

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

Capítulo 5.

Discusión de resultados

Se presentarán en este apartado los principales resultados obtenidos en los trabajos expuestos en el bloque anterior.

5.1. Estudio de la unión de aniones a calix-[4]-pirrol

Se he realizado un estudio sistemático del proceso de unión de aniones calix-[4]-pirrol. En un primer artículo, se evaluó de forma exhaustiva la diferente afinidad de este receptor (CP) y su derivado octafluorado en las posiciones β (8F) por una serie de aniones de interés biológico mediante cálculos clásicos MD/TI y QM. Se ha explorado el efecto de varios solventes y del cosoluto añadido con el anión a la disolución (tanto catión como trazas de agua) en la afinidad de unión. En un segundo artículo, se ha realizado una caracterización exhaustiva de las preferencias conformacionales de ambos receptores en diferentes solventes, evaluando la posibilidad de que éstos adopten una conformación preorganizada para la unión en ausencia de anión y examinando su capacidad para unir aniones en conformaciones no optimizadas *a priori* para esta tarea.

5.1.1. Estudio teórico de la unión de aniones a calix-[4]-pirrol: efecto del solvente, fluoración, cosoluto y trazas de agua.

Tanto el receptor canónico (CP) como su derivado octafluorado (8F) muestran una marcada preferencia por la unión de F^- en fase gas y solventes muy apolares. Ahora bien, esta situación cambia en presencia del cosoluto añadido generalmente junto al anión en los experimentos de cuantificación de la unión (tetrabutilamonio trihidratado), que presenta una gran afinidad por el mismo anión, compitiendo por él con el receptor y disminuyendo el valor de afinidad observado experimentalmente. Nuestros estudios muestran la necesidad de ajustar las condiciones de la simulación a la situación experimental real y ofrecen una visión teórica del proceso de unión involucrado en los estudios experimentales.

El análisis de varios parámetros estructurales sobre los sistemas simulados por MD presenta una buena concordancia con los datos experimentales disponibles, a la vez que confirma la gran estabilidad de la forma *cone* para ambos receptores en presencia de un anión unido, independientemente del solvente. Analizando estas mismas simulaciones, se observa un crecimiento de las distancias de puente de hidrógeno $\sim\text{N-H}\cdots\text{anión}$ a medida que aumenta el diámetro del anión y un momento dipolar bastante superior en el derivado 8F (3.3 D vs 1.5D), fenómenos ambos que hacen prever variabilidad en la posterior estimación de las afinidades de unión.

Las diferencias en afinidad de unión en fase gas entre los diferentes aniones están fundamentalmente dirigidas por la variación en las energías de interacción. Así, la afinidad es mayor hacia aniones o grupos menos voluminosos (especialmente F^-). Esta mejora de la interacción con la reducción de la distancia de unión se confirma mediante cálculos GMIPp, que ponen en evidencia la destacada contribución de la interacción electrostática, así como que el término de polarización no es despreciable.

El 8F presenta una energía de interacción con los aniones más favorable que el receptor canónico (CP) en vacío. El término energético que marca principalmente las diferencias entre ambos es la interacción electrostática (aumento de la acidez de los protones amino), siendo otros términos, como la energía de polarización, equivalentes para los CP y 8F.

La evaluación de las afinidades de unión $\text{anión}\cdots\text{CP}/8\text{F}$ en fase condensada revela un escenario complejo que podría resumirse en los siguientes puntos:

- a pesar de las diferencias en la naturaleza química de los solventes considerados, su afinidad por los aniones estudiados sigue siempre la tendencia siguiente: $\text{F}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$. En ella, la solvatación de los halogenuros evoluciona según se espera por su tamaño (teoría de Born) y la posición del H_2PO_4^- se explica, pese a su gran tamaño, por la elevada alternancia de grupos dadores/aceptores de puente de hidrógeno en su estructura. Este dato confirma la importancia de considerar este tipo de interacciones, además de la constante dieléctrica, al valorar la capacidad del entorno químico para solvatar aniones.

- la solvatación es un tema muy importante para entender la unión de aniones a CP y 8F en todos los solventes, incluso en los más apolares. De hecho, el orden de afinidad por los diferentes aniones depende fuertemente de las características del solvente, siendo posible distinguir dos situaciones:
 - o solventes apróticos (diclorometano, acetonitrilo y DMSO), donde las afinidades siguen la regla $F^- \gg Cl^- > H_2PO_4^- > Br^-$. Con respecto a la tendencia observada en fase gas, la intensa solvatación que padecen tanto F^- como $H_2PO_4^-$ reduce la magnitud de su afinidad por el receptor, siendo este factor el principal responsable de las diferencias observadas.
 - o solventes próticos (metanol), donde se observan ligeras diferencias entre la unión a CP ($H_2PO_4^- \geq Cl^- \geq Br^- \geq F^-$) y a 8F ($H_2PO_4^- > Cl^- > F^- > Br^-$). En este caso, la solvatación diferencial de $H_2PO_4^-$ y F^- revierte las preferencias de unión observadas en ausencia de solvente.
- se pone de manifiesto una mayor capacidad selectiva del receptor 8F respecto a CP en la mayoría de solventes, lo que aboga a favor de su incorporación en aplicaciones industriales de detección de aniones.

Los resultados obtenidos concuerdan con la evidencia experimental existente. Esta concordancia se manifiesta en los siguientes puntos:

- el F^- es el anión preferido de CP en diclorometano (Gale et al. 1996; Gale et al. 1997; Gale et al. 1998; Miyaji et al. 1999; Anzenbacher et al. 2000b; Sessler et al. 2000a)
- la afinidad de CP por Cl^- es mayor que por Br^- en diclorometano (Gale et al. 1996; Miyaji et al. 1999; Anzenbacher et al. 2000b)
- 8F es un mejor receptor de aniones que CP (Sessler et al. 2000b)
- la preferencia que estos receptores muestran por Cl^- vs $H_2PO_4^-$ en solventes apróticos es muy ligera, con lo que podría presumiblemente revertir si se introducen pequeñas variaciones en la estructura del receptor o en el entorno químico de la reacción, como se ha visto en acetonitrilo y diclorometano (Anzenbacher et al. 1999; Miyaji et al. 1999; Anzenbacher et al. 2000a; Anzenbacher et al. 2000b; Sessler et al. 2000a; Turner et al. 2001)

Pese a estas similitudes, los resultados obtenidos en nuestro trabajo también muestran divergencias con los datos experimentales. Por ejemplo, las afinidades relativas por los

diferentes aniones describen tendencias muy claras, mientras que en la literatura experimental existe una discrepancia sobre la afinidad relativa de CP por F^- vs Cl^- en diferentes solventes. Basándose en mediciones realizadas en diclorometano, Sessler y colaboradores proponen que CP une F^- con elevada afinidad respecto a Cl^- . Por otro lado, estudios realizados en acetonitrilo (Schmidtchen 2002) o en DMSO (Camiolo and Gale 2000) no detectan en absoluto esta selectividad. Otra discrepancia importante se centra en la cuantificación de las diferencias de afinidad de CP por F^- vs Cl^- en diclorometano. Mientras nuestros resultados predicen una afinidad de $-15.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para la unión de Cl^- respecto a F^- , las diferentes estimaciones experimentales otorgan siempre valores en el rango de $1-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

En el campo del modelado molecular, las discrepancias con respecto al experimento suelen atribuirse a una parametrización errónea del campo de fuerzas, a un muestreo incompleto o a otras condiciones del protocolo de simulación. No obstante, otros autores (van Hoorn and Jorgensen 1999), en un estudio similar realizado sobre otro receptor y empleando MC en lugar de MD, encuentran esta misma diferencia de un orden de magnitud en la $\Delta\Delta G$ de unión de F^- vs Cl^- , lo que indica que posiblemente no se trata de un error técnico. El análisis del protocolo de medida de las constantes de afinidad de unión nos permitió detectar la presencia de un ligando interferidor que había permanecido ignorado: el cosoluto hidratado. En un intento de simular estas condiciones, se parametrizaron estos componentes químicos y se repitió toda la batería de cálculos MD/TI considerando ahora, en las transformaciones en “solvente puro”, la presencia de estas especies. Los resultados obtenidos muestran una variación dramática de las afinidades relativas al anión F^- en los solventes apróticos. Si se realiza un seguimiento microscópico de las simulaciones MD/TI se observa cómo es éste el único anión que permanece unido al cosoluto catiónico. En el caso de metanol, este comportamiento no ocurre, dado que el anión F^- puede formar interacciones de puente de hidrógeno muy favorables con las moléculas de solvente, evitando así el contacto directo con el catión. Al realizar los cálculos de energía libre en presencia de cosoluto, la preferencia de F^- vs Cl^- se redujo a $\sim 3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en diclorometano, mostrando un notable acuerdo con el rango de valores experimentales ($1-3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Esta aproximación resuelve también las discrepancias encontradas en DMSO (Camiolo and Gale 2000) sobre la aparente inespecificidad del CP por F^-/Cl^- en este solvente. Los

cálculos teóricos permiten detectar cómo la unión receptor-ión es en verdad un proceso de competición receptor-ión vs ión-cosoluto.

5.1.2. Exploración de la dinámica del calix-[4]-pirrol: efecto del solvente y la fluoración.

La energía libre de unión de aniones a un receptor orgánico viene modulada por la capacidad de éste para adoptar una disposición estructural que le permita una interacción óptima con el ligando. Conocemos, por estudios anteriores, que el CP en disolución, en ausencia de anión, no suele adoptar su conformación pre-organizada para la unión (forma *cone*), pero ignoramos cuál es el espacio conformacional accesible de esta molécula en forma no complejada y cómo cambia al unir el ligando. Estos estudios nos muestran algunas tendencias conformacionales de estos macrociclos:

- se trata de moléculas altamente flexibles,
- la conformación más estable en entornos apolares es la 1,3-alternada (*13al*), pero las conformaciones 1,2-alternada (*12al*), como parcial (*paco*) y *cone* pueden aumentar su población por efecto de algunos ligandos, iones o incluso moléculas del solvente,
- finalmente parece que la barrera energética predicha para la transformación entre las formas *13al* y *cone* en fase gas es de $16 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, y de $11 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en diclorometano, una diferencia que se antoja excesiva por el hecho de que requeriría un enorme trabajo de preorganización.

No obstante, aún no existe ningún estudio que racionalice de una forma sistemática este escenario conformacional y la influencia que sobre él ejercen las características del solvente o de las sustituciones químicas. A partir de un muestreo exhaustivo del espacio conformacional del CP y 8F en cuatro entornos químicos representativos (metanol, DMSO, acetonitrilo y diclorometano) mediante simulaciones de MD, se aporta una descripción más exhaustiva del escenario que exploran en ausencia de ligandos aniónicos.

El examen de los datos muestra que la frecuencia de transiciones conformacionales es mucho más elevada de lo que sugieren las evidencias anteriores y que la conformación

pre-organizada para la unión se alcanza con relativa facilidad, pudiendo llegar a ser incluso mayoritaria en algunos entornos químicos.

En el caso del receptor CP, la forma mayoritaria es la *13al* en todos los solventes, le siguen en importancia las formas *paco* y *12al* (cuya posición relativa se alterna en algunos entornos), y finalmente la conformación adoptada con menor frecuencia es la *cone*. Aún así, esta forma puede llegar a poblar el 3% del espacio conformacional en solución, que es un valor muy superior al que le correspondería según las predicciones energéticas comentadas anteriormente.

Las preferencias conformacionales del receptor 8F cambian notablemente y presentan una marcada dependencia del entorno de solvatación, llegando a ser incluso la forma *cone* la mayoritaria en DMSO. Este hecho advierte de la importancia de no extrapolar las preferencias estructurales del CP a sus inmediatos derivados químicos, y la necesidad de considerar el efecto del solvente en el equilibrio conformacional de esta molécula.

De acuerdo con la intuición química, puede verse como la energía intramolecular favorece la conformación *13al*, mientras que la solvatación favorece a la forma *cone*, dado su mayor momento dipolar. Es curioso observar cómo las energías asociadas a cada familia estructural difieren entre solventes, lo cual sugiere que dentro de la variabilidad existente en cada clase estructural, el entorno sesga el movimiento del receptor hacia aquel subconjunto de conformaciones con mejor solvatación.

Respecto a la concordancia con los datos propuestos por estudios anteriores, las diferencias energéticas intrínsecas entre *13al* y *cone* reportadas aquí son mucho menores que las que se habían sugerido en varios estudios. La razón es que pueden distinguirse dos formas *cone*, la descrita en nuestro estudio, en el que se clasifican como *cone* todas las formas que dirigen los 4 grupos amino hacia una misma cara, y la de los estudios anteriores, que nosotros denominamos *activated cone*, en la que simplemente se ha eliminado el anión de un complejo anión \cdots CP y se ha calculado la energía interna del receptor sin relajar. Las energías obtenidas en simulaciones adicionales en las que mantuvimos el receptor en esta forma final coinciden aceptablemente con los resultados mecanocuánticos, lo cual indica que la unión de un anión a CP añade una penalización

energética al coste de adopción de la forma *cone*, que queda compensada por el aumento de la interacción electrostática con el anión. En resumen, la forma *activated cone* no es una representación óptima del tipo de conformación *cone* que puede adoptarse espontáneamente en disolución.

A partir del análisis de las simulaciones, podemos conocer en más detalle las rutas escogidas por los diferentes receptores para fluctuar dentro de sus posibilidades estructurales. En resumen, muy raramente se observan transiciones directas entre las formas *13al* y *cone*. El empleo de la forma *paco* como punto intermedio forma parte del comportamiento habitual. La forma *12al*, pese a ser visitada con frecuencia en algunos entornos, nunca se emplea como vía directa de paso al estado pre-organizado.

Algunas simulaciones especiales, donde se colocó inicialmente el anión unido a la forma *13al*, muestran en todos los casos una rápida transición del receptor a la conformación *cone* sin perder la coordinación con el anión. Este fenómeno indica que la unión de ligandos aniónicos a estos macrociclos no precisa necesariamente de un estado pre-organizado en *cone*, sino que otras conformaciones, pese a presentar menor afinidad por el anión, pueden actuar de puerta de entrada para la formación de complejos más estables.

En resumen, nuestros resultados describen por una parte el escenario conformacional del CP como un conjunto complejo de posibilidades, poniendo de manifiesto que pequeñas modificaciones químicas o variaciones en el entorno de solvatación pueden modular notablemente las poblaciones relativas de cada conformero. Por otro lado, indican cómo la captación de aniones por este tipo de receptores no queda restringida a un estrecho rango de su espacio conformacional. Finalmente, CP y 8F no sólo presentan una elevada afinidad por el ión, sino que además presentan un mecanismo cinético más complejo y variado de unión al ligando.

5.2. Estudio de la flexibilidad y las propiedades tautoméricas del ADN

Un sistema biológico paradigmático cuya flexibilidad y estabilidad están parcialmente moduladas por la presencia de interacciones débiles del tipo puente de hidrógeno es el ADN. En el presente trabajo se han explorado, por una parte, los rasgos que definen su flexibilidad esencial y, por otra, diversos aspectos referentes a la estabilidad tautomérica de formas no canónicas de este biopolímero, bien sean debidas a fenómenos de mutación química o a la introducción de análogos sintéticos de interés biotecnológico. Los resultados han sido presentados en el apartado IV en forma de tres publicaciones, y serán brevemente comentados en esta sección.

5.2.1. Exploración de la dinámica esencial del B-ADN

Empleando una extensa colección de simulaciones MD realizadas sobre dúplexes de ADN de diferente secuencia, algunos de los cuales contienen análogos artificiales o mutados de las bases canónicas, se ha examinado el grado de conservación de las pautas esenciales de movimiento de esta molécula por MD en una escala de tiempo de varios nanosegundos, haciendo especial hincapié en la aplicación de nuevas herramientas analíticas en esta tarea. El tamaño de la ventana temporal explorada se considera suficiente para recoger el comportamiento dinámico esencial de los ácidos nucleicos en disolución.

Siguiendo el esquema básico trazado en el artículo, la presente discusión recorrerá los siguientes apartados:

- descripción de la dinámica esencial
- cálculos de entropía
- deformabilidad de los parámetros helicoidales

5.2.1.1. Descripción de la dinámica esencial

Las principales evidencias halladas en la exploración de las pautas esenciales de flexibilidad del ADN quedan resumidas en los siguientes puntos:

- Cerca del 100% de la varianza conformacional del ADN (según análisis sobre los segmentos centrales *-8-mer-* o sobre fragmentos más largos *-13-mer-*) queda explicada por alrededor de 100 vectores propios. Esto denota la existencia de un espacio de flexibilidad mucho más reducido en el caso del ADN que en las proteínas, donde que un número similar de modos explica ~85% de la varianza.
- Las constantes de fuerza asociadas a la deformación del biopolímero a lo largo de cada uno de los 10 modos más relevantes no superan nunca el valor de $50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$, lo cual implica que las frecuencias de vibración asociadas son realmente bajas (entre 13 y 44 cm^{-1}).

Estos datos indican que los dúplexes de ADN son moléculas muy flexibles, tal como indica la comparación entre las estructuras que exploran los puntos extremos de fluctuación a lo largo del primer modo de deformación en cada simulación. Así, los valores de RMSD obtenidos están en el rango de 3.5 - 4.6 Å , que es una cifra realmente elevada considerando que se refiere a la fluctuación en una única dimensión. Por tanto, a temperatura ambiente, la flexibilidad del ADN permite muchas estructuras posibles.

- La progresión del valor de las constantes de fuerza asociadas a cada vector propio sigue una tendencia exponencial a medida que incrementa el número de orden. Así pues, el valor de la constante asociada al modo i -ésimo (K_i) puede encontrarse mediante una fórmula del tipo $K_i = A \cdot e^{Bi}$, donde los parámetros A y B pueden parametrizarse mediante un conjunto de simulaciones extenso como el que se presenta ($A=0.005575$; $B=0.2126$; sobre los fragmentos *8-mer* para obtener K_i en $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$). Estos datos indican que las constantes asociadas a los primeros modos presentan poca dependencia con la naturaleza química de la secuencia de bases. Asimismo, simulaciones de ADN que presenten tendencias muy diferentes en la progresión de las constantes de fuerza podrían considerarse de fiabilidad dudosa.
- El espacio conformacional explorado por un ADN, inicialmente determinado por la fluctuación de $3N-6$ variables (siendo N el número de partículas de la molécula), puede representarse mediante un conjunto mucho más reducido de variables que denominamos *dimensionalidad* del sistema. Es curioso observar cómo variaciones en la secuencia no afectan ostensiblemente el valor de la

dimensionalidad, que es aproximadamente lineal con la longitud de la fibra (pares de bases; bp) según la ecuación $\text{dim} = 4.71 \cdot \text{longitud}(bp) + 8.9$. Ello significa que la adición de un par de bases implica la necesidad de añadir aproximadamente 5 vectores propios a la dimensionalidad del sistema. De acuerdo a esta idea, longitudes de simulación que permiten el muestreo de la dimensionalidad completa de un sistema no tienen porqué asegurar la correcta exploración del espacio conformacional accesible a un ADN de tamaño ligeramente superior.

- La similaridad entre las pautas esenciales de movimiento de los sistemas analizados, medida como solapamiento entre vectores propios según el índice γ , es muy elevada ($\gamma = 0.6-0.8$). Si comparamos únicamente el solapamiento entre los principales modos (índice ξ), la similaridad es aún mayor. La obtención de los vectores propios para una macrotrayectoria que contenga todos los sistemas analizados nos permite describir, junto a las deformaciones debidas a la fluctuación térmica de un ADN genérico, las ocasionadas por variaciones en la estructura química. La comparación de esta macrotrayectoria con cada una de las diferentes simulaciones individuales genera índices ξ en el rango 0.7-0.8, indicando que la flexibilidad generada por variaciones en el espacio químico queda recogida dentro de las pautas genéricas del movimiento del ADN sujeto a fluctuación térmica.

5.2.1.2. Cálculos de entropía

Una manera de cuantificar la libertad conformacional de una molécula cuyo movimiento puede describirse dentro de la aproximación *quasi-armónica* es la entropía calculada según la metodología de Schlitter (E_S) (Schlitter 1993) o Andricioaei-Karplus (E_{AK}) (Andricioaei and Karplus 2001). La segunda aproximación reporta valores absolutos ligeramente inferiores a las estimaciones E_S , pero ambas resultan válidas en términos relativos.

Los valores de la entropía están especialmente sujetos a la variación en la longitud de la simulación. A partir de simulaciones cortas de tamaño creciente (entre 500 y 3500 ps),

pueden obtenerse estimaciones de la entropía para tiempos muy largos. En base a nuestros resultados se puede concluir que:

- la dependencia de la entropía con la duración de la simulación es mucho más notoria a medida que crece el tamaño del sistema. Ello nos induce a considerar con mucha precaución las estimaciones puntuales del valor absoluto de esta magnitud realizadas sobre ADNs de doble cadena en el rango de tiempo de 1 a 10 ns.
- los valores de a y b (ecuación 2.67, ver capítulo II) son muy similares en todos los sistemas explorados ($\alpha = 24.3 \pm 3.2$ y $\beta = 0.62 \pm 0.03$). Esto nos sugiere que simulaciones en las que el ajuste de la entropía se aleje considerablemente de esta tendencia deben ser consideradas con cautela, ya que podrían estar explorando desviaciones estructurales que escapen a una descripción armónica.
- la variación de los valores de entropía entre las diferentes secuencias es muy moderada, lo que constituye una prueba más de que la magnitud de la flexibilidad del ADN depende principalmente de la naturaleza polimérica de su esqueleto químico, siendo bastante insensible a ligeras variaciones químicas en las bases nitrogenadas.

5.2.1.3. Deformabilidad de los parámetros helicoidales

Se observan algunas variaciones en las constantes de deformabilidad helicoidal asociadas a las diferentes secuencias locales. Destaca, por ejemplo, el caso de los pasos GC/GC, que presentan una mayor rigidez para cualquiera de los parámetros helicoidales medidos. No obstante, el análisis de las propiedades helicoidales muestra de nuevo cómo la flexibilidad del ADN está principalmente modulada por sus propiedades poliméricas intrínsecas y no por la secuencia de bases.

Finalmente, del análisis de todas nuestras trayectorias puede extraerse la conclusión de que los términos *flexibilidad* o *rigidez* deben expresarse a menudo de una forma más precisa. Una determinada secuencia de ADN puede ser altamente flexible en cuanto a su capacidad de enrollamiento (*twisting*), pero presentar una gran rigidez en lo referente al estiramiento (*stretching*) o al plegamiento (*bending*). Asimismo, una gran

deformabilidad en el espacio de coordenadas helicoidales locales, puede manifestarse como una flexibilidad mucho más reducida al considerar el movimiento general del dúplex en el espacio cartesiano.

5.2.2. Propiedades tautoméricas de la isoguanina

Se ha realizado un estudio sistemático del escenario tautomérico de la isoguanina (*isoG*) en diferentes entornos químicos. El efecto de estas preferencias en la formación de apareamientos estables con diferentes bases canónicas ha sido descrito, clarificando el origen de la elevada capacidad mutagénica de este derivado de oxidación de la adenina.

5.2.2.1. Estabilidades relativas en fase gas

Inicialmente, se han descrito las preferencias tautoméricas intrínsecas de la *isoG* en fase gas mediante cálculos QM. Según indican las estimaciones QM de mayor precisión, las formas más estables en fase gas son las amino-enol (AE), siendo la forma *cis* (AE_c) ligeramente ($0.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) más estable que la forma *trans* (AE_t) (para las estructuras químicas véase la figura 2 del correspondiente artículo –capítulo IV-). Las formas amino-oxo (AO1 y AO3) están desestabilizadas en vacío por $\sim 7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y los tautómeros imino-oxo e imino-enol quedan muy desfavorecidos. Estas preferencias encontradas en fase gas concuerdan notablemente con la evidencia experimental anterior (Sepiol et al. 1976; Seela et al. 1995).

5.2.2.2. Efecto del solvente

La enorme variabilidad de momentos dipolares (entre 2 y 14.2 D) y pautas de reconocimiento por puente de hidrógeno que presentan los diferentes tautómeros de la *isoG* hacen prever la gran influencia que ejercerá el solvente en la modulación de sus estabilidades relativas. Los cálculos de solvatación en cuatro entornos químicos de diferente polaridad (agua, cloroformo, tetracloruro de carbono y octanol), empleando dos metodologías alternativas (cálculos SCRF-MST y MD/TI), muestran cómo, de forma creciente a medida que aumenta la polaridad del solvente, se produce una estabilización de aquellos tautómeros que presentan una mayor separación de cargas

respecto a los que presentan momentos dipolares reducidos. Las energías libres de tautomerización en diferentes solventes muestran ahora una variabilidad mucho menor (el rango de $60 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en fase gas se ha reducido a $24 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) y el escenario de preferencias tautoméricas queda notablemente transformado. Las predicciones para un entorno acuoso muestran las formas AO1 y AO3 como las más favorables, con una diferencia muy baja ($\sim 1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) respecto a los tautómeros AE. Según estas estimaciones, la *isoG* en fase acuosa puede encontrarse con una probabilidad aceptable en uno de cuatro estados tautoméricos posibles (AO1, AO3, AE_t, AE_c), predicción que concuerda con las observaciones experimentales previas (Sepiol et al. 1976; Pitsch et al. 1995; Seela et al. 1995) y con estudios teóricos previos empleando un modelo de solvente muy simplificado (Roberts et al. 1997).

5.2.2.3. Formación de apareamientos *isoG*·T e *isoG*·C en fase gas

Tras analizar el efecto de entornos de solvatación homogéneos sobre las estabilidades tautoméricas relativas, se ha examinado la interacción por puente de hidrógeno con una base complementaria en fase gas. Se ha evaluado la interacción con timina y guanina, por el interés que estos apareamientos tienen en el planteamiento de la parte final del trabajo. Del gran conjunto de posibilidades (nótese que *isoG* puede presentar todas las posibles pautas de puente de hidrógeno en su cara Watson-Crick) únicamente se han considerado aquellos apareamientos que involucran tautómeros no excesivamente inestables en fase gas.

Pares *isoG*·T

De los seis dímeros estudiados, tres presentan una geometría *wobble* y tres adoptan una disposición canónica Watson-Crick (WC). Todos ellos presentan dos interacciones de puente de hidrógeno salvo el par AE_c·T, que consigue formar tres. La planaridad del par de bases, necesaria para su incorporación al ADN, se mantiene en todos los casos, excepto en el par AO3·T, donde existe una ligera desviación del plano provocada por la interacción desfavorable entre dos grupos carbonilos.

A partir de las diferentes estimaciones teóricas de la energía de interacción, podemos concluir los siguientes puntos: i) no existe una diferencia clara de energía entre los pares de bases por el hecho de presentar una geometría *wobble* o WC, ii) la interacción entre isoG y T, en función del tipo de tautómero implicado, presenta una estabilización energética (9-18 kcal·mol⁻¹) comparable a la de un par A·T (12-14 kcal·mol⁻¹).

Si consideramos la estabilidad intrínseca de cada tautómero por separado, podemos ordenar los diferentes pares isoG·T según su estabilidad en fase gas: AE_c·T (-16.8 kcal·mol⁻¹) >> AE_t·T (-11.5 kcal·mol⁻¹) > AO1·T (-9.7 kcal·mol⁻¹) >> AO3·T (-4.8 kcal·mol⁻¹) >> I_tO13·T (-1.7 kcal·mol⁻¹) > I_cO13·T (-1 kcal·mol⁻¹).

Pares isoG·C

En esta ocasión se han considerado relevantes únicamente cinco dímeros. En ellos, a pesar de que el patrón esperado de interacciones por puente de hidrógeno se conserva (cuatro tautómeros forman dos interacciones con C y únicamente uno -1E_cI_t- puede unirse mediante tres puentes de hidrógeno), la planaridad sólo se conserva en dos casos (I_cO13·C y 1E_cI_t·C).

Los cuatro apareamientos que presentan una doble interacción de puente de hidrógeno conllevan una estabilización (-11 a -15 kcal·mol⁻¹) ligeramente menor que los mejores pares isoG·T y muy inferior (~15 kcal·mol⁻¹ menor) con respecto a la interacción canónica G·C. Existe, no obstante, un tautómero (1E_cI_t) capaz de formar tres puentes de hidrógeno con isoG, adoptando una geometría WC perfecta. La estabilización asociada a esta interacción es muy elevada e incluso superior a la de los pares G·C, pero implica una forma tautomérica minoritaria. Así, incluyendo la estabilidad intrínseca de cada tautómero en su forma aislada, el orden de los diferentes pares isoG·C según su estabilidad en fase gas sería el siguiente: AE_c·C (-12.8 kcal·mol⁻¹) ≈ 1E_cI_t·T (-12.2 kcal·mol⁻¹) >> AO1·C (-6.7 kcal·mol⁻¹) > I_tO13·T (-4.1 kcal·mol⁻¹) >> I_cO13·T (2.1 kcal·mol⁻¹).

Estos datos sugieren que isoG, frente a C en fase gas, debe existir como una mezcla de dos tautómeros (AE_c y 1E_cI_t). Puede observarse, por tanto, cómo la presencia de una

base complementaria, con un patrón específico de grupos dadores/aceptores de puente de hidrógeno, puede desviar la naturaleza química de la isoG hacia formas tautoméricas que serían inexistentes según sus preferencia intrínsecas.

5.2.2.4. Formación de apareamientos isoG·T e isoG·C en el ADN

A fin de completar la descripción de la variabilidad tautomérica de isoG, se ha estudiado el efecto asociado a la inclusión de esta nucleobase en un entorno químico anisotrópico como el ADN, entendiendo que una caracterización detallada en este sistema biológico resulta crucial para la comprensión de los mecanismos químicos responsables de su mutagenicidad. Así, se han analizado cuatro posibles apareamientos isoG·T y cinco isoG·C introducidos cada uno en la posición central de un dúplex 11-mer. Como estructura inicial se tomó en todos los casos la proveniente de los estudios de cristalografía de rayos X obtenida por Robinson y colaboradores (Robinson et al. 1998).

El análisis de las diferentes trayectorias de MD para cada tautómero muestra que en ningún caso se detectan anomalías remarcables en la estructura y flexibilidad globales del ADN, lo que vuelve a constituir una prueba de que la variación en la estructura química de las bases, aún cuando esta implica la adopción de geometrías de *pairing* diferentes de las WC, no altera la dinámica esencial del ADN (ver apartado 5.2.1 en este mismo capítulo). La conservación de los patrones esperados de interacción por puente de hidrógeno indica, a su vez, que todos los apareamientos propuestos son tolerados por la estructura del ADN, aún cuando su estabilidad exige la formación de disposiciones tipo *wobble*.

Pares isoG·T en el ADN

La magnitud del efecto de solvatación ejercido por el ADN es superior a la de solventes homogéneos muy polares, como el agua, y la estabilización relativa de los diferentes tautómeros no tiene porqué reproducir las mismas preferencias que se observaban en este solvente. Según las estimaciones MD/TI, las formas tautoméricas de isoG frente a T en el ADN son estabilizadas en el siguiente orden: AO1 > I_cO13 > I_tO13 > AE_c. De cara a indagar en el origen de estas diferencias, se han examinado las energías de

interacción (puente de hidrógeno + *stacking* inter- e intracadena) entre cada una de las nucleobases de la tríada central del dúplex. La mayor estabilización por puente de hidrógeno corresponde al dúplex que alberga el par $AE_c \cdot T$, siendo el formado por el par $I_cO13 \cdot T$ el que presenta la mayor estabilización por *stacking*. Tomadas en su conjunto, las energías de interacción entre las bases de la tríada central otorgan unas preferencias ($AE_c > I_cO13 > AO1 > I_cO13$) que no reproducen lo observado a partir de cálculos MD/TI. Esta divergencia sugiere que la modulación ejercida por otros factores, como la entropía, interacción con el solvente u otro tipo de interacciones con el ADN, complementan el efecto estabilizador del entorno de secuencia, pudiendo modificar las preferencias tautoméricas de la isoG.

Contrastando los datos de energía libre relativos obtenidos por MD/TI con las estabilidades intrínsecas de cada tautómero en fase gas, podemos obtener las $\Delta\Delta G$ asociadas a los equilibrios tautoméricos de isoG en este entorno. La observación de estos valores indica que la isoG en ADN, frente a T, puede encontrarse con igual probabilidad en dos tautómeros (AE_c y $AO1$), siendo la población de las formas imino claramente negligible. Sorprendentemente, los datos obtenidos ofrecen una justificación cuantitativa a la detección experimental de dos geometrías diferentes (*wobble* –que correspondería al par $AO1 \cdot T$ -, y *WC* –presumiblemente formada por el par $AE_c \cdot T$ -) en la estructura cristal reportada por Robinson y colaboradores (Robinson et al. 1998), donde se aludía a la posibilidad de que isoG se presentase en la naturaleza en forma de dos tautómeros. La diferencia de estabilidad asignada por nuestros cálculos a ambos pares isoG·T es muy pequeña, por lo que variaciones en el entorno de secuencia, efectos del solvente o asociación con otras moléculas, pueden modificar las poblaciones relativas de ambas especies. Es posible especular, además, que la incorporación enzimática de isoG frente a T en ADN, que exige un apareamiento WC, se realice mediante la forma AE_c , que al ser más parecida a un par canónico A·T no desencadenaría los mecanismos de reparación anexos a la ADN polimerasa.

Pares isoG·C en el ADN

Se han considerado cinco posibles pares isoG·C. Análogamente al caso anterior, se ha determinado mediante cálculos MD/TI la magnitud diferencial de la “solvatación”

provocada por el ADN, encontrándose que estabiliza las diferentes formas tautoméricas según el siguiente orden: $1E_cI_t > AO1 > AE_c > I_cO13 > I_tO13$.

El análisis de la energías entre las nucleobases de la tríada central indica que los dúplexes que contienen la forma AO1 son los más favorecidos en base al *stacking*, mientras que los puentes de hidrógeno favorecen la forma $1E_cI_t$, aunque con diferencias respecto a los sistemas que contienen AO1 menores que la calculada en fase gas. Curiosamente, en el caso de isoG·C, las preferencias obtenidas mediante el análisis energético del segmento central del dúplex coinciden cualitativamente con las estimaciones de estabilidad global provenientes de cálculos MD/TI.

Las $\Delta\Delta G$ de tautomerización obtenidas contrastando datos cuánticos de estabilidad intrínseca de tautomería con datos MD/TI del efecto del ADN muestran que el tautómero AE_c es la forma en la que habitualmente se encuentra la isoG en un dúplex de ADN frente a C. Conscientes del grado de incertidumbre asociado a la metodología empleada, no podemos descartar que, en ciertas secuencias o determinados entornos químicos, la forma AO1 (desestabilizada por $\sim 2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) pueda ser detectada.

Existe cierta controversia en la literatura experimental acerca de la población de los diferentes tautómeros de isoG en estas condiciones. Basándose en experimentos de *melting* y en algunas consideraciones teóricas, un estudio propone que los tautómeros más estables serían las formas I_tO13 y $1E_cI_t$ (Roberts et al. 1997). Observando la incorporación de esta nucleobase por ADN polimerasas, Kamiya y colaboradores (Kamiya et al. 2000) postulan la existencia de dos formas tautoméricas predominantes (AO1 y AE_c), unidas a la C mediante geometrías tipo *wobble*. En ausencia de datos estructurales de alta resolución para estos sistemas, nuestras predicciones teóricas refuerzan esta última hipótesis, otorgando una mayor importancia al tautómero AE_c .

Finalmente, queremos fijar la atención en el hecho de que la geometría de los pares $AE_c \cdot C$ y $AO1 \cdot C$ es en ambos casos del tipo *wobble*. Nuestros cálculos sugieren que los dúplexes de ADN que incluyen estos pares son sistemas estables. No obstante, según la evidencia experimental, la incorporación de nucleobases mediante ADN polimerasas precisa la formación de pares con geometría WC (Washington et al. 2003). Creemos que esta podría ser una razón de peso para explicar la dificultad de las ADN polimerasas

en la construcción de dúplexes con pares isoG·C detectada experimentalmente (Switzer et al. 1989; Switzer et al. 1993; Roberts et al. 1997; Kamiya et al. 2000).

En resumen, el presente estudio constituye una muestra de cómo los efectos de entorno pueden alterar considerablemente el número y la naturaleza de las formas químicas que determinan las pautas de reactividad de la isoguanina. La descripción de su escenario tautomérico en diferentes entornos químicos permite conocer la base de fenómenos como la presencia de varias geometrías de *pairing* en un dúplex de ADN o las diferentes preferencias de inserción de estos derivados mutados por parte de la maquinaria celular.

5.2.3. Estudio de las propiedades tautoméricas de benzoderivados: elementos constituyentes de ADNs artificiales

El objetivo fundamental de este trabajo consiste en describir las preferencias tautoméricas de los benzoderivados de las bases canónicas del ADN en fase gas, así como la modulación que sobre ellas ejerce el efecto del solvente. Para ello se han realizado estimaciones de la energía relativa entre diferentes tautómeros mediante cálculos DFT, empleando el método continuo MST/SCRF y una aproximación clásica (MC/FEP) en la evaluación de la influencia del solvente.

5.2.3.1. Tautomería de benzoadenina (BA) y benzotimina (BT)

El conjunto de especies tautoméricas investigadas consta de cuatro formas amino y ocho imino (para BA), y de una forma canónica dioxo, cuatro formas dienol y cuatro formas enol-oxo (en el caso de BT). La variabilidad conformacional de los tautómeros imino y enol (formas *cis/trans*) ha sido considerada en todos los casos. La metodología empleada reproduce con buena precisión las preferencias tautoméricas de los análogos canónicos calculadas en estudios previos (Ha and Gunthard 1993; Hanus et al. 2004), lo que da confianza en los resultados obtenidos para los benzoderivados.

El estudio de las diferentes formas de la BA en fase gas muestra cómo la inserción de un benceno entre los anillos de la adenina (A) modifica notablemente las preferencias tautoméricas de la misma. Mientras en la A el tautómero A9 es mucho más estable que el A7 ($\sim 7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), esta diferencia queda muy disminuida ($\sim 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) en el caso de BA. Junto a este dato, puede observarse cómo la forma A3, que en A presenta una estabilidad casi idéntica a A7, queda profundamente desestabilizada ($\sim 17 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) en BA. Una explicación muy intuitiva a este comportamiento viene de considerar que la introducción de un benceno en la estructura de la nucleobase aumenta la distancia entre las posiciones 6 y 7, así como entre los átomos N3 y N9 de la A. En el caso de la forma A7, las interacciones entre los grupos de estas posiciones son desfavorables, por lo que su distanciamiento resulta en un efecto global estabilizador. El fenómeno contrario ocurre para el tautómero A3. Esta explicación resulta útil también en el caso de los tautómeros imino, ayudando a entender por qué la marcada preferencia que presenta la A por la forma I19_t desaparece en el benzoderivado.

Al introducir estos sistemas en disolución acuosa se observa que la forma A9 es, en ambos casos, la peor solvatada, pero este efecto de solvatación no es capaz de hacer que esta especie sea la dominante tanto para A como para BA (las $\Delta\Delta G$ de tautomería, obtenidas por combinación de los valores de solvatación y las estabilidades intrínsecas en fase gas, son de 3.3 kcal/mol y 1.5 kcal/mol, respectivamente).

Las preferencias tautoméricas de timina (T) y BT resultan, sin embargo, muy similares. En ambos casos el tautómero más estable en fase gas es la forma canónica dioxo (OO13), distanciada notablemente ($\sim 11 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) de una de las formas enol-oxo (E_cO3). Existe únicamente una pequeña diferencia entre ambos compuestos, pues la desestabilización de las formas dienol es algo superior ($\sim 6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) en el caso de BT.

La estabilización provocada por la hidratación de T y BT es más importante para casi cualquier tautómero que para la forma canónica OO13. No obstante, la magnitud de esta estabilización es pequeña ($\sim 6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en los casos más extremos), no llegando a alterar las preferencias tautoméricas intrínsecas. Por lo tanto, podemos concluir que la adición de un grupo benceno a la timina no modifica el escenario tautomérico de esta nucleobase ni en fase gas ni en disolución acuosa.

5.2.3.2. Tautomería de benzoguanina (BG) y benzocitosina (BC)

El conjunto de formas analizadas incluye, en el caso de guanina (G) y BG, cinco tautómeros amino-oxo (AO) y tres amino-enol (AE). De la citosina (C) y BC se han explorado la forma canónica amino-oxo (OA), dos formas amino-enol (AE) y dos formas oxo-imino (OI). En todos los casos en los que resulta posible se han considerado las variantes conformacionales *cis/trans*. De nuevo, se han obtenido resultados para los análogos canónicos que reproducen muy satisfactoriamente los datos provenientes de cálculos de alto nivel sobre tautomería de guanina (Hanus et al. 2003) y citosina (Trygubenko et al. 2002).

La principal modificación que introduce la formación del benzoderivado respecto a las preferencias tautoméricas de la G es la separación entre las estabildades de las formas AO y AE. Mientras que en el compuesto canónico las formas mayoritarias (AO19 y AO17) difieren únicamente en alrededor de 1 kcal·mol⁻¹ respecto a las formas AE, tras la introducción del anillo de benceno esta diferencia queda aumentada (~4 kcal·mol⁻¹). Al igual que en el caso de BA, el efecto de la modificación introducida es la separación de grupos químicos que antes estaban interaccionando. Esta acción hace variar la estabilidad de los diferentes tautómeros en función de la naturaleza (favorable/desfavorable) de las interacciones implicadas.

En solución acuosa se observan cambios importantes en las estabildades relativas de los tautómeros. Esta diferencia es más marcada para BG, mientras que las formas más estables para G en agua continúan siendo la AO19 y la AO17. El repertorio de formas accesibles se extiende a cuatro especies (AO19, AO17, AO37 y AO39) con estabildades similares (en un rango de ~1 kcal·mol⁻¹) en el caso de BG.

Nuestros cálculos, en consonancia con la evidencia experimental (Szczesniak et al. 1988; Nowak et al. 1989), indican que en fase gas C existe como un conjunto de tres tautómeros en equilibrio (OA1, EcA, EtA). A diferencia de lo que ocurría en el caso de BT, la adición de un grupo benceno a C sí que afecta muy marcadamente las preferencias intrínsecas de esta molécula. En el caso de BC, las formas OI son las preferidas en fase gas, con una diferencia cercana a 2 kcal·mol⁻¹ respecto a la forma

canónica OA1. Curiosamente, las formas AE, tan importantes en C, quedan desestabilizadas en este análogo por más de $3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Contrariamente a lo que ocurría en el caso de G y BG, el efecto de la hidratación es bastante similar para C y BC. La consecuencia principal es la desestabilización de las especies AE y OI respecto a la forma canónica AO1, que consigue que ésta sea la especie más estable en fase acuosa, con una diferencia de $\sim 4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (en BC) y $\sim 6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (en C) respecto al siguiente tautómero en orden de estabilidad.

5.2.3.3. Reactividad de los benzoderivados

Tras descubrir las preferencias tautoméricas intrínsecas de los benzoderivados, nos parece interesante definir hasta qué grado la capacidad de reconocimiento molecular de estos compuestos es diferente de la de sus análogos naturales.

En primer lugar, se ha explorado su habilidad para el reconocimiento por puente de hidrógeno. La evaluación de las energías de interacción de los pares BA·BT o BG·BC interaccionando según una geometría WC reporta valores muy similares a los encontrados para los pares canónicos A·T y G·C. De forma complementaria, el análisis de los mapas de interacción molecular (*MIP maps*) indica una elevada similaridad en los perfiles de reactividad, especialmente notoria en las caras WC, entre cada benzoderivado y su análogo natural. Tomados en conjunto, estos datos refuerzan la idea de que resulta muy probable la formación de apareamientos selectivos tipo WC BA·BT y BG·BC, coincidiendo con la evidencia experimental (Liu et al. 2003; Gao et al. 2004). Por el contrario, cabe esperar diferencias dramáticas en los reconocimientos tipo *Hoogsteen* o *reverse Hoogsteen* por la separación entre los grupos formadores de puente de hidrógeno que introduce la presencia del benceno.

Finalmente, para examinar cómo afecta esta modificación química a las interacciones de *stacking*, se ha monitorizado la dependencia de esta energía con el ángulo de torsión entre dos nucleobases paralelas separadas a una distancia de 3.4 \AA . No se observan diferencias entre los benzoderivados y sus análogos naturales en cuanto a la componente electrostática del *stacking*. Respecto a la componente de van der Waals, sin embargo, se observa una variación a favor de los benzoderivados, que puede llegar a ser de gran

magnitud ($\sim 9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) en los puntos de mayor solapamiento estructural, que no tienen porqué corresponder a una disposición permitida por el ADN. Esta diferencia energética, que se mantendrá en solución teniendo en cuenta la mayor hidrofobicidad de los benzoderivados, justifica la mayor estabilidad observada para estos análogos en estudios experimentales (aumento de $\sim 10^\circ\text{C}$ en las temperaturas de fusión de los dúplexes formados por pares BA·BT respecto a dúplexes constituidos por pares A·T) (Liu et al. 2003).

En resumen, la inserción de un anillo bencénico en las bases naturales, pese a modificar notablemente sus preferencias tautoméricas en fase gas, mantiene la tendencia a que los tautómeros canónicos sean los más estables en disolución acuosa, permitiendo la formación de interacciones WC análogas a las encontradas en el ADN. La estabilización observada experimentalmente en los dúplexes que contienen estos derivados puede ser atribuida a las interacciones de *stacking* y a un notable incremento en el carácter hidrofóbico de las bases. El conocimiento de la flexibilidad de moléculas de ADN que incluyan estos análogos, la frecuencia de aparición de fenómenos de *breathing* o una mejor comprensión de la reactividad de los surcos, son algunas de las muchas características que pueden ser aún profundizadas de cara a optimizar el uso biotecnológico de estas nuevas nucleobases.

5.3. Referencias bibliográficas

Andricioaei, I. and M. Karplus (2001). Journal of Chemical Physics **115**(14): 6289.

Anzenbacher, P., Jr., K. Jursikova, V. Lynch, P. A. Gale and J. L. Sessler (1999).

Journal of the American Chemical Society **121**(47): 11020.

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.

Camiolo, S. and P. A. Gale (2000). Chem Commun (Camb): 1129.

Gale, P. A., J. L. Sessler, W. E. Allen, N. A. Tvermoes and V. Lynch (1997). Chem. Commun.: 665.

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

Gale, P. A., J. L. Sessler, V. Král and V. Lynch (1996). Journal of the American Chemical Society **118**: 5140.

Gao, J., H. Liu and E. T. Kool (2004). Journal of the American Chemical Society **126**(38): 11826.

Ha, T. K. and H. H. Gunthard (1993). Journal of the American Chemical Society **115**(25): 11939.

Hanus, M., M. Kabelac, J. Rejnek, F. Ryjacek and P. Hobza (2004). Journal of Physical Chemistry B **108**(6): 2087.

Hanus, M., F. Ryjacek, M. Kabelac, T. Kubar, T. V. Bogdan, S. A. Trygubenko and P. Hobza (2003). J Am Chem Soc **125**(25): 7678.

Kamiya, H., H. Maki and H. Kasai (2000). Biochemistry **39**(31): 9508.

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.

Miyaji, H., P. Anzenbacher, Jr., J. L. Sessler, E. R. Bleasdale and P. A. Gale (1999). Chem. Commun.: 1723.

Nowak, M. J., L. Lapinski and J. Fulara (1989). Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **45A**(2): 229.

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.

Roberts, C., R. Bandaru and C. Switzer (1997). Journal of the American Chemical Society **119**(20): 4640.

-
- Robinson, H., Y.-G. Gao, C. Bauer, C. Roberts, C. Switzer and A. H. J. Wang (1998). Biochemistry **37**(31): 10897.
- Schlitter, J. (1993). Chemical Physics Letters **215**(6): 617.
- Schmidtchen, F. P. (2002). Org. Lett. **4**: 431.
- Seela, F., C. Wei and Z. Kazimierczuk (1995). Helv. Chim. Acta **78**(7): 1843.
- Sepiol, J., Z. Kazimierczuk and D. Shugar (1976). Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences **31C**(7-8): 361.
- Sessler, J. L., P. Anzenbacher, Jr., H. Miyaji, K. Jursikova, E. R. Bleasdale and P. A. Gale (2000a). Ind. Eng. Chem. Res. **39**: 3471.
- Sessler, J. L., P. Anzenbacher, Jr., J. A. Shriver, K. Jursikova, V. Lynch and M. Marquez (2000b). J Am Chem Soc **122**: 12061.
- Switzer, C., S. E. Moroney and S. A. Benner (1989). Journal of the American Chemical Society **111**(21): 8322.
- Switzer, C. Y., S. E. Moroney and S. A. Benner (1993). Biochemistry **32**(39): 10489.
- Szczesniak, M., K. Szczepaniak, J. S. Kwiatkowski, K. KuBulat and W. B. Person (1988). Journal of the American Chemical Society **110**(25): 8319.
- Trygubenko, S. A., T. V. Bogdan, M. Rueda, M. Orozco, F. J. Luque, J. Sponer, P. Slavicek and P. Hobza (2002). Physical Chemistry Chemical Physics **4**: 4192.
- Turner, B., A. Shterenberg, M. Kapon, K. Suwinska and Y. Eichen (2001). Chem Commun (Camb): 13.
- van Hoorn, W. P. and W. L. Jorgensen (1999). J Org Chem **64**: 7439.
- Washington, M. T., S. A. Helquist, E. T. Kool, L. Prakash and S. Prakash (2003). Mol. Cell. Biol. **23**(14): 5107.
-

6. Conclusiones

1. El *meso*-octametilcalix-[4]-pirrol (CP) es un receptor enormemente selectivo por el anión fluoruro (F^-) en fase gas y en solventes apróticos. Esta preferencia disminuye muy marcadamente y puede llegar a desaparecer en entornos de solvatación próticos o en presencia del cosoluto catiónico hidratado que suele emplearse en las medidas experimentales de afinidad de unión. El mismo comportamiento se observa en el receptor resultante de fluorar las 8 posiciones β -pirrónicas del CP (receptor 8F), considerando que la afinidad de este macrociclo por F^- es superior a la de CP. Los cálculos teóricos muestran cómo la medida experimental de la energía libre de unión receptor·ligando está en la práctica contaminada por especies que no se tienen en cuenta en la descripción del proceso, como el cosoluto, y que tienen un papel clave en el mismo.
2. La cuantificación de la frecuencia de transiciones conformacionales del receptor CP ha revelado i) que su flexibilidad es mayor de lo que podía pensarse en base a estudios QM previos, ii) que la población conformacional está fuertemente condicionada por las características del solvente y la naturaleza de los sustituyentes químicos en posición β , y iii) que la conformación *cone* (conformación de máxima afinidad por el anión), pese a no ser mayoritaria, es más frecuente de lo que podría derivarse a partir de su energía en fase gas. También hemos constatado cómo el receptor CP puede unir ligandos aniónicos mediante dos mecanismos: i) que el anión se una a un número limitado de receptores preorganizados en conformación *cone*, y ii) que el anión se una a una conformación más frecuente pero de menor afinidad, promoviendo una inmediata transición a la conformación *cone*.
3. La simulación del movimiento de un biopolímero (como el ADN) mediante MD puede aportar una gran cantidad de información, pero para obtenerla es necesario filtrar las señales del ruido de fondo. Los desarrollos que en este sentido se han realizado indican que el ADN es un sistema altamente flexible, pero paradójicamente con unas pautas de deformación que no son excesivamente complejas, pudiendo ser descritas mediante un reducido número de variables. Así, la longitud de la cadena, la secuencia y las alteraciones químicas de las nucleobases no afectan considerablemente a las pautas básicas de flexibilidad del ADN, que viene marcada por su estructura polimérica. También se ha

comprobado cómo los términos *flexibilidad* o *rigidez*, aplicados a la dinámica del ADN, pueden ser demasiado genéricos. Una determinada molécula de ADN puede presentar una constante de fuerza muy baja asociada al plegamiento (*bending*), y paralelamente resultar muy rígida en estiramiento (*stretching*) o enrollamiento (*twisting*). Por otro lado, una gran deformabilidad en el espacio de coordenadas helicoidales locales puede no manifestarse excesivamente en el espacio cartesiano. Una sobresimplificación de los conceptos flexibilidad/rigidez puede dar lugar a errores severos en la descripción de los procesos en estudio.

4. Los estudios en isoguanina muestran cómo la postulación de poblaciones tautoméricas WC para nucleobases no codificantes puede ser falaz. La isoguanina tiene un espacio tautomérico complejo y muy modulado por el entorno. Especies minoritarias en fase gas son mayoritarias en disolución. La molécula puede incorporarse en un dúplex de ADN frente a timina en dos formas tautoméricas, la forma oxo AO1 (con una geometría de apareamiento *wobble*) o enol AEc (con un apareamiento canónico WC). La diferencia de energía libre asociada a la transformación AO1 → AEc en este entorno químico es prácticamente nula, lo que revela un equilibrio entre ambas situaciones. Paralelamente, frente a citosina presenta una población rica en el tautómero enol AEc, aunque la incertidumbre intrínseca a la metodología empleada no nos permite descartar que pueda detectarse la forma AO1. El conjunto de resultados permite explicar datos aparentemente contradictorios existentes en la literatura acerca de la naturaleza tautomérica de la isoguanina en el ADN.
5. La intercalación de un anillo de benceno en las bases canónicas conduce a derivados químicos que, pese a conservar algunas de las propiedades de sus análogos naturales, presentan diferencias importantes en otros aspectos. El patrón de reactividad de la cara Watson-Crick, las energías de interacción por puente de hidrógeno y las preferencias tautoméricas en disolución acuosa son los principales rasgos que se mantienen invariables. Por el contrario, la reactividad de la cara Hoogsteen, las preferencias tautoméricas de algunos derivados (BA, BG y BC) en fase gas, la intensidad de las interacciones de *stacking* o la hidrofobicidad varían muy remarcablemente por efecto de esta modificación química. Asumir que el único efecto de la introducción de un anillo de benceno

en la nucleobase es extender la anchura de los dímeros y por lo tanto el diámetro del ADN puede conducir a errores en la interpretación del comportamiento de estos análogos en dúplexes de ADN modificados.

7. Otras publicaciones

Soliva, R.; Guimil-Garcia, R.; **Blas, J. R.**; Eritja, R.; Asensio, J. L.; González, C.; Luque, F. J. y Orozco, M. *DNA-triplex stabilizing properties of 8-aminoguanine*. Nucleic Acid Res. (2000), 28, 22, 4531-4539.

Orozco, M; Rueda, M.; **Blas, J. R.**; Cubero, E.; Luque, F. J. y Laughton, C. A. (2004). *Molecular dynamics simulations of nucleic acids*. Encyclopedia of Computational Chemistry. (2004).

Agradecimientos

Realmente difícil... el agradecimiento es algo que se expresa continuamente, que va más allá del tiempo, que sobresale del estrecho vaso del lenguaje y se vierte en gestos, favores, caras, ratos de escucha, tiempo dedicado ... sí, es este un momento extraño, en el que quiero haceros llegar a todos lo que ya sabéis que va por dentro de esta persona... muchas gracias, a los que cite y a los que, por las prisas y los nervios, quedéis momentáneamente ausentes. Una tesis son muchas manos... gracias a todos.

En primer lugar a Modesto y Javi, por la acogida que me disteis hace unos años, por la amistad, por lo mucho que he aprendido de vosotros, por vuestra paciencia, especialmente cuando se han atascado los *papers*, por vuestras correcciones, por vuestra ilusión en mí... por ser, antes que unos directores excelentes, unos amigos. Estoy muy contento de haber trabajado con vosotros.

Saber que siempre puedo recurrir a preguntarte lo que sea, cuando sea, las veces que sea... porque sabes todo de todo. Muchas gracias, Josep Lluís... por tantas cesiones de paciencia y neuronas.

A los compañeros de cada día... Manu, mi colega biólogo, cuánto me has enseñado a trabajar bien... gracias por tantos ratos de conversación *en tu despacho*. Carles, *tant simpàtic i tant eficient, moltes gràcies... hi ha amistats que valen la pena, que duri molt*. Alberto, muchas gracias por tus explicaciones y tu paciencia. A los tres, espero haberos robado algo de esa ilusión por aprenderlo todo que llevaré siempre conmigo.

Cuando, al día siguiente justo de ser biólogo, empecé a andar con ordenadores, UNIX, formatos, moléculas en 3D, programas... fue un paso interesante, pero muy raro. Quiero agradecer a Elena, Robert, Bego y Xavi el haberme guiado pacientemente en aquellos principios.

A todos los demás compañeros del Parc y de Farmacia, muchas gracias por los buenos ratos de trabajo. También quiero agradecer a Marga sus muchos detalles de atención y sus ánimos.

Quisiera dar las gracias a muchos científicos que han prestado de alguna forma su tiempo a esta tesis. Al Dr. Charlie Laughton por su acogida en la Universidad de Nottingham, al Dr. Federico Gago por su simpatía y confianza en los trabajos que hemos intentado juntos, al Dr. Baldomero Oliva, por saber tanto y estar siempre dispuesto a intentármelo explicar, y al Dr. Xavier de la Cruz, por sus agradables conversaciones de todo tipo y sus ánimos continuos.

Estos años de tesis han estado muy arropados por mis amigos del piso de San Juan. Realmente habéis hecho posibles muchas más cosas que esta tesis... pero sin vosotros hubiera sido imposible. Gracias y ánimo con todo lo que lleváis entre manos.

En muchas ocasiones mis hermanos, Joaquín, Mariángeles, David y Sofía, habéis sido un acicate para volver a la carga, contento, muchas gracias.

Finalmente, quiero agradecer la labor de mis padres. Desde vuestro trabajo diario, en una tienda sencilla, en Calpe, me habéis enseñado, con vuestro ejemplo, a poner el máximo entusiasmo en las tareas más pequeñas. Tareas sencillas, personas grandes... cuánto valéis.

Inma... gracias por ser ese estímulo constante y silencioso que hace tan fácil todo. Ya sé que no necesitas más letras.

Para acabar, doy gracias a Dios, tan bueno conmigo, que me ha regalado esta tesis.