripciones realistas del movimiento de los sistemas químicos han sido expuestas en el apartado 2. Las primeras aplicaciones de esta técnica a los ácidos nucleicos se realizaron hace dos décadas, simulando en periodos muy cortos (menos de 100 ps) la dinámica de un ADN bicatenario (Levitt 1983; Tidor et al. 1983) y de un ARN de transferencia (Prabhakaran et al. 1983; Harvey et al. 1984) sometidos a restricciones artificiales para mantener su integridad. De hecho la simulación realista de ácidos nucleicos tuvo que esperar hasta el último cuarto del siglo XX, ya que precisó: i) el desarrollo de *forcefields* precisos (Cornell et al. 1995; Langley 1998; Cheatham et al. 1999; Foloppe and Mackerell 2000; Soares et al. 2005), y ii) un adecuado tratamiento de las interacciones electrostáticas de largo alcance, como el que se obtiene al emplear la metodología *Particle Mesh Ewald (PME)* (Darden et al. 1993; Essmann et al. 1995). En la figura 3.19 puede verse como, sobre un misma secuencia de ADN, simulaciones muy cortas que omiten este último tratamiento conducen a artefactos estructurales.



**Figura 3.19.** Producto final de tres simulaciones por MD sobre el dodecámero de Dickerson (Drew et al. 1981) en diferentes condiciones. En la figura de la izquierda las simulaciones siguen el estado del arte actual con aplicación de PME y agua explícita. La imagen central proviene de un protocolo basado en la truncación de las interacciones electrostáticas a una distancia de 8Å (Laughton et al. 1995) y en la simulación de la derecha se trata el solvente de forma implícita mediante un dieléctrico dependiente de la distancia (Orozco et al. 1990). (figura modificada de (Orozco et al. 2004)).

A partir de la introducción de la metodología *PME*, el estudio del movimiento de los ácidos nucleicos desde la perspectiva de la simulación teórica ha experimentado un crecimiento muy notable, como queda reflejado en el progresivo aumento de las publicaciones en este campo. Esta intensa actividad de investigación ha contribuido a elaborar una descripción cada vez más detallada y profunda sobre la dinámica estructural de los ácidos nucleicos, que incluye tanto sus rasgos esenciales como la modulación que sobre ella ejerce el entorno químico. No puede olvidarse, no obstante, que las técnicas de simulación cooperan en esta tarea con un gran número de metodologías (cristalografía de rayos X, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear,...). La aportación específica de la dinámica molecular a este conjunto de procedimientos podría resumirse en dos puntos: i) permite diseñar procesos que, por diversos motivos (dificultad de síntesis de los reactivos, problemas de medición,

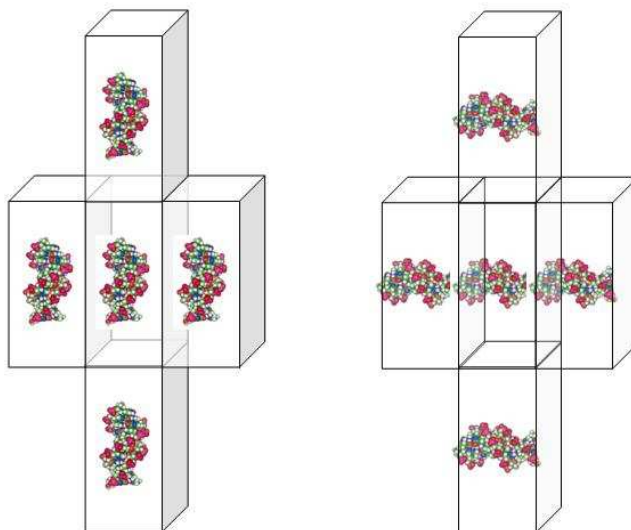


ambigüedad en la interpretación de los datos,...), son difíciles de abordar de forma experimental, y ii) ofrece una gran versatilidad para probar diferentes condiciones experimentales a partir de un esquema inicial básico.

### 3.3.3.2. Consideraciones para la obtención de simulaciones realistas

A continuación, se comentarán algunos aspectos técnicos, basados en la experiencia de nuestro grupo de investigación, que se consideran relevantes de cara a la obtención de simulaciones realistas de ácidos nucleicos por dinámica molecular (Orozco et al. 2004):

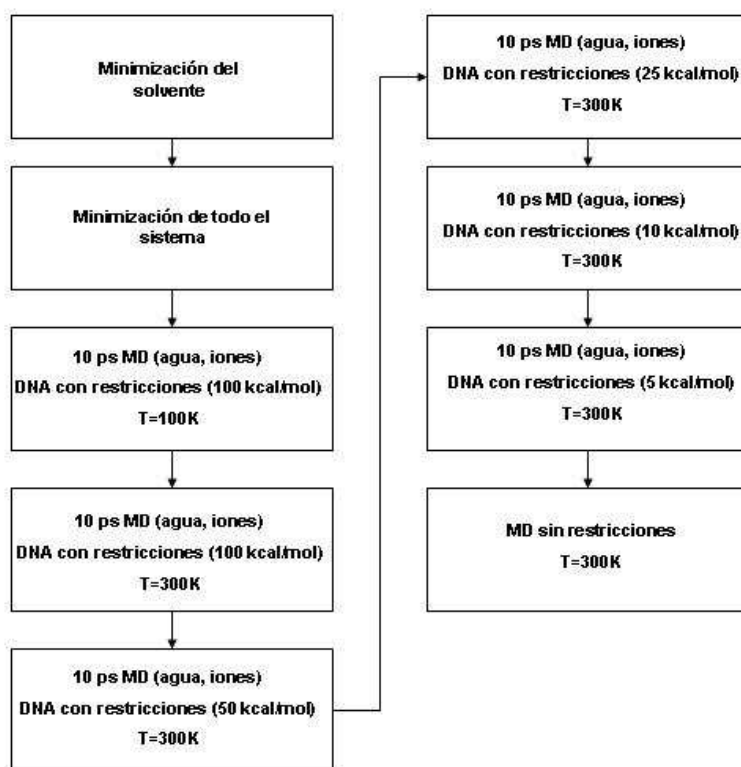
- la utilización de protocolos PME o derivados lleva asociado un aumento del coste computacional, si bien compensado por la calidad de la descripción obtenida. Se han detectado casos donde se produce un incremento artefactual de la periodicidad en los cálculos PME (Hünenberger and McCammon 1999), pero en nuestra experiencia este efecto no parece ser muy importante si se emplean cajas de solvente suficientemente grandes.
- el paso de integración más comúnmente empleado es de 2 fs, asociado a la restricción de la longitud de enlaces mediante SHAKE. Los algoritmos de dinámica molecular en paralelo no permiten la aplicación de SHAKE sobre todos los átomos del sistema, lo que obliga a usar un paso de integración de 1 fs, aplicando SHAKE únicamente a los átomos que involucran hidrógenos.
- las moléculas de agua empleadas con más frecuencia son los modelos TIP3P y SPC (Berendsen et al. 1981; Jorgensen et al. 1983), que reproducen las propiedades aceptablemente sin necesidad de recurrir a modelos más complejos.
- la inmersión del sistema en una caja de solvente explícito ha de ser tal que ningún átomo del soluto quede a una distancia menor de 12 Å del límite de la caja. Esta condición ha de mantenerse durante toda la simulación, debiéndose poner especial atención en el caso de sistemas muy alargados en los que una rotación alrededor de su eje menor puede originar fenómenos de “cristalización” entre moléculas de cajas vecinas (ver figura 3.20).



**Figura 3.20.** Cristalización artefactual de ADN en simulaciones de dinámica molecular (figura modificada de (Orozco et al. 2004)).

- en la neutralización de los grupos fosfatos suelen emplearse cationes  $\text{Na}^+$ . En ocasiones, pueden encontrarse simulaciones que emplean  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ . No obstante, la transferencia de carga entre cationes bivalentes y el soluto puede no ser despreciable y la distribución de cargas estática asumida por los procedimientos de mecánica clásica no sería realista en estos casos.
- si bien suele añadirse un número de iones que neutraliza el sistema, algunos autores consideran necesaria la adición de cantidades extra de sal a fin de crear un entorno similar al que se emplea en los experimentos; en base a nuestra experiencia, la regla del mínimo número de iones no presenta diferencias remarcables con esta propuesta y puede emplearse razonablemente.
- la longitud de las simulaciones varía a medida que se incrementa el poder computacional. En nuestro grupo se ha usado el protocolo de equilibrado multi-etapa mostrado en la figura 3.21, si bien la longitud de la última etapa es variable y depende del sistema simulado. Actualmente se emplean equilibrados de entre 0.5 y 1 ns y simulaciones entre 5 y 20 ns. La mayoría de los parámetros estructurales y energéticos alcanzan sus valores de equilibrio en la escala del nanosegundo. Los tiempos de residencia de las aguas en contacto con el ADN se estiman entre 20 y 100 ps (Phan et al. 1999; Sprous et al. 1999); sin embargo, el

equilibrado de contracciones puede requerir tiempos aún mayores, especialmente si parten de una distribución inicial no muy precisa (Rueda et al. 2004).



**Figura 3.21.** Protocolo multi-etapa seguido en la mayoría de simulaciones de ácidos nucleicos de esta tesis.

### 3.3.3.3. Flexibilidad de los ácidos nucleicos y dinámica esencial

Numerosos estudios han usado las técnicas de MD para explorar el comportamiento dinámico de los ácidos nucleicos en diferentes entornos. En este apartado se mencionarán algunas de las aplicaciones más recientes.

Destacan en primer lugar una serie de estudios que se centran en cuantificar la intensidad de los diferentes movimientos de deformación del polímero dilucidando cómo la secuencia influye sobre ellos (Lankas et al. 2002; Lankas et al. 2003; Lankas 2004; Lankas et al. 2004). Este tipo de análisis podrían convertirse en herramientas muy interesantes para futuras aplicaciones a escala genómica, teniendo en cuenta, como se observa en estudios recientes de MD, que la flexibilidad diferencial de las secuencias de ADN puede constituir un mecanismo de lectura de la fibra por parte de factores externos

(reguladores de expresión génica, maquinaria de reparación,...) (Seibert et al. 2002; Byun and Beveridge 2004; Isaacs and Spielmann 2004). En un esfuerzo por sistematizar las observaciones referentes al efecto de la secuencia en la flexibilidad de cara a futuras aplicaciones, recientemente se ha llevado a cabo la simulación masiva por MD de los 136 posibles segmentos de 4 pares de bases existentes en el genoma (Beveridge et al. 2004; Dixit et al. 2005).

Otro conjunto interesante de trabajos se enfocan hacia la descripción dinámica de los diedros del esqueleto azúcar-fosfato (*backbone*). En ellos, se exploran las diferencias entre las conformaciones B<sub>I</sub> y B<sub>II</sub> en cuanto a la flexibilidad del anillo de desoxirribosa, encontrando que las estructuras B<sub>I</sub> permiten mayor libertad conformacional (Djuranovic and Hartmann 2004). La fluctuación de los diedros del *backbone* puede contener una información muy relevante, ya que no sigue un patrón aleatorio sino que responde a la presencia de modificaciones químicas en las nucleobases, como la metilación de citosinas por la misma maquinaria celular (Rauch et al. 2003), o la interacción con proteínas reguladoras (Varnai et al. 2002; Wellenzohn et al. 2002; Trieb et al. 2004).

La apertura de las nucleobases hacia alguno de los surcos del ADN (*base flipping*) es otra de las características dinámicas del ADN que se ha intentado describir, existiendo estudios que han podido observar este evento pese a su escasa frecuencia (Cieplak et al. 1997; Cubero et al. 1999; Priyakumar and MacKerell 2006). Otros estudios se han encaminado hacia la cuantificación de la barrera energética asociada a este proceso (Banavali and MacKerell 2002; Varnai and Lavery 2002; Giudice and Lavery 2003; Giudice et al. 2003), concluyendo que la salida de purinas hacia el surco mayor está ligeramente favorecida respecto al resto de posibilidades. La presencia de algunas enzimas que modifican químicamente las bases favorecen enormemente el proceso de apertura hacia el surco mayor (Huang et al. 2003).

La explicación acerca de las aplicaciones de la MD a la comprensión de la flexibilidad del ADN podría extenderse tratando fenómenos como su interacción con proteínas o fármacos, la influencia del disolvente y cationes, la simulación del comportamiento de ADN en vacío o la aplicación de potenciales externos con el objetivo de cuantificar su resistencia frente a esfuerzos de *stretching*. No obstante, una descripción de este tipo escapa a las pretensiones de este trabajo de tesis.

Contemplando globalmente el campo de la simulación de los ácidos nucleicos, podría decirse que, tanto en la variedad de procesos estudiados como en el conocimiento de las condiciones y los protocolos que conducen al desarrollo de simulaciones realistas, en la escala del nanosegundo se ha alcanzado un nivel de madurez muy aceptable. No obstante, existe aún mucha información contenida en las trayectorias de MD que escapa a nuestra atención por falta de herramientas analíticas que nos permitan extraerla. Las señales informativas se encuentran a menudo escondidas en una confusa amalgama de datos irrelevantes. Este fenómeno se acentúa a medida que crece el poder computacional y, como consecuencia, el tamaño de las simulaciones. Por ello, cada vez es más necesaria la definición de descriptores que permitan separar el ruido de la señal en simulaciones de ácidos nucleicos.

En esta tesis se presentan algunos descriptores y se evalúan sobre una extensa batería de simulaciones de dúplexes de ADN en la escala de tiempo del multianosegundo, generando un conjunto de datos de referencia que pueden emplearse en análisis de posteriores trabajos de simulación que exploren la flexibilidad de los ácidos nucleicos en una escala temporal similar.

### 3.3.4. Estabilidad de los *pairings* Watson-Crick canónicos y efectos de la tautomería de bases mutadas y sintéticas.

#### 3.3.4.1. Tautomería de bases mutadas

*“(…) Si se asume que las bases sólo aparecen en la estructura en sus formas tautoméricas más plausibles (es decir, en su configuración ceto en vez de enol) se observa que únicamente pueden formarse pares específicos entre bases. Estos pares son: adenina (purina) con timina (pirimidina), y guanina (purina) con citosina (pirimidina)” (Watson and Crick 1953).*

Como se ha comentado anteriormente (apartado 3.3.1.3.3), numerosas evidencias provenientes de estudios experimentales y teóricos muestran que las bases naturales codificantes (A, T, C, G) suelen encontrarse, en condiciones fisiológicas, en su forma tautomérica ceto-amino (Saenger 1984). No obstante, con una frecuencia muy baja, alguna de las bases puede poblar formas enol o imino, dando lugar a la generación de mutaciones espontáneas (Topal and Fresco 1976; Saenger 1984; Goodman 1995).

El ADN se ve sometido a un *stress* constante por parte de mutágenos de diversa índole, que pueden modificar químicamente las bases alterando las pautas de reconocimiento e incluso generar mutaciones. Una de estas alteraciones, especialmente frecuente en el ADN de los organismos aerobios, es la oxidación ocasionada por diversas especies reactivas derivadas del metabolismo celular (Bjelland and Seeberg 2003). La acción de estos mecanismos oxidativos sobre la adenina puede generar diferentes formas oxidadas, siendo de especial relevancia la isoguanina (2-hidroxiadenina) tanto por la relación que tiene con procesos patológicos en seres humanos como por la complejidad de su escenario tautomérico. Asimismo, esta nucleobase puede formar apareamientos con isocitosina mediante una geometría Watson-Crick canónica (Rich 1962), lo que le conferiría un posible papel en la expansión del código genético. Finalmente, cabe considerar sus propiedades estabilizadoras de estructuras inusuales de ADN como dúplexes paralelos (Sugiyama et al. 1996; Yang et al. 1998) o estructuras tetracatenarias (Roberts et al. 1997), que hacen de este análogo una de las nucleobases más versátiles.

La presencia de isoguanine (isoG) en sistemas biológicos es un fenómeno antiguo, como parece indicar el reciente descubrimiento de algunas proteínas bacterianas capaces de eliminar este análogo de ADNs bicatenarios en ensayos *in vitro* (Kamiya and Kasai 2000b; Ohtsubo et al. 2000; Hashiguchi et al. 2002), o de hidrolizar el nucleótido trifosfato de isoG a su análogo monofosfato, evitando que sea incorporado en el ADN (Fujikawa et al. 1999; Fujikawa et al. 2001; Kamiya et al. 2001). La isoG fue detectada por primera vez en cromatina de tejidos humanos tras ser expuestos a dosis elevadas de Ni(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o Co(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nackerdien et al. 1991). *In vivo*, este análogo ha sido detectado en tejidos tumorales humanos (Olinski et al. 1992) y en ratones sometidos a radiación  $\gamma$  (Mori et al. 1993). Los estudios experimentales sugieren que la formación de isoG tiene lugar principalmente por oxidación de la adenina en su forma nucleotídica

---

soluble, ya que el rendimiento de esta reacción *in vitro* resulta 70-80 veces mayor que el proceso provocado sobre ADN bicatenario (Bjelland and Seeberg 2003).

Esta base podría ser incorporada por ADN polimerasas al ADN frente a C en vez de frente a T, sugiriendo un posible mecanismo para la inducción de transiciones C  $\rightarrow$  T (Bjelland and Seeberg 2003). La incorporación de isoG frente a G por algunas polimerasas poco restrictivas también ha sido descrita, señalando la posibilidad de generar transversiones G  $\rightarrow$  T. La incorporación frente a T resulta, sin embargo, siempre mayoritaria. Cuando la isoG está presente en el ADN, la ADN polimerasa puede incorporar frente a ella tanto G como C o A, dando origen a mutaciones del tipo transición (A  $\rightarrow$  G) o transversión (A  $\rightarrow$  C ó A  $\rightarrow$  T) (Krishnamurthy et al. 1996; Kamiya and Kasai 2000a; Kamiya et al. 2000; Kamiya 2003). La frecuencia relativa de cada tipo depende del contexto de secuencia en el que se encuentre la isoG (Kamiya et al. 1995; Kamiya and Kasai 1996; Bjelland and Seeberg 2003).

Las evidencias experimentales sobre el estado tautomérico de isoG en disolución indican que la forma amino-oxo AO1 (ver figura 2 en apartado 4.3.1) es mayoritaria en entornos polares, junto con la posible participación de otra forma similar (AO3), mientras que las formas amino-enol (AEc y AEt) son las más estables en medios apolares, sugiriendo un escenario de cuatro tautómeros, visitables en función del entorno químico (Sepiol et al. 1976; Eschenmoser 1993; Pitsch et al. 1995; Seela et al. 1995). El sorprendente hallazgo de dos geometrías de *pairing* de isoG frente a T en una misma molécula de ADN bicatenario (Robinson et al. 1998) insinuó la posible alternancia de dos formas tautoméricas para esta nucleobase en un entorno fisiológico. No obstante, no existe evidencia experimental directa de dichas formas tautoméricas al carecer de suficiente resolución para localizar los hidrógenos.

La naturaleza química de la isoG en el ADN no está, por tanto, definida de forma precisa en el entorno concreto de los apareamientos isoG·T, al igual que sucede en el caso de los apareamientos observados a veces entre isoG y el resto de bases canónicas. Por esta razón, no es posible dar una explicación completa al origen de las frecuencias asociadas a los diferentes tipos de mutaciones causadas por la formación de isoG. Nuestro trabajo se propone la clarificación, desde una perspectiva teórica, de las

propiedades tautoméricas de esta nucleobase en diferentes entornos químicos, tratando de fundamentar algunas hipótesis acerca del origen de las frecuencias de mutación.

### 3.3.4.2. Tautomería de bases sintéticas

Aunque la naturaleza ha seleccionado los apareamientos dA·dT y dC·dG como base del código genético, la estabilidad estructural del ADN no se ve comprometida si nucleobases modificadas químicamente entran a formar parte de la molécula. Esta expansión del alfabeto genético, si bien no parece una vía escogida por los mecanismos naturales para la optimización de la función biológica del ADN, puede ser una herramienta en estudios encaminados a i) conocer mejor las fuerzas que estabilizan el biopolímero y ii) permitir nuevas aplicaciones biotecnológicas (Benner et al. 1987; Henry and Romesberg 2003).

Las bases modificadas se diseñaban tradicionalmente pensando en variar las pautas de puente de hidrógeno respecto a las bases normales, entendiendo que éstas eran necesarias para el reconocimiento. No obstante, algunos trabajos de E.T. Kool, al mostrar que el reconocimiento por puente de hidrógeno no es un requisito indispensable para la replicación (Moran et al. 1997a; Moran et al. 1997b), indicaron la vía de la optimización de las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals como un posible camino hacia la extensión del código genético (Henry and Romesberg 2003).

Recientemente, se ha propuesto un nuevo conjunto de análogos que consisten en la inserción de un anillo de benceno a cada una de las bases naturales (Liu et al. 2003). En estos sistemas expandidos (xADN), las bases púricas (A,G) se transforman en compuestos tricíclicos (xA, xG) y las pirimidínicas (C, T) en sistemas bicíclicos (xC, xT), quedando cada una ampliada en 2.4 Å respecto al sistema parental. Con esta estrategia, se intenta combinar el mantenimiento de la pauta de puentes de hidrógeno de las bases naturales con el aumento en las interacciones de *stacking* asociado a una mayor hidrofobicidad de las bases. La introducción de cualquiera de los análogos expandidos frente a las bases canónicas en el centro de ADNs naturales (formación de pares mixtos xA·T, xT·A, etc...) conlleva una desestabilización importante (entre 1-2 kcal·mol<sup>-1</sup> para xA, xG o xT, y de 0.3 kcal·mol<sup>-1</sup> para xC) (Gao et al. 2004; Liu et al.



2005). No obstante, cuando se emplean benzoderivados en dúplexes mixtos, la estructura resultante es más estable (Liu et al. 2003; Liu et al. 2004) y muestra únicamente ligeras diferencias respecto a la forma B canónica (Liu et al. 2004). Sorprendentemente, la distorsión del esqueleto azúcar-fosfato es mínima y el número de bases por cada vuelta de hélice es cercano a 12, mucho menor del que se esperaría si considerásemos únicamente la expansión del diámetro del cilindro y el reajuste de las bases para minimizar la distorsión del esqueleto, lo cual sugiere que mediante pequeñas variaciones en los diedros del esqueleto el ADN puede tolerar modificaciones muy considerables en el tamaño de sus bases.

La aportación de nuestro trabajo se centra en la descripción sistemática de las propiedades tautoméricas de los nuevos análogos en diferentes entornos químicos, la posible alteración de sus propiedades de *pairing* y su hidrofobicidad.

### 3.4. Referencias

- Alhambra, C., F. J. Luque, F. Gago and M. Orozco (1997). Journal of Physical Chemistry B **101**(19): 3846.
- Allen, W. E., P. A. Gale, C. T. Brown, V. Lynch and J. L. Sessler (1996). J Am Chem Soc **118**(49): 12471.
- Altona, C., H. J. Geise and C. Romers (1968). Tetrahedron **24**: 13.
- Altona, C. and M. Sundaralingam (1972). J Am Chem Soc **94**: 8205.
- Anzenbacher, P., Jr., K. Jursikova and J. L. Sessler (2000a). Journal of the American Chemical Society **122**: 9350.
- Anzenbacher, P., Jr., A. C. Try, H. Miyaji, K. Jursikova, M. Marquez and J. L. Sessler (2000b). Journal of the American Chemical Society **122**: 10268.
- Astbury, W. T. and H. Street (1931). Phil Trans Roy Soc **230**: 75.
- Astbury, W. T. and H. J. Woods (1933). Phil Trans Roy Soc **232**: 333.
- Avery, O. T., C. M. McLeod and M. McCarthy (1944). J. Exp. Med. **79**: 137.
- Bader, R. F. W. (1990). Atoms in Molecules. A Quantum Theory. Oxford, Clarendon.
- Baeyer, A. (1886). Ber. Dtsch. Chem. Ges. **19**: 214.
- Banavali, N. K. and A. D. MacKerell, Jr. (2002). J Mol Biol **319**(1): 141.
- Beer, P. D. and P. A. Gale (2001). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **40**(3): 486.
- Benner, S. A., R. K. Allemann, A. D. Ellington, L. Ge, A. Glasfeld, G. F. Leanz, T. Krauch, L. J. MacPherson, S. Moroney and et al. (1987). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **52**(Evol. Catal. Funct.): 53.
- Berendsen, H. J. C., J. P. Postma, W. F. van Gunsteren and J. Hermans (1981). Intermolecular Forces. B. Pullman. Dordrecht, Reidel: 331.
- Beveridge, D. L., G. Barreiro, K. S. Byun, D. A. Case, T. E. Cheatham, 3rd, S. B. Dixit, E. Giudice, F. Lankas, R. Lavery, J. H. Maddocks, R. Osman, E. Seibert, H.

- Sklenar, G. Stoll, K. M. Thayer, P. Varnai and M. A. Young (2004). Biophys J **87**(6): 3799.
- Bjelland, S. and E. Seeberg (2003). Mutat. Res. **531**(1,2): 37.
- Blackburn, G. M. and M. J. Gait (1990). Nucleic Acids in Chemistry and Biology. New York, IRL Press.
- Bruant, N., D. Flatters, R. Lavery and D. Genest (1999). Biophys J **77**(5): 2366.
- Bucher, C., R. S. Zimmerman, V. Lynch and J. L. Sessler (2001). J Am Chem Soc **123**(39): 9716.
- Byun, K. S. and D. L. Beveridge (2004). Biopolymers **73**(3): 369.
- Cafeo, G., F. H. Kohnke, G. L. L. La Torre, A. J. P. White and D. J. Williams (2000). Chem Commun (Camb): 1207.
- Champ, P. C., S. Maurice, J. M. Vargason, T. Camp and P. S. Ho (2004). Nucleic Acids Res **32**(22): 6501.
- Cheatham, T. E., 3rd, P. Cieplak and P. A. Kollman (1999). J Biomol Struct Dyn **16**(4): 845.
- Chen, D.-H., P.-Q. Chen, H.-W. Sun, L. Chen, R.-X. Shen, J. Yuan, M.-X. Yuan, C.-M. Lai and Z.-M. Li (2006a). Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao **27**(2): 332.
- Chen, W., Z. R. Li, D. Wu, Y. Li, C. C. Sun and F. L. Gu (2005). J Am Chem Soc **127**: 10977.
- Chen, W., Z.-R. Li, D. Wu, Y. Li, C.-C. Sun, F. L. Gu and Y. Aoki (2006b). Journal of the American Chemical Society **128**(4): 1072.
- Cieplak, P., T. E. Cheatham, III and P. A. Kollman (1997). Journal of the American Chemical Society **119**(29): 6722.
- Cieplak, P. and P. A. Kollman (1988). J Am Chem Soc **119**: 3734.

- Cornell, W. D., P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, Jr., D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell and P. A. Kollman (1995). Journal of the American Chemical Society **117**(19): 5179.
- Craven, B. M. (1987). Trans Am Crys Assoc **23**: 71.
- Cubero, E., E. C. Sherer, F. J. Luque, M. Orozco and C. A. Laughton (1999). Journal of the American Chemical Society **121**(37): 8653.
- Danil de Namor, A. F. and M. Shehab (2005). J Phys Chem B **109**: 17440.
- Darden, T., D. York and L. Pedersen (1993). Journal of Chemical Physics **98**(12): 10089.
- de Leeuw, H. P. M., C. A. G. Hassnoot and C. Altona (1980). Isr. J. Chem. **20**: 108.
- Dickerson, R. E. (1989). Nucleic Acids Res **17**(5): 1797.
- Dickerson, R. E. (1998). Nucleic Acids Res **26**(8): 1906.
- Dixit, S. B., D. L. Beveridge, D. A. Case, T. E. Cheatham, III, E. Giudice, F. Lankas, R. Lavery, J. H. Maddocks, R. Osman, H. Sklenar, K. M. Thayer and P. Varnai (2005). Biophys. J. **89**(6): 3721.
- Djuranovic, D. and B. Hartmann (2004). Biopolymers **73**(3): 356.
- Donohue, J. and K. N. Trueblood (1960). J Mol Biol **2**: 363.
- Drew, H. R., R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura and R. E. Dickerson (1981). Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2179.
- Eschenmoser, A. (1993). Pure Appl. Chem. **65**: 1179.
- Essmann, U., L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee and L. G. Pedersen (1995). J Chem Phys **103**: 8577.
- Foloppe, N. and A. D. Mackerell (2000). Journal of Computational Chemistry **21**(2): 86.
- Friedman, R. A. and B. Honig (1995). Biophys J **69**: 1528.

Fujikawa, K., H. Kamiya, H. Yakushiji, Y. Fujii, Y. Nakabeppu and H. Kasai (1999).

The Journal of biological chemistry **274**(26): 18201.

Fujikawa, K., H. Kamiya, H. Yakushiji, Y. Nakabeppu and H. Kasai (2001). Nucleic

Acids Research **29**(2): 449.

Gale, P. A., J. L. Sessler and V. Král (1998). Chem. Commun.: 1.

Gale, P. A., J. L. Sessler, V. Král and V. Lynch (1996a). Journal of the American

Chemical Society **118**: 5140.

Gale, P. A., J. L. Sessler, V. Lynch and P. I. Sansom (1996b). Tetrahedron Lett. **37**:

7881.

Gao, J., H. Liu and E. T. Kool (2004). Journal of the American Chemical Society

**126**(38): 11826.

Giudice, E. and R. Lavery (2003). Journal of the American Chemical Society **125**(17):

4998.

Giudice, E., P. Varnai and R. Lavery (2003). Nucleic Acids Res **31**(5): 1434.

Goodman, M. F. (1995). Nature (London) **378**(6554): 237.

Guckian, K. M., B. A. Schweitzer, R. X. F. Ren, C. J. Sheils, P. L. Paris, D. C.

Tahmassebi and E. T. Kool (1996). J Am Chem Soc **118**: 8182.

Ha, S. C., N. K. Lokanath, D. Van Quyen, C. A. Wu, K. Lowenhaupt, A. Rich, Y. G.

Kim and K. K. Kim (2004). Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14367.

Hantzsch, A. (1910). Berichte **43**: 3049.

Harvey, S. C., M. Prabhakaran, B. Mao and J. A. McCammon (1984). Science

**223**(4641): 1189.

Haschemeyer, A. E. V. and A. Rich (1967). J Mol Biol **27**: 369.

Hashiguchi, K., Q. M. Zhang, H. Sugiyama, S. Ikeda and S. Yonei (2002). Int. J. Radiat.

Biol. **78**(7): 585.

- Henry, A. A. and F. E. Romesberg (2003). Curr. Opin. Chem. Biol. **7**(6): 727.
- Hobza, P. and J. Sponer (1999). Chemical Reviews **99**: 3247.
- Hotchkiss, R. (1968). Cold Spring Harb Symp Quant Biol **33**: 857.
- Huang, N., N. K. Banavali and A. D. MacKerell, Jr. (2003). Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 68.
- Huggins, M. L. (1936a). J. Phys. Chem. **40**: 723.
- Huggins, M. L. (1936b). J Org Chem **1**: 405.
- Huggins, M. L. (1943). Chem. Rev. **32**: 195.
- Huggins, M. L. (1971). Angewandte Chemie, International Edition **10**: 147.
- Hunenberger, P. H. and J. A. McCammon (1999). Journal of Chemical Physics **110**(4): 1856.
- Isaacs, R. J. and H. P. Spielmann (2004). Journal of the American Chemical Society **126**(2): 583.
- Jardetzky, C. D. (1960). J Am Chem Soc **82**: 229.
- Jeffrey, G. A. (1997). An Introduction to Hydrogen Bonding.
- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein (1983). Journal of Chemical Physics **79**(2): 926.
- Kamiya, H. (2003). Nucleic Acids Research **31**(2): 517.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1996). FEBS Lett. **391**(1,2): 113.
- Kamiya, H. and H. Kasai (2000a). Nucleic Acids Research **28**(7): 1640.
- Kamiya, H. and H. Kasai (2000b). J. Radiat. Res. (Tokyo). **41**(4): 349.
- Kamiya, H., H. Maki and H. Kasai (2000). Biochemistry **39**(31): 9508.
- Kamiya, H., N. Murata-Kamiya, E. Iida and H. Harashima (2001). Biochem. Biophys. Res. Commun. **288**(3): 499.

- Kamiya, H., T. Ueda, T. Ohgi, A. Matsukage and H. Kasai (1995). Nucleic Acids Research **23**(5): 761.
- Koch, U. and P. L. A. Popelier (1995). Journal of Physical Chemistry **99**(24): 9747.
- Kool, E. T. (1997). Chemical Reviews **97**: 1473.
- Kral, V., J. L. Sessler, T. V. Shishkanova, P. A. Gale and R. Volf (1999). J Am Chem Soc **121**: 8771.
- Krishnamurthy, R., S. Pitsch, M. Minton, C. Miculka, N. Windhab and A. Eschenmoser (1996). Angewandte Chemie, International Edition in English **35**(13/14): 1537.
- Langley, D. R. (1998). J Biomol Struct Dyn **16**(3): 487.
- Lankas, F. (2004). Biopolymers **73**(3): 327.
- Lankas, F., T. E. Cheatham, 3rd, N. Spackova, P. Hobza, J. Langowski and J. Sponer (2002). Biophys J **82**(5): 2592.
- Lankas, F., J. Sponer, J. Langowski and T. E. Cheatham, 3rd (2003). Biophys J **85**(5): 2872.
- Lankas, F., J. Sponer, J. Langowski and T. E. Cheatham, 3rd (2004). J Am Chem Soc **126**(13): 4124.
- Latimer, W. M. and W. H. Rodebush (1920). J Am Chem Soc **42**: 1419.
- Laughton, C. A., F. J. Luque and M. Orozco (1995). Journal of Physical Chemistry **99**(29): 11591.
- Lee, C. H., J. S. Lee, H. K. Na, D. W. Yoon, H. Miyaji, W. S. Cho and J. L. Sessler (2005). J Org Chem **70**(6): 2067.
- Levitt, M. (1983). Cold Spring Harb Symp Quant Biol **47 Pt 1**: 251.
- Liu, H., J. Gao and E. T. Kool (2005). J. Org. Chem. **70**(2): 639.
- Liu, H., J. Gao, S. R. Lynch, Y. D. Saito, L. Maynard and E. T. Kool (2003). Science (Washington, DC, United States) **302**(5646): 868.

- 
- Liu, H., S. R. Lynch and E. T. Kool (2004). Journal of the American Chemical Society **126**(22): 6900.
- Lozovanu, S., L. Silaghi-Dumitrescu and I. A. Silberg (2004). Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia **49**(1): 125.
- Matsumoto, A. and W. K. Olson (2002). Biophys J **83**(1): 22.
- Miyaji, H., P. Anzenbacher, Jr., J. L. Sessler, E. R. Bleasdale and P. A. Gale (1999). Chem. Commun.: 1723.
- Miyaji, H., H. K. Kim, E. K. Sim, C. K. Lee, W. S. Cho, J. L. Sessler and C. H. Lee (2005). J Am Chem Soc **127**(36): 12510.
- Miyaji, H., W. Sato and J. L. Sessler (2000a). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **39**(10): 1777.
- Miyaji, H., W. Sato, J. L. Sessler and V. Lynch (2000b). Tetrahedron Lett. **41**: 1369.
- Moore, T. S. and T. F. Winmill (1912). J Chem Soc **101**: 1635.
- Moran, S., R. X. F. Ren and E. T. Kool (1997a). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94**(20): 10506.
- Moran, S., R. X. F. Ren, S. I. V. Rumney and E. T. Kool (1997b). Journal of the American Chemical Society **119**(8): 2056.
- Mori, T., Y. Hori and M. Dizdaroglu (1993). International journal of radiation biology FIELD Publication Date:1993 **64**(6): 645.
- Nackerdien, Z., K. S. Kasprzak, G. Rao, B. Halliwell and M. Dizdaroglu (1991). Cancer research FIELD Publication Date:1991 **51**(21): 5837.
- Newton, M. D., G. A. Jeffrey and S. Takagi (1979). J Am Chem Soc **101**: 1997.
- Nielsen, K. A., W. S. Cho, J. O. Jeppesen, V. Lynch, J. Becher and J. L. Sessler (2004). J Am Chem Soc **126**: 16296.
- Nishiyabu, R. and P. Anzenbacher, Jr. (2005). J Am Chem Soc **127**(23): 8270.
-



- Ohtsubo, T., K. Nishioka, Y. Imaiso, S. Iwai, H. Shimokawa, H. Oda, T. Fujiwara and Y. Nakabeppu (2000). Nucleic Acids Research **28**(6): 1355.
- Olinski, R., T. Zastawny, J. Budzbon, J. Skokowski, W. Zegarski and M. Dizdaroglu (1992). FEBS letters **309**(2): 193.
- Olson, W. K. (1982). Topics in Nucleic Acid Structure. London, Macmillan Press.
- Olson, W. K. (1996). Curr Opin Struct Biol **6**(2): 242.
- Olson, W. K. and V. B. Zhurkin (2000). Curr Opin Struct Biol **10**(3): 286.
- Orozco, M., C. A. Laughton, P. Herzyk and S. Neidle (1990). J Biomol Struct Dyn **8**(2): 359.
- Orozco, M., A. Perez, A. Noy and F. J. Luque (2003). Chem Soc Rev **32**(6): 350.
- Orozco, M., M. Rueda, J. R. Blas, E. Cubero, F. J. Luque and C. A. Laughton (2004). Encyclopedia of Computational Chemistry.
- Pauling, L. (1931). J Am Chem Soc **53**: 1367.
- Pauling, L. (1939). The Nature of the Chemical Bond. Ithaca, NY, Cornell University Press.
- Pauling, L. and R. B. Corey (1951). Proc Natl Acad Sci U S A **37**(11): 729.
- Pauling, L., R. B. Corey and H. R. Branson (1951). Proc Natl Acad Sci U S A **37**(4): 205.
- Pfeiffer, P. (1914). Berichte **47**: 1580.
- Phan, A. T., J. L. Leroy and M. Gueron (1999). J Mol Biol **286**(2): 505.
- Piatek, P., V. Lynch and J. L. Sessler (2004). J Am Chem Soc **126**: 16073.
- Pitsch, S., R. Krishnamurthy, M. Bolli, S. Wendeborn, A. Holzner, M. Minton, C. Lesueur, I. Schloenvogt, B. Jaun and et al. (1995). Helv. Chim. Acta **78**(7): 1621.
- Prabhakaran, M., S. C. Harvey, B. Mao and J. A. McCammon (1983). J Biomol Struct Dyn **1**(2): 357.

- Priyakumar, U. D. and A. D. MacKerell, Jr. (2006). Journal of Chemical Theory and Computation **2**(1): 187.
- Rauch, C., M. Trieb, B. Wellenzohn, M. Loferer, A. Voegelé, F. R. Wibowo and K. R. Liedl (2003). Journal of the American Chemical Society **125**(49): 14990.
- Rich, A. (1962). Horizons Biochem. (Michael Kasha and Bernard Pullman, editors. Academic Press): 103.
- Roberts, C., J. C. Chaput and C. Switzer (1997). Chemistry & Biology **4**(12): 899.
- Robinson, H., Y.-G. Gao, C. Bauer, C. Roberts, C. Switzer and A. H. J. Wang (1998). Biochemistry **37**(31): 10897.
- Robles, J., A. Grandas, E. Pedroso, F. J. Luque, R. Eritja and M. Orozco (2002). Current Organic Chemistry **6**(14): 1333.
- Rueda, M., E. Cubero, C. A. Laughton and M. Orozco (2004). Biophys J **87**(2): 800.
- Saenger, W. (1984). Principles of Nucleic Acid Structure. New York, Springer-Verlag.
- Saran, A., D. Perahia and B. Pullman (1973). Theor Chim Acta **30**: 31.
- Schmidtchen, F. P. (2002). Org. Lett. **4**: 431.
- Schmidtchen, F. P. (2005). Topics in Current Chemistry **255**(Anion Sensing): 1.
- Schrödinger, E. (1944). What is life? Cambridge, Cambridge University Press.
- Seela, F., C. Wei and Z. Kazimierczuk (1995). Helv. Chim. Acta **78**(7): 1843.
- Seibert, E., J. B. A. Ross and R. Osman (2002). Biochemistry **41**(36): 10976.
- Sepiol, J., Z. Kazimierczuk and D. Shugar (1976). Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences **31C**(7-8): 361.
- Sessler, J. L., D. An, W. S. Cho and V. Lynch (2003a). J Am Chem Soc **125**: 13646.
- Sessler, J. L., D. An, W. S. Cho and V. Lynch (2003b). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **115**: 2380.

- Sessler, J. L., D. An, W. S. Cho, V. Lynch and M. Marquez (2005a). Chem. Eur. J. **11**(7): 2001.
- Sessler, J. L., D. An, W. S. Cho, V. Lynch and M. Márquez (2005b). Chem Commun (Camb)(4): 540.
- Sessler, J. L., P. Anzenbacher, Jr., J. A. Shriver, K. Jursikova, V. Lynch and M. Marquez (2000a). J Am Chem Soc **122**: 12061.
- Sessler, J. L., W. S. Cho, D. E. Gross, J. A. Shriver, V. M. Lynch and M. Marquez (2005c). J Org Chem **70**(15): 5982.
- Sessler, J. L., P. A. Gale and J. W. Genge (1998). Chemistry--A European Journal **4**(6): 1095.
- Sessler, J. L., A. Gebauer and P. A. Gale (1997). Gazz. Chim. Ital. **127**: 723.
- Sessler, J. L., J. W. Genge, P. A. Gale and V. Kral (2000b). ACS Symposium Series **757**(Calixarenes for Separations): 238.
- Sessler, J. L., V. Král, T. V. Shishkanova and P. A. Gale (2002). Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 4848.
- Siddiqui-Jain, A., C. L. Grand, D. J. Bearss and L. H. Hurley (2002). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99**(18): 11593.
- Soares, T. A., P. H. Huenenberger, M. A. Kastenholz, V. Kraeutler, T. Lenz, R. D. Lins, C. Oostenbrink and W. F. Van Gunsteren (2005). Journal of Computational Chemistry **26**(7): 725.
- Sprous, D., M. A. Young and D. L. Beveridge (1999). J Mol Biol **285**(4): 1623.
- Stevens, E. D. (1978). Acta Crystallogr. **B34**: 544.
- Sugiyama, H., S. Ikeda and I. Saito (1996). Journal of the American Chemical Society **118**(41): 9994.
- Sundaralingam, M. (1976). Ann N Y Acad Sci **255**: 3.

- Tidor, B., K. K. Irikura, B. R. Brooks and M. Karplus (1983). J Biomol Struct Dyn **1**(1): 231.
- Topal, M. D. and J. R. Fresco (1976). Nature (London, United Kingdom) **263**(5575): 285.
- Tribolet, R. and H. Sigel (1987). Biophysical Chemistry **27**: 119.
- Trieb, M., C. Rauch, B. Wellenzohn, F. Wibowo, T. Loerting and K. R. Liedl (2004). Journal of Physical Chemistry B **108**(7): 2470.
- Turner, B., M. Botoshansky and Y. Eichen (1998). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **37**: 2475.
- van Hoorn, W. P. and W. L. Jorgensen (1999). J Org Chem **64**: 7439.
- Varnai, P., D. Djuranovic, R. Lavery and B. Hartmann (2002). Nucleic Acids Research **30**(24): 5398.
- Varnai, P. and R. Lavery (2002). J Am Chem Soc **124**(25): 7272.
- Wang, A. H., G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel and A. Rich (1979). Nature **282**(5740): 680.
- Wang, D.-F. and Y.-D. Wu (2004). Journal of Theoretical & Computational Chemistry **3**(1): 51.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). Nature **171**(4356): 737.
- Wattis, J. A., S. A. Harris, C. R. Grindon and C. A. Laughton (2001). Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys **63**(6 Pt 1): 061903.
- Wellenzohn, B., W. Flader, R. H. Winger, A. Hallbrucker, E. Mayer and K. R. Liedl (2002). Biochemistry **41**(12): 4088.
- Werner, A. (1902). Liebigs Ann **322**: 261.
- Woods, C. J., S. Camiolo, M. E. Light, S. J. Coles, M. B. Hursthouse, M. A. King, P. A. Gale and J. W. Essex (2002). J Am Chem Soc **124**: 8644.

Wu, Y. D., D. F. Wang and J. L. Sessler (2001). J Org Chem **66**(11): 3739.

Yang, X.-L., H. Sugiyama, S. Ikeda, I. Saito and A. H. J. Wang (1998). Biophys. J.  
**75**(3): 1163.

Young, D. W., P. Tollin and H. R. Wilson (1974). Nature **248**: 513.

Zhao, P.-L., H.-W. Sun, L. Chen, R.-X. Shen, P.-Q. Chen, J. Yuan, M.-X. Yuan and C.-  
M. Lai (2006). Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao **27**(2): 336.

## **4. Resultados**

El presente capítulo expone los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. Se sigue una estructura en tres bloques, de acuerdo con los diferentes temas estudiados:

- i) interacción de puente de hidrógeno en sistemas modelo: unión de aniones a calix-[4]-pirrol
- ii) dinámica esencial del ADN en disolución
- iii) tautomería de bases no canónicas de ADN

## **4.1. Estudio de la interacción de puente de hidrógeno en sistemas modelo: unión de aniones a calix-[4]-pirrol.**

Las interacciones de aniones con grupos dadores de puente de hidrógeno constituyen un importante factor regulador de muchos procesos bioquímicos. A fin de mejorar la comprensión sobre los factores que modulan tales interacciones, se ha investigado la unión de aniones a calix-[4]-pirrol, receptores orgánicos altamente flexibles que se emplean en la detección de aniones de importancia biológica.

Los objetivos del estudio se han centrado fundamentalmente en:

- conocer la afinidad de diversos aniones por el receptor, representando éste en aquella disposición tridimensional que maximice las interacciones con el ligando. En este estudio se ha evaluado el efecto ejercido por la naturaleza del solvente, el cosoluto hidratado y alguna sustitución química para la que disponemos de suficiente evidencia experimental.
- explorar la flexibilidad conformacional del receptor libre, examinando la probabilidad de encontrarlo en aquella disposición tridimensional que concentra un mayor número de grupos dadores de puente de hidrógeno dirigidos a un punto común. De nuevo, se ha evaluado la influencia del solvente y modificaciones químicas en la propiedad estudiada.

4.1.1. “Theoretical study of anion binding to calix[4]pyrrole: the effects of solvent, fluorine substitution, cosolute, and water traces”

J.R.Blas, M.Márquez, J. L.Sessler, F. J.Luque y M.Orozco

*Journal of the American Chemical Society* (2002) 124 (43): 12796-12805



Se ha empleado una extensa batería de cálculos de dinámica molecular asociados a integración termodinámica para describir con precisión las preferencias de unión de diferentes aniones al receptor calix-[4]-pirrol (CP). El efecto de la sustitución química de los hidrógenos  $\beta$ -pirrólicos por átomos de flúor (receptor 8F) en la definición de esta selectividad ha sido evaluado, juntamente con la influencia ejercida por la naturaleza del solvente o la presencia de cosolutos hidratados. Los resultados presentan una elevada concordancia con los datos experimentales, al tiempo que describen el comportamiento de estos receptores en solventes para los que no existen datos disponibles. Se confirma que la gran selectividad atribuida a estos receptores hacia el anión fluoruro en algunos solventes, es una característica general que se mantiene tanto en fase gas como en todos los entornos apróticos. Se observa, no obstante, cómo estas preferencias pueden modificarse de forma dramática en solventes próticos o en presencia del catión hidratado que suele emplearse como cosoluto del anión. En resumen, nuestro estudio proporciona ideas importantes para la mejor comprensión del proceso medido experimentalmente como “*binding*”.

4.1.2. “Exploring the dynamics of calix-[4]-pyrrole: effect of solvent and  
fluorine substitution”

J.R.Blas, J.M. López-Bes, M.Márquez, J. L.Sessler, F. J.Luque y M.Orozco

*Chemistry: A European Journal* (2006) 13, 1108-1116

Mediante cálculos de dinámica molecular se han explorado la flexibilidad conformacional de los receptores CP y su derivado octafluorado (8F) en diferentes solventes, confirmando que se trata de macrociclos extremadamente flexibles. La conformación 1,3-alternada es mayoritaria para el receptor CP en todos los entornos examinados, aunque su predominancia disminuye a medida que aumenta la polaridad del solvente. El escenario conformacional explorado por 8F es notablemente diferente, pudiendo ser mayoritaria la geometría pre-organizada en cono en ciertos entornos químicos. Nuestros cálculos cuantifican por primera vez la flexibilidad de estos receptores (entre 40 y 220 cambios conformacionales cada ns), mostrando cómo conformaciones consideradas muy inestables a partir de estudios previos basados en energías obtenidas en fase gas son accesibles con una frecuencia muy superior a lo que se creía. Paralelamente, se ha explorado la posibilidad de que el proceso de unión de aniones circule por vías alternativas a la clásica coordinación del ligando con un receptor pre-organizado. En concreto, se ha examinado la capacidad de la conformación 1,3-alternada para unir aniones con baja afinidad, mostrando cómo esta es capaz de transformarse en la forma cono manteniendo el anión unido. En resumen, el estudio realizado sugiere que i) el coste de preorganización no representa un impedimento importante para la unión de aniones por estos receptores, y ii) pueden darse eventos de preorganización guiada por el anión, con mayor o menor frecuencia en función del entorno químico y la naturaleza del receptor.

## **4.2. Dinámica esencial del ADN en disolución**

En el capítulo 3 se han indicado brevemente las principales tendencias del campo de la simulación del movimiento de los ácidos nucleicos. Este trabajo de tesis se propone aportar estrategias en la vía del análisis de los datos numéricos provenientes de estas simulaciones. El objetivo es definir una serie de descriptores potentes que permitan separar el ruido de la señal, haciendo más informativas las trayectorias sobre la dinámica de los ácidos nucleicos.

El conjunto de datos de referencia generados en esta tesis informan sobre la dinámica esencial de este biopolímero, pudiendo utilizarse en los análisis rutinarios de posteriores trabajos de simulación que exploren esta flexibilidad en un rango de tiempo semejante.

#### 4.2.1. “Exploring the Essential Dynamics of B-DNA”

A. Pérez, J.R.Blas, M.Rueda, J.M. López-Bes, X. de la Cruz y M.Orozco

*Journal of Chemical Theory and Computation* (2005) 1, 790-800

A partir de una extensa batería de simulaciones de dúplexes de ADN en conformación B, empleando técnicas de minería de datos, se han caracterizado de forma exhaustiva los rasgos esenciales de su comportamiento dinámico. Algunos de los sistemas estudiados contienen modificaciones químicas en las nucleobases, permitiéndonos examinar el grado de afectación de las pautas esenciales de movimiento generado por variaciones en el espacio químico. Algunos de los descriptores empleados, que se presentan por primera vez como herramientas de análisis en simulaciones de ADN y se les asignan valores de referencia, pueden pasar a formar parte del tratamiento de datos que debería realizarse rutinariamente para verificar la convergencia y fiabilidad de simulaciones de estas características.

### **4.3. Tautomería de bases no canónicas del ADN**

Como se ha explicado en el capítulo 3, la estabilidad tautomérica de los elementos constituyentes del ADN condiciona sus características estructurales y energéticas. En este trabajo de tesis se ha explorado el grado de mantenimiento de la constancia tautomérica de las bases en casos en que éstas han sido modificadas químicamente, bien sea mediante mecanismos naturales de oxidación, o bien por medio de estrategias sintéticas con vistas a obtener análogos de importancia biotecnológica. La variabilidad tautomérica asociada a estas nuevas moléculas puede ser muy elevada, y puede verse enormemente modulada por el entorno químico que las alberga.

#### 4.3.1. “Unique tautomeric properties of isoguanine”

J.R.Blas, F.J. Luque y M.Orozco

*Journal of the American Chemical Society* (2004) 126 (1), 154-164



Se aporta una descripción exhaustiva del escenario tautomérico de la isoguanina, un producto de la oxidación de la adenina causante de mutaciones en el ADN, en diferentes entornos químicos. Partiendo de cálculos QM de alto nivel se definen las preferencias tautoméricas en fase gas. Mediante el modelo de solvente continuo MST y cálculos MD/TI considerando solvente explícito, se explora el efecto de diferentes entornos de solvatación en estos equilibrios. Finalmente, se recurre de nuevo a cálculos MD/TI para explorar las preferencias tautoméricas de esta nucleobase cuando es introducida en el ADN, tanto frente a timina como frente a citosina. Nuestros resultados muestran la enorme plasticidad tautomérica de la isoguanina y la gran capacidad del entorno para modular la población relativa de sus diferentes formas. A su vez, la cuantificación de las  $\Delta\Delta G$  asociadas a la variación entre tautómeros en ADN complementa las evidencias experimentales existentes, clarificando las controversias existentes acerca de la naturaleza química de esta nucleobase.

#### 4.3.2. “Benzoderivatives of nucleic acid bases as modified DNA building blocks”

O. Huertas, J.R.Blas, I. Soteras, M.Orozco y F.J. Luque

*Journal of Physical Chemistry A* (2006) 110 (2), 510-518

Mediante el empleo de metodologías teóricas estándar se ha examinado de un modo sistemático las diferencias químicas existentes entre los benzoderivados de las bases del ADN y sus análogos naturales. Principalmente se ha descrito la estabilidad relativa de sus diferentes formas tautoméricas y el grado de conservación de éstas en disolución acuosa. Paralelamente, se han explorado otras propiedades como las energías de interacción por puente de hidrógeno, el patrón de reactividad de las caras Watson-Crick y Hoogsteen, la modificación de la hidrofobicidad y la variación de las energías de *stacking*. En conclusión, si bien la introducción de un residuo de benceno no altera prácticamente las pautas de reconocimiento por puente de hidrógeno, otras muchas propiedades presentan variaciones importantes, que pueden determinar un comportamiento muy distinto de las fibras de ADN que contengan estos derivados.