

Tesi Doctoral

**Formació del motiu quàdruplex *bi-loop* amb oligonucleòtids lineals
i aplicació a la ciclació assistida per motlle**

Júlia Viladoms Claverol



Dept. de Química Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona

4 BI-LOOP ESTABILITZAT PER PARELLS NO CANÒNICS

En el curs de l'estudi del *bi-loop* heterolíneal es va observar que el cicle d<pCCTTCGGT> es podia autoestructurar formant parells G·T. Aquest octàmer cíclic podria formar un *bi-loop* homodimèric estabilitzat per una tètrada GTGT (Figura 4.1.A). Aquest fet ens va cridar l'atenció i vam decidir estudiar-ne l'estructura en solució mitjançant dicromisme circular i ressonància magnètica nuclear.

També vam estudiar l'estructura del cicle d<pTCGTATGT>, dissenyat sense èxit per a la formació del *bi-loop* heterodimèric amb el cicle d<pCACATACT>, complex del qual mai se'n va poder resoldre l'estructura a causa de la presència de 3 o més espècies en equilibri lent en solució. Si es considera la possibilitat de formació de parells G·T, aquesta seqüència podria adoptar dos possibles dímers antiparal·lels, que diferirien en l'orientació relativa d'un cicle respecte l'altre (Figura 4.1.B).

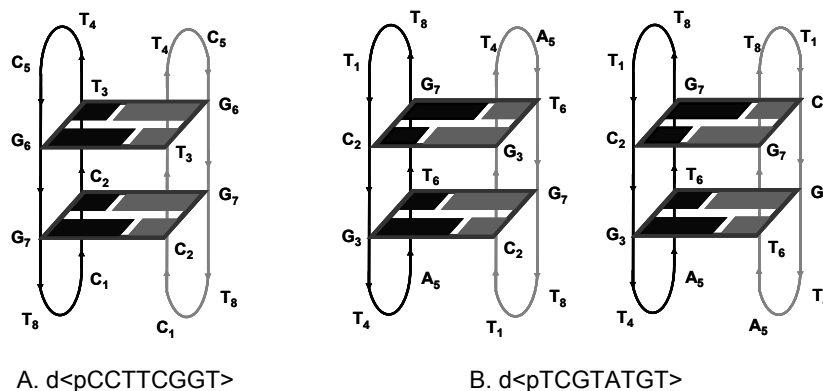


Figura 4.1. Esquemes dels possibles *bi-loops* estabilitzats per parells G·T

4.1 EL PARELL GT

Els aparellaments erronis o *mismatches* G·T poden ocórrer durant la replicació, la recombinació genètica o a conseqüència de processos metabòlics com la metilació i posterior desaminació de la citosina. El parell G·T és un dels aparellaments erronis més estables i més comuns en el DNA genòmic. Alhora, és un dels aparellaments erronis més eficientment reparats per la maquinària cel·lular de reparació postreplicativa.

Francis Crick ja va proposar l'existència d'aquests aparellaments erronis (GU i GA) per explicar la degeneració del codi genètic¹³⁶. En la seva proposta, les bases estan desplaçades de la seva posició normal, d'aquí el nom *wobble* o “trontollant”, per poder aparellar-se a través de la seva forma tautòmera majoritària.

Els parells G·T han estat observats en cristalls de DNA tant en les conformacions dextrogires A-¹³⁷ i B-DNA¹³⁸ com en el dúplex levogir Z-DNA¹³⁹. En tots els casos es tracta de parells “trontollants” o *wobble*, amb la purina desplaçada cap al solc menor i la pirimidina cap al solc major per poder formar els ponts d'hidrogen HN3T-O6G i HN1G-O2T. Els enllaços glicosídics d'ambdós nucleòtids estan en *anti*. L'anàlisi d'aquestes estructures de RX mostra que el parell *wobble* G·T pot ser acomodat en dobles hèlixs tipus A, B o Z amb una distorsió mínima de la conformació global¹⁴⁰. Els petits canvis que existeixen es concentren en els parells de bases adjacents al *mismatch*. La geometria del parell G·T és la mateixa en tots els casos estudiats. En tots els casos s'ha observat una reorganització de les molècules d'aigua per formar ponts d'hidrogen addicionals entre les bases G i T, compensant la pèrdua d'un enllaç d'hidrogen respecte al parell G·C (Figura 4.2).

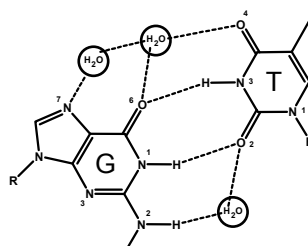


Figura 4.2. Parell GT wobble observat en les estructures de Raigs X

Els parells G·T *wobble* també han estat observats en solució. La primera vegada que es van caracteritzar va ser en la doble hèlix de poli(dG)-poli(dT)¹⁴¹, mitjançant RMN i estudis d'intercalació de bromur d'etidi. Posteriorment, es van obtenir estructures mitjançant RMN i mètodes de càlcul de parells G·T en dúplexs de DNA¹⁴², però no ha estat fins més recentment que s'han obtingut estructures d'alta resolució¹⁴³. Tots aquests estudis en solució mostren, al igual que els estudis mitjançant RX, que la incorporació d'un aparellament erroni G·T tan sols provoca petites distorsions de l'estructura, que es localitzen al costat del *mismatch*. En l'estructura més recent^{143c}, en què s'han emprat restriccions derivades d'acoblements dipolars residuals (RDCs) per al refinament, s'ha observat un nou tipus de parell G·T, anomenat bifurcat, en què l'O2 de la T, a part de formar un enllaç d'hidrogen amb l'H1 de la G, en forma també un altre amb l'H22 d'aquesta mateixa G.

Estudis termodinàmics d'oligonucleòtids amb parells G·T interns¹⁴⁴ demostren que es pot aplicar la teoria del veí més proper (*nearest-neighbour theory*) en aquests dúplexs, ja que el *mismatch* només afecta als parells adjacents, i que el parell G·T pot estabilitzar o desestabilitzar en funció de la seqüència (± 4.4 kJ/mol).

4.2 Síntesi dels oligonucleòtids

Els oligonucleòtids cíclics d<pCCTTCGGT> i d<pTCGTATGT> han estat sintetitzats en fase sòlida emprant la metodologia desenvolupada al nostre grup, que s'ha explicat en els fonaments i s'ha detallat en el capítol anterior. Els precursors lineals escollits han estat: d(pTCGGTCCT) i d(pTCGTATCT). Les síntesis s'han dut a terme en el sintetitzador Expedite i s'han hagut de modificar els cicles de síntesi estàndard ja que per a la síntesi d'oligonucleòtids cíclics fem un suport diferent (TentaGel en lloc de CPG), els amidits estan dissolts en una mescla ACN/CH₂Cl₂, fem

^tBuOOH com a oxidant i els volums dels reactors que nosaltres preparam també són diferents dels estàndards per a aquest sintetitzador. Un dels cicles modificats es troba a l'annex. Per a la ciclació també s'ha hagut de dissenyar un cicle de síntesi especial. Com que aquest sintetitzador funciona enviant polsos de solució en comptes d'enviar un flux continu, s'ha aprofitat aquest fet de manera que en cada tractament amb MSNT, s'omple el reactor amb la solució d'agent acoblant i després es va renovant durant les 3 h que dura cada tractament. Aleshores es canvia la solució de MSNT en piridina anhidra per una solució acabada de preparar per al següent tractament. A l'annex es poden trobar els cicles per treballar amb una única columna o amb dues columnes en paral·lel. Després de la ciclació es realitza la desprotecció dels fosfats, el desancoratge, la desprotecció de les bases i el dessalatge tal i com s'ha explicat en el capítol anterior.

4.2.1 Síntesi de d<pCCTTCGGT>

Inicialment es van realitzar dues síntesis a escala 2 μ mol de d<pCCTTCGGT> i vam observar que les síntesis donaven resultats molt pitjors en quant a rendiment i puresa dels crus que les síntesis anteriors, realitzades en el sintetitzador antic ABI380B. Els rendiments dels crus oscil·laven entre un 20 i un 30%, però amb pureses molt dolentes, al voltant del 50% (veure Taula 4.2). El fet que la puresa del cru sigui dolenta (veure Figura 4.4.A) en dificulta enormement la purificació de manera que els rendiments finals són francament dolents. En les següents síntesis a escala 5 μ mol, es va intentar millorar la puresa realitzant un tractament inicial de la resina abans de la síntesi de l'oligonucleòtid amb oximat de tetrametilguanidini per desancorar totes les possibles impureses que pogués contenir i que ens poguessin embrutar posteriorment el cru, però aquest tractament no va millorar substancialment els resultats (Taula 4.2, 3^a síntesi amb el pretractament, 4^a síntesi sense). En aquest cas es va intentar la purificació emprant TEAOAc en lloc de NH₄OAc i els rendiments de purificació van augmentar lleugerament, però es va detectar un producte secundari de massa +16 respecte al producte desitjat. Els oligonucleòtids es van analitzar mitjançant HPLC-ESI i es va observar que les dues masses coel·luïen en el mateix pic. Aquell lot de síntesi es va descartar donada la impossibilitat de separar-ne la impuresa i després de comprovar per RMN la presència de senyals extrems corresponents a la segona espècie.

Tot i haver descartat aquest producte per als estudis per RMN, vam decidir dedicar-hi més esforços per intentar deduir quin era el producte de massa+16. Aquesta massa es podria deure a una oxidació o a la incorporació d'un S en lloc d'un O, ja que en el sintetitzador es poden emprar agents sulfuritzants per a l'oxidació i es podria haver produït una contaminació. Es van assajar diverses condicions mitjançant HPLC de bescanvi aniònic i finalment es van poder separar les impureses (veure Figura 4.3). Els 4 pics es van col·lectar i se'n va analitzar la massa per MS-MALDI-TOF: el primer pic corresponia al producte desitjat, mentre que el 2on i el 3er corresponien a productes de massa +16. Del quart pic no se'n va poder determinar la massa atesa la poca quantitat de producte de

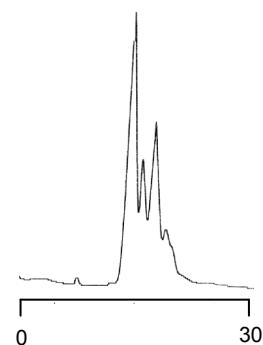


Figura 4.3. Cromatograma de bescanvi aniònic (25 mM NH₄OAc, 10% ACN, 175 a 250 mM NaCl en 30')

què disposàvem. Vam realitzar digestions enzimàtiques amb fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD) i fosfatasa alcalina (PA) per determinar la proporció de nucleòsids de cada pic col·lectat i observarem la presència dels 3 pics corresponents als nucleòsids dC, dG i dT, però també l'existència d'altres pics, amb diferents proporcions. L'anàlisi d'aquests digerits mitjançant HPLC-MS ens va permetre associar cada pic extra del cromatograma als 3 nucleòsids oxidats, en funció de la massa observada (massa del nucleòsid +16). Les proporcions de nucleòsids obtingudes, així com la resta de la caracterització es mostren en la Taula 4.1.

HPLC bescanvi	t _R (min)	Proporció	MALDI m/z (uma)	Anàlisi nucleòsids dC:dC ^{ox} :dG:dG ^{ox} :dT:dT ^{ox}	Producte
Pic 1	20.1	50 %	2434.6	3 : 0 : 2 : 0 : 3 : 0	desitjat
Pic 2	21.3	14 %	2450.7	2 : 1 : 2 : 0 : 3 : 0	m+16
Pic 3	23.0	28 %	2451.0 i 2468.0	2 : 1 : 1 : 1 : 3 : 0	m+16 i m+32
Pic 4	24.1	8 %	--	2 : 1 : 1 : 1 : 2 : 1	m+48

Taula 4.1. Taula resum de la caracterització dels pics separats mitjançant bescanvi aniònic

Podem concloure doncs que la meitat del producte no era el desitjat i que hagués estat complicat de purificar mitjançant bescanvi aniònic, única tècnica que ens ha permès separar la impuresa, ja que la resolució disminueix molt en augmentar la quantitat de producte injectat, de manera que hauríem hagut de realitzar moltes injeccions i hauríem recuperat molt poc producte pur. Respecte a la natura de la impuresa, sabem que es deu a l'oxidació de les bases, preferentment citosina, probablement en l'etapa de desancoratge en què s'empra dioxà, que pot contenir peròxids i aquests poden oxidar les bases¹⁴⁵.

Finalment es van realitzar unes últimes síntesis, forçant al màxim les condicions de ciclació, que van donar millors resultats tant de rendiment com de puresa del cru, de manera que es va obtenir prou quantitat d'oligonucleòtid com per procedir a realitzar els estudis mitjançant RMN. A la Figura 4.4 es mostren els cromatogrames dels crús de les diverses síntesis i a la Taula 4.2 es resumeixen els rendiments de totes les síntesis, així com la caracterització dels productes i el seu posterior ús.

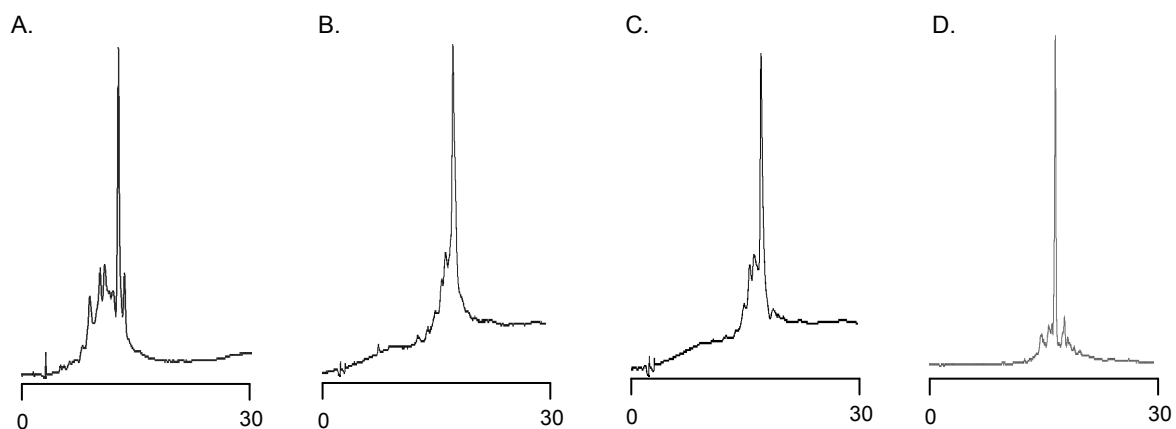


Figura 4.4. Cromatogrames dels crús de síntesi de d<pCCTTCGGT>. A. Síntesi escala 2 μmol (5 a 35 % B en 30'; A: NH₄OAc 10 mM, B: H₂O/ACN 1:1). B i C. Síntesis a escala 5 μmol i D. Síntesi a escala 15 μmol (5 a 35 % B en 30'; A: TEAOAc 50 mM, B: H₂O/ACN 1:1).

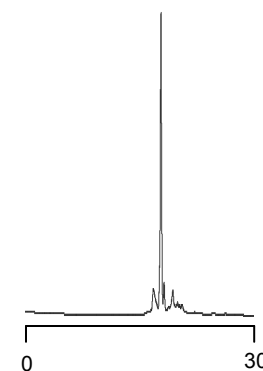
Síntesi	1 ^a (1.8 μmol)	2 ^a (2.0 μmol)	3 ^a (5.1 μmol)	4 ^a (5.1 μmol)	5 ^a (3x5 μmol)
Rend. cru	20 % (23.9 OD)	29 % (40.3 OD)	12 % (41.0 OD)	10 % (35.2 OD)	9% (108 OD)
Puresa cru (HPLC)	51 %	52 %	67 %	55 %	70 %
Rend. purificació	8 %		12 %	25 %	38 %
Rend. producte pur	2 % (5.1 OD)		1.5 % (5.1 OD)	2.5 % (9.0 OD)	3.5 % (40.9 OD)
MS-MALDI-TOF (uma)	m/z = 2437.37 M _{teòrica} = 2438.38		m/z = 2435.6 / 2451.5		m/z = 2435.5
ESI (-) [M-3H ⁺] ³⁻	--		811.7/816.7	811.6/817.0	--
Ús posterior	estudis per DC		descartades		estudis RMN

Taula 4.2. Resum de les síntesis realitzades de *d*<pCCTTCGGT>

4.2.2 Síntesi de *d*<pTCGTATGT>

Les síntesis de *d*<pTCGTATGT> es van dur a terme en el sintetitzador Expedite quan ja havíem optimitzat les condicions amb les síntesis de l'oligonucleòtid anterior i van donar força bons resultats, sobretot de puresa del cru (Figura 4.5). La purificació es va dur a terme amb la columna PRP-I, que sabíem que donava bones recuperacions, i emprant acetat de trietilamoni com a tampó, que havíem comprovat que resolía millor. Els resultats i la caracterització es resumeixen en la Taula 4.3.

Síntesi	15 μmol (3x5)
Rend. cru	11 % (139 OD)
Puresa cru (HPLC)	63 %
Rend. purificació	45 %
Rend. producte pur	5.8 % (62.2 OD)
MS-MALDI-TOF (uma)	m/z = 2473.3 M _{teòrica} = 2476.4

Taula 4.3. Resum de la síntesi a gran escala de *d*<pTCGTATGT>Figura 4.5. Cromatograma del cru (5 a 35 % B en 30'; A:TEAOAc 50 mM. B: H₂O/ACN 1:1)

4.3 Estudi del cicle *d*<pCCTTCGGT> mitjançant DC i RMN

En enregistrar l'espectre d'RMN monodimensional de protó (1 mM oligonucleòtid, fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, H₂O/D₂O 9:1), vam observar que teníem dos jocs de senyals, corresponents a dues espècies en solució. Una de les espècies podria correspondre al *bi-loop* de la Figura 4.1.A, i l'altra potser a la formació d'un *dumbbell* amb parells no canònics. En afegir magnesi a la mostra (50 mM MgCl₂), un dels jocs de senyals pràcticament desapareixia mentre que l'espècie que donava lloc a l'altre joc de senyals s'estabilitzava (veure Figura 4.8). Abans de procedir a un estudi complet per ressonància magnètica nuclear, vam decidir estudiar l'estructuració d'aquest octàmer per dicromisme circular.

4.3.1 Dicroisme circular

Com es mostra a la Figura 4.6, els espectres i les fusions per dicroisme circular de l'oligonucleòtid en absència i en presència de magnesi varien enormement. L'espectre presenta una major el·liplicitat en la mostra amb Mg^{2+} , indicant una major estructuració, i també un lleuger desplaçament del màxim de 271 nm a 268 nm. La fusió mostra que l'espècie afavorida en medi amb magnesi és molt més estable que la que es forma en medi sense magnesi, com ho demostra una diferència de 12 °C en la temperatura de fusió, tot i que aquesta diferència no reflecteix directament la diferent estabilitat, ja que probablement en els dos medis tinguem mescla d'espècies. Si ens fixem en els espectres enregistrats a diferent temperatura, els perfils estranys semblen indicar la presència de dues espècies en aquesta concentració, tant en el medi amb magnesi com en el que no en té. Una de les espècies seria més estable en Mg^{2+} i presentaria un màxim d'absorció al voltant de 265 nm, mentre que l'altra seria menys estable i presentaria un màxim al voltant de 280 nm.

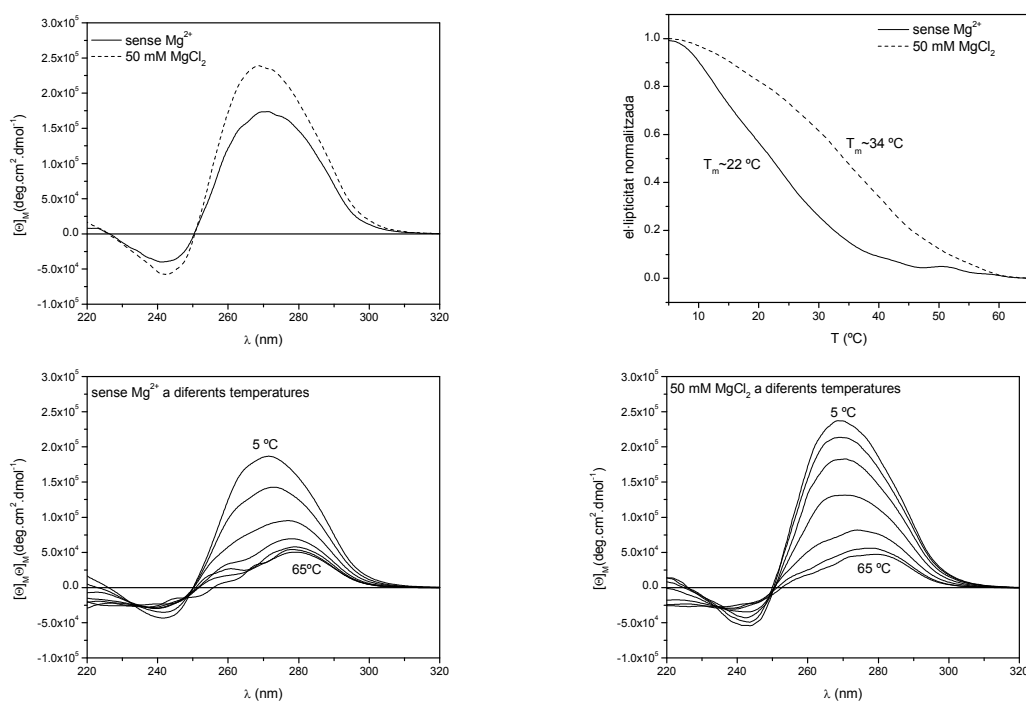


Figura 4.6. Espectres i fusions de $d\langle pCCTTCGGT \rangle$ en absència i presència de Mg^{2+} ($500\mu M$ oligonucleòtid, 25 mM fosfat sòdic $pH\ 7$, 100 mM $NaCl$, $l=1\text{ mm}$, $5\text{ }^\circ C$)

Vam realitzar fusions a diferents concentracions d'oligonucleòtid en presència de Mg^{2+} i es va comprovar que tenim una espècie multimèrica la temperatura de fusió de la qual varia amb la concentració (Figura 4.7). A partir d'aquesta variació podem estimar l'estabilitat de l'estructura formada (apartat 1.3.4 de fonaments). Les T_m estan calculades amb el mètode de la mediana.

Tot i que només disposem de tres valors de concentració i temperatura de fusió (Taula 4.4), podem representar la recta $1/T_m$ enfront de $\ln c$ i obtenir uns valors que considerem força fiables perquè l'ajust és molt bo ($R^2 = 0.9985$, no es mostra) i coincideixen amb els paràmetres calculats a partir de només una corba de fusió, la de major concentració. Els valors que s'obtenen d'aquests ajustos es mostren a la Taula 4.5.

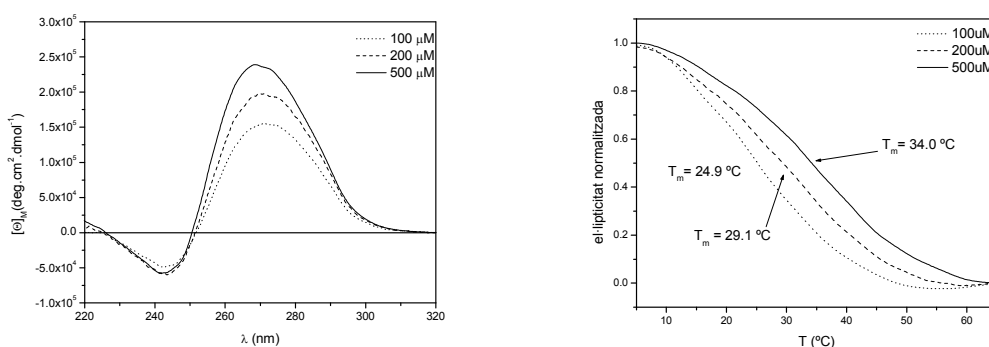


Figura 4.7. Espectres i fusions a diferents concentracions (tampó fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, l=1 mm).

conc (μM)	T _m (°C)
479	34.0
192	29.1
95	24.9

Taula 4.4. Valors de concentració i T_m

Paràmetres	Variació T _m amb conc	Anàlisi corba 500 μM
ΔH ⁰ (kJ/mol)	-139 ± 3	-146.2 ± 0.2
ΔS ⁰ (J/mol·K)	-387 ± 8	-411.6 ± 0.5
ΔG ⁰ ₂₉₈ (kJ/mol)	-24 ± 1	-23.5 ± 0.3

Taula 4.5. Paràmetres termodinàmics per d<pCCTTCGGT>

Aquests valors es comentaran amb detall i es compararan amb els altres paràmetres de què es disposa en l'apartat de generalitat del motiu *bi-loop* (capítol 6). De moment només dir que l'acord entre els paràmetres calculats amb les dues metodologies és prou bo i que, per tant, aquests paràmetres es consideren vàlids.

4.3.2 Ressonància Magnètica Nuclear

Com ja s'ha comentat, l'espectre monodimensional de d<pCCTTCGGT> canvia considerablement amb la presència de magnesi (Figura 4.8). Per facilitar l'estudi es va decidir treballar en medi tampó fosfat 25 mM pH 7, 100 mM NaCl i 50 mM MgCl₂ i així poder caracteritzar l'espècie estabilitzada en magnesi, que semblava que podia ser un *bi-loop* amb parells G·T. La concentració d'oligonucleòtid va ser d' 1 mM.

També es van enregistrar espectres a diferents concentracions d'oligonucleòtid i a diferents temperatures, confirmant-se que es tracta d'una espècie autoassociativa que fon amb la temperatura.

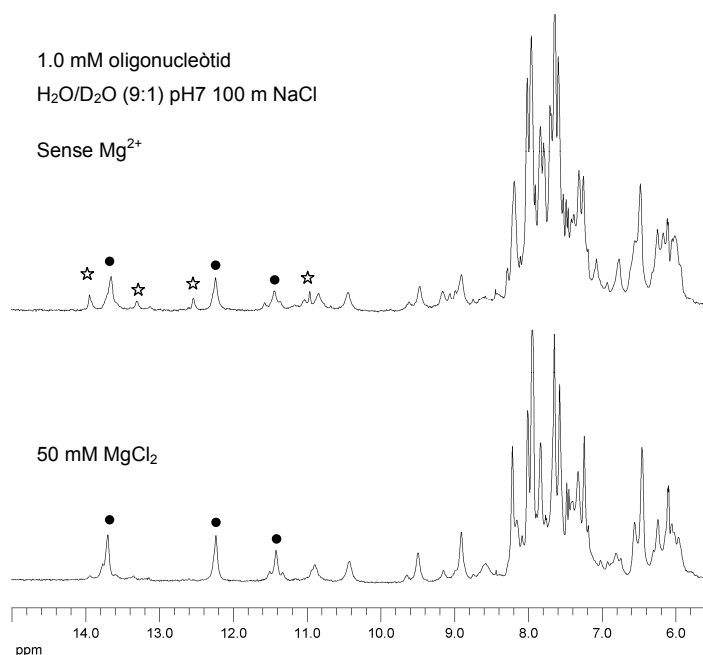


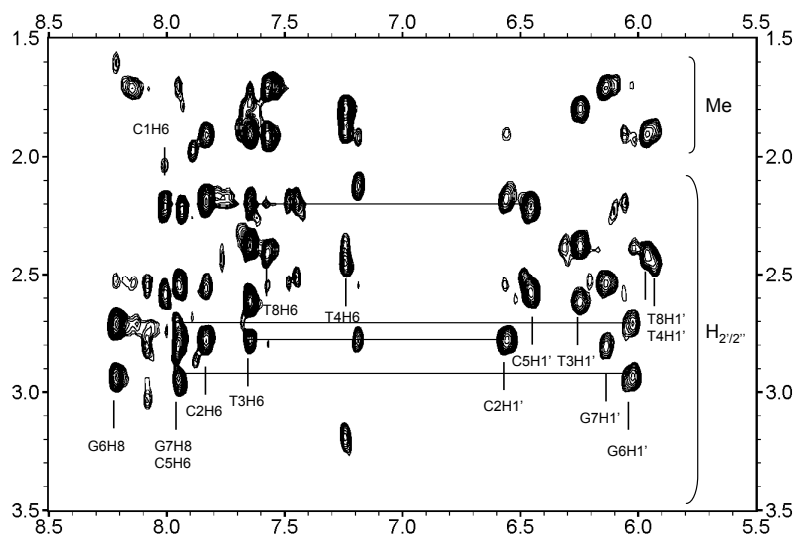
Figura 4.8. Espectres de protó de d<pCCTTCGGT> en medi sense i amb magnesi

Es van enregistrar espectres bidimensionals per poder assignar tots els senyals: NOESYs en H₂O a 150 i 300 ms de temps de mescla, i NOESYs en D₂O (100 i 300 ms), TOCSY, COSY i ROESY. En aquests espectres s'aprecia una bona dispersió dels senyals, l'existència de 8 sistemes de spin (més algun senyal extra) i la presència d'alguns pics d'intercanvi a prop de la diagonal. Probablement l'espècie estructurada es troba en equilibri lent en l'escala de temps d'RMN amb la forma desestructurada, molt minoritària a aquesta concentració d'oligonucleòtid.

Com en els casos dels altres *bi-loops* estudiats observem:

- El camí d'assignació B_nH₂'/H₂"-B_{n+1}H_Ar es pot seguir pels passos dels residus aparellats C2-T3 i G6-G7 (Figura 4.9), i en H1' es pot seguir també pels passos T3-T4 i G7-T8.

Figura 4.9. Camí d'assignació en H₂'/H₂" on es veuen els passos C2-T3 i G6-G7 (espectre NOESY 150 ms, 1 mM oligonucleòtid, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 7, 5 °C)



- Desplaçaments anòmals per les T del *loop* apilades, especialment per T4: H4' 4.19 ppm, H5'/H5" 3.19 i 3.70 ppm.

- També s'observen contactes dels Me d'aquestes T que fan de tapa amb H_Ar del residu anterior i amb els protons imino i amino dels parells de bases sobre els quals s'apilen.

- La intensitat del NOEs H1'-H_Ar intraresidu indica que els enllaços glicosídics es troben en *anti*.

- Els patrons de NOEs pels protons aparellats indiquen que tenim un parell G·C (H5C → NH₂C → H1G → NH₂G) i un parell G·T (imino G- imino T) (Figura 4.10).

Tots aquests fets permeten assegurar que ens trobem davant d'un oligonucleòtid que s'estructura en forma de *bi-loop*.

L'assignació completa (excepte H5' i H5") es va realitzar seguint la metodologia explicada en els fonaments, seguint les correlacions seqüencials en H1' i H₂'/H₂" per C2-T3-T4 i G6-G7-T8 (veure Taula 4.6). Les citosines de les segones posicions del *loop* es van assignar en base a algun contacte del sucre amb el protó aromàtic de la base següent.

	NH	NH ₂ (2)	NH ₂ (1)	H6/H8	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'
C1	--	n.o.	n.o.	8.01	6.10	6.46	2.22	2.59	4.82	n.a.
C2	--	8.91	7.39	7.84	6.06	6.57	2.20	2.79	4.93	4.19
T3	12.23	--	--	7.65	1.91	6.25	2.62	2.38	5.10	4.20
T4	**	--	--	7.25	1.80	5.94	1.89	2.45	4.65	4.19
C5	--	n.o.	n.o.	7.94	6.10	6.47	2.53	2.22	4.60	4.16
G6	11.42	5.78		8.22	--	6.03	2.72	2.93	5.03	4.18
G7	13.70	9.49	8.16	7.95	--	6.14	2.55	2.81	5.18	n.a.
T8	**	--	--	7.58	1.71	5.96	1.91	2.41	4.66	3.81

** Els protons imino de T4 i T8 ressonen a 10.42 i 10.90, però no s'ha pogut assignar quin és quin. n.o. - no observat. n.a. - no assignat

Taula 4.6. Taula d'assignació de *d*<pCCTTCGGT> a 5 °C (fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)

Les tètredes que estableixen aquest *bi-loop*, en base als contactes NOE que es veuen (Figura 4.10), són una tètreda GCGC desplaçada i una GTGT directa. Aquestes tètredes es mostren a la Figura 4.11. Per a la tètreda desplaçada, el contacte clau, a part dels propis dels parells G-C, és el pic de correlació entre H1' d'una G i els seus aminis, que no són els propis sinó els de la guanina d'enfront amb qui forma la tètreda i es relaciona per simetria. Aquest contacte no pot ser intraresidu i per tant ha de ser intermolecular. En el cas de la tètreda GTGT, no s'observa cap contacte entre els dos parells de bases i els protons amino de la guanina estan degenerats i ressonen a 5.78 ppm, indicant que cap d'ells forma ponts d'hidrogen. Podria ser que aquesta tètreda estigués estabilitzada per coordinació d'un catió, com en el cas de la tètreda ATAT directa.

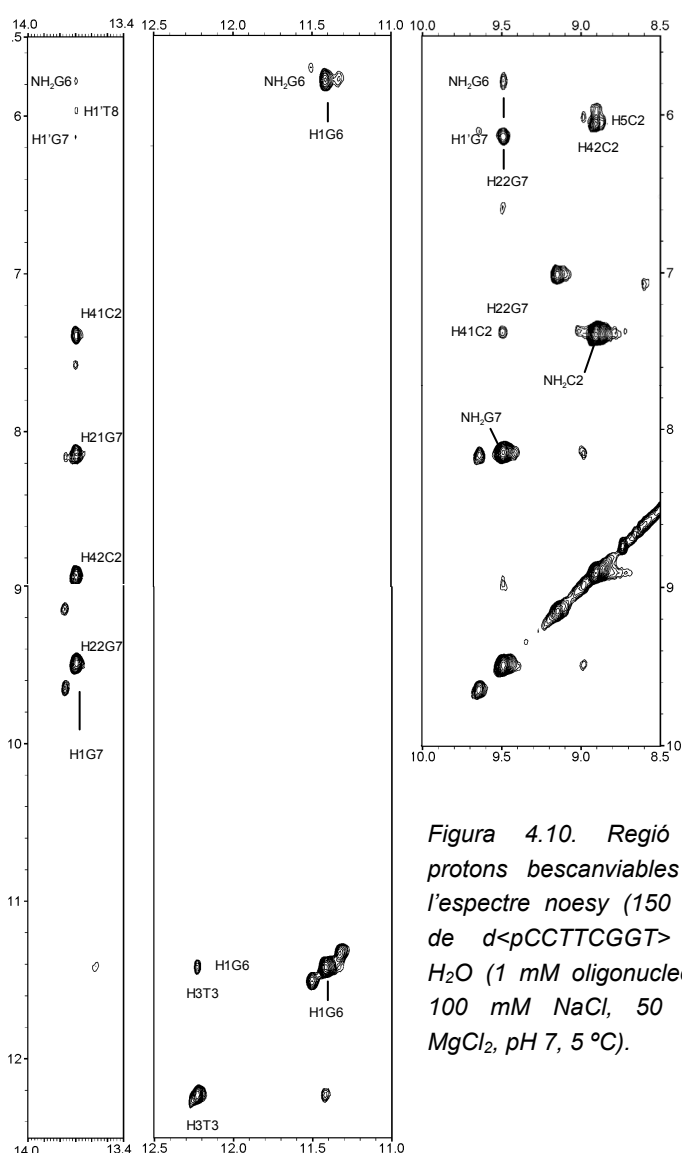


Figura 4.10. Regió de protons bescanviables de l'espectre noesy (150 ms) de *d*<pCCTTCGGT> en H₂O (1 mM oligonucleòtid, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 7, 5 °C).

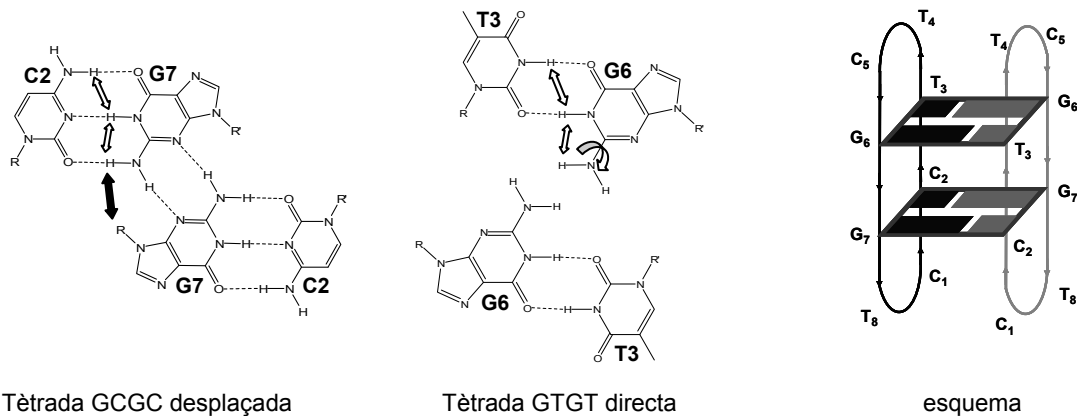


Figura 4.11. Representació de les tètredes que es formen amb indicació dels contactes claus que permeten caracteritzar-les i esquema del bi-loop format

La formació d'aquests dos tipus de tètredes (GCGC desplaçada i GTGT directa) per a la seqüència oligonucleotídica d<pCCTTCGGT> quadra amb el que s'havia observat anteriorment i que s'ha explicat en la introducció: purines en 5' i pirimidines en 3' donen lloc a tètredes directes, mentre que pur en 3' i pyr en 5' donen lloc a tètredes desplaçades. La tètreda GCGC conté C en l'extrem 5' i G en l'extrem 3', i es forma la que és desplaçada. En canvi, per la formació de la tètreda GTGT tenim la G en l'extrem 5' i la T en el 3', i es forma, per tant, la tètreda directa.

4.4 Estudi del cicle d<pTCGTATGT> mitjançant DC i RMN

Aquest oligonucleòtid havia estat sintetitzat per estudiar la formació del *bi-loop* heterodimèric amb el cicle d<pCACATACT>. La mescla d'aquests dos oligonucleòtids havia donat lloc a una barreja d'espècies que no s'havia pogut resoldre. El fet de descobrir que el cicle anteriorment estudiat es podia estructurar en forma de *bi-loop* amb parells G·T, ens va fer pensar que aquest cicle també podria fer-ho i deuria haver estat el responsable de la presència de múltiples espècies en la mescla heterodimèrica.

Tal i com es mostra a la Figura 4.1, sobre el paper aquest oligonucleòtid es podria estructurar segons dos arranjaments diferents dels cicles, formant dues tètredes GCGT o una tètreda GCGC i una altra GTGT. Amb el que sabem del *bi-loop* podem dir que aquestes tètredes seran del tipus desplaçada ja que l'ordre d'apilament és 5'-pyr-pur-3' (5'-CG/TG-3'). Si això fos així, l'espectre de dicroisme circular hauria de presentar un màxim al voltant de 265 nm.

4.4.1 Dicroisme circular

Primer de tot vam enregistrar un espectre de dicroisme circular (330 μM d'oligonucleòtid, fosfat sòdic 25 mM, pH 7, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 5 °C) per observar-ne el perfil i veure si es complien les nostres expectatives, i així va ser. Com s'observa a la Figura 4.12.B, la mostra presenta un perfil molt característic, amb el màxim d'absorció a 262 nm, típic de tètredes desplaçades que es donen quan, com en aquest cas, tenim un apilament 5'-pyr-pur-3'. En les mateixes condicions, es va realitzar una fusió per estudiar-ne l'estabilitat, controlant la variació de l'el·lipticitat a 262 nm, de 5 a 90 °C, i

realitzant alguns espectres a diferents temperatures. Si calculem la temperatura de fusió a través de la mediana, el valor és de 55.2 °C, un valor extraordinàriament elevat.

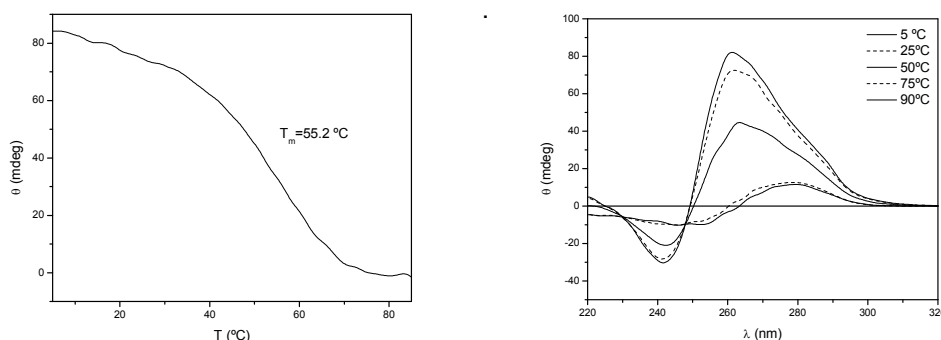


Figura 4.12. Fusió per dicromisme circular ($\lambda=262\text{nm}$) i espectres a diferents temperatures de $d\langle pTCGTATGT \rangle$ ($330 \mu\text{M}$ d'oligonucleòtid, fosfat sòdic 25 mM, pH 7, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 , $l=1$ mm)

En aquest cas no disposem de més corbes de fusió, però podem extreure paràmetres termodinàmics aproximats a partir de només una corba (apartat 1.3.4.1 de Fonaments). Els valors obtinguts són: $\Delta H^0 = -214.0 \pm 0.5$ kJ/mol, $\Delta S^0 = -584.8 \pm 1.6$ J/mol·K i $\Delta G^0_{298} = -39.7 \pm 1.0$ kJ/mol. Aquests paràmetres corroboren que es tracta d'un *bi-loop* molt estable, amb valors d'entalpia i energia lliure de Gibbs de l'ordre dels més elevats observats. Cal remarcar, però, que en aquest cas ens trobem en un medi salí amb elevada força iònica, diferent de l'emprat en estudis anteriors. Tot i així, aquesta gran estabilitat costa d'entendre si tenim en compte que en un dels *loops* hi ha una adenina en la segona posició, totalment exposada al dissolvent, que és la situació més desfavorable, com s'ha comentat a la introducció d'aquest bloc.

També s'han realitzat corbes de fusió per RMN, seguint la variació del desplaçament d'alguns protons aromàtics o H1' amb la temperatura, obtenint-se valors de temperatures de fusió al voltant de 62 °C (2 mM oligonucleòtid, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2) i corroborant la gran estabilitat d'aquest oligonucleòtid.

4.4.2 Ressonància Magnètica Nuclear

Primer de tot vam voler comprovar si el que nosaltres creïem, que la mescla $d\langle pTCGTATGT \rangle + d\langle pCACATACT \rangle$ era complicada a causa de l'autoestructuració de $d\langle pTCGTATGT \rangle$ mitjançant parells G·T, era veritat. Per això vam enregistrar espectres monodimensionals de protó del cicle $d\langle pTCGTATGT \rangle$ sol (Figura 4.13.A) i de la mescla heterodimèrica a la mateixa concentració (Figura 4.13.B) (oligonucleòtids cedits per Núria Escaja). En la Figura 4.13 també s'hi inclou l'espectre monodimensional de la mescla heterodimèrica a major concentració enregistrat anteriorment (C). Si ens fixem en aquest espectre, observem que alguns dels senyals imino, concretament els més intensos, corresponen a l'autoestructuració del cicle. En l'espectre de la mescla a menor concentració (Fig. 4.13.B), ja només s'observen els senyals corresponents a l'estructuració de $d\langle pTCGTATGT \rangle$. En l'espectre monodimensional de $d\langle pTCGTATGT \rangle$, s'observen clarament tres senyals imino. El senyal a 13.6 ppm correspon a un imino de G d'un parell G·C, mentre que els senyals a 11.6 i 12.5

ppm corresponen a un parell G·T. Però aquests dos senyals semblen estar desdoblats; és a dir, que tindriem una segona espècie estructurada en solució.

Amb la mostra de ciclor d<pTCGTATGT> a concentració 0.25 mM vam enregistrar alguns espectres bidimensionals i es va observar que aquest oligonucleòtid semblava estructurar-se en forma de *bi-loop* amb parells G·T i G·C. Per poder enregistrar millors espectres a major concentració d'oligonucleòtid, se'n va sintetitzar més, tal i com s'ha explicat en l'apartat 4.2.2.

En els espectres enregistrats a concentració 0.25 mM d'oligonucleòtid, s'observava majoritàriament una espècie, però sobraven alguns sistemes de spin i alguns senyals de protons bescanviabls. Amb els espectres a concentració 2 mM, vam poder corroborar que tenim dues espècies estructurades en equilibri lent en l'escala de temps d'RMN, que donen lloc a jocs de senyals diferents, però degenerats en la majoria dels sistemes de spin de protons no bescanviabls.

En les regions de protons no bescanviabls observem 10 sistemes de spin: 8 sistemes de spin corresponents a una espècie simètrica, en què es poden seguir els passos C2-G3-T4 i T6-G7-T8, i dos sistemes sobrants que corresponen a un pas G7-T8. S'observen variats contactes de T4 i T8 sobre els protons aromàtics i els bescanviabls de les G sobre les quals s'apilen.

En la Taula 4.7 es mostren els desplaçaments de tots els protons que s'han pogut assignar tant de la primera com de la segona espècie. Els senyals de la segona espècie que no es mostren a la taula, estarien degenerats amb els de la primera a causa de la gran similitud de les estructures. És l'assignació i els contactes dels protons bescanviabls el què ens permetrà assignar cada espècie a les dues possibles estructures de la Figura 4.14.

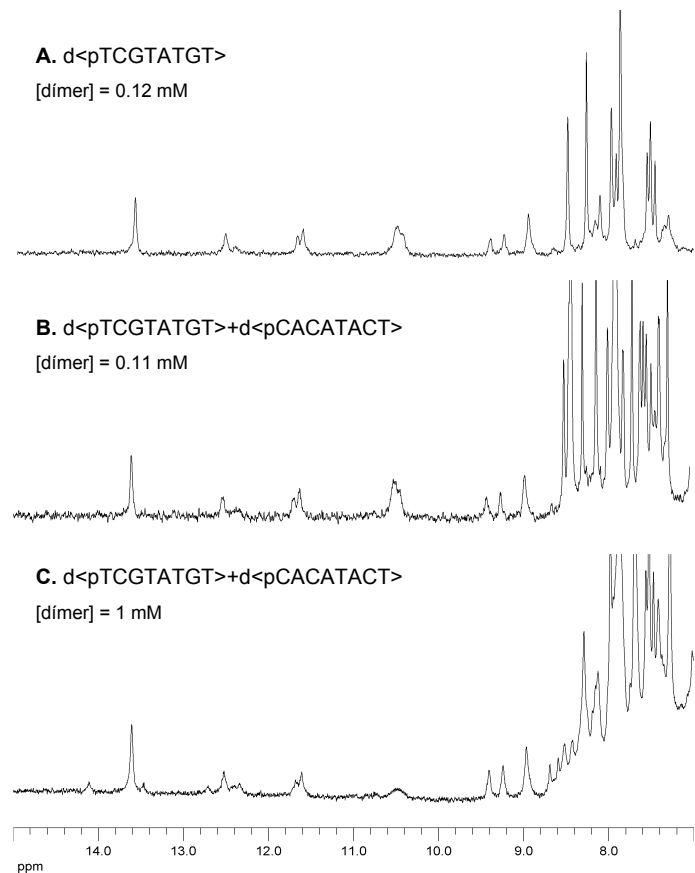


Figura 4.13. Espectres monodimensionals de l'oligonucleòtid d<pTCGTATGT> i de la seva mostra heterodimèrica (fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 5 °C)

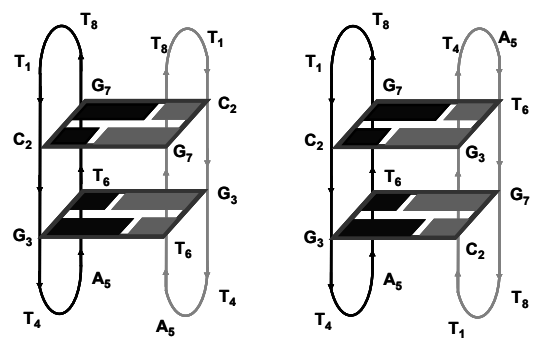


Figura 4.14. Esquemes dels dos *bi-loops* observats

	NH	NH ₂ (2)*	NH ₂ (1)	H6/H8	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'
T1	n.o.	--	--	7.87	1.92	6.47	2.26	2.50	4.59	n.a.
C2	--	8.95	7.30	7.85	6.10	6.31	2.81	2.30	4.91	n.a.
G3	12.52	6.59	8.19	7.91	--	5.96	2.68	2.44	5.23	3.98
T4	**	--	--	7.47	1.63	5.95	1.96	2.43	4.75	n.a.
A5	--	n.o.	n.o.	8.49	n.a.	6.64	2.72	2.85	4.62	4.75
T6	11.60	--	--	7.97	2.11	6.27	2.64	2.48	4.98	n.a.
G7	13.59	9.24	8.25	8.11	--	6.28	2.95	2.62	5.16	4.21
T8	**	--	--	7.54	1.78	6.00	1.94	2.42	4.71	n.a.
G3'	13.59	9.40	7.92		--	5.97				
T6'	11.67	--	--							
G7'	12.39	6.71	8.65	8.15		6.26		2.88	5.15	
T8'	**	--	--	7.51	1.69	5.96	1.95	2.42	4.74	

* NH₂ (2) correspon al protó amino aparellat en el parell WC. ** Els protons imino de T4 i T8 ressonen a 10.40-10.50. n.o. - no observat. n.a. - no assignat

Taula 4.7. Taula d'assignació de *d*<pTCGATGT> a 5 °C.

Primera espècie: bi-loop amb una tètrada GCGC i una altra GTGT. Segona espècie: bi-loop amb dues tètredes GCGT

Els contactes claus són els que s'observen en la Figura 4.15 i es representen amb fletxes en les tètredes de la Figura 4.16. Les dues espècies estan estabilitzades per parells G·C i G·T i, dissortadament, la ressonància de l'imino de G del parell G·C de les dues espècies coincideix al mateix desplaçament. Per a la primera espècie, s'observa un parell G·C i un altre G·T que formen dues tètredes diferents desplaçades. La formació d'aquestes tètredes desplaçades es dedueix pels contactes d'H1' de G3/G7 amb H1 i H22 de la guanina amb la qual s'enfronta, que és ella mateixa per

simetria. Per contra, en el cas de la segona espècie es formen dues tètredes GCGT, de manera que un parell G·C s'enfronta a un parell G·T donant lloc als contactes H1' de G3' amb H22 de G7' i viceversa, H1'G7'-H22G3'. També s'observen contactes entre els amino de G3' i G7'. En tots els casos, totes les guanines presenten dos protons amino diferenciats. També són molt importants els contactes entre T4 i T8 amb els nucleòtids sobre els

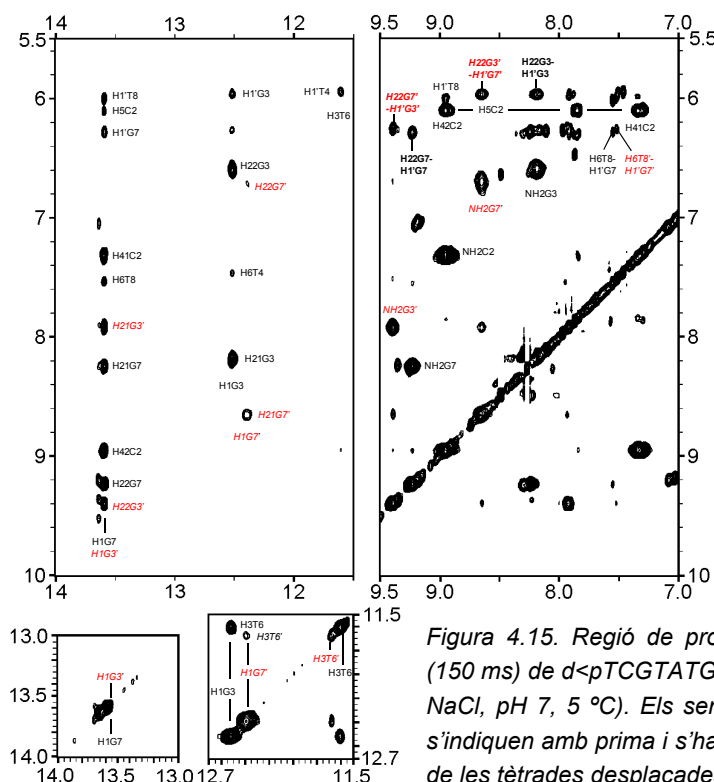


Figura 4.15. Regió de protons bescanviables de l'espectre noesy (150 ms) de *d*<pTCGATGT> en H₂O (2 mM oligonucleòtid, 100 mM NaCl, pH 7, 5 °C). Els senyals corresponents a la segona espècie s'indiquen amb prima i s'han remarcat amb vermell. Els senyals clau de les tètredes desplaçades s'han remarcat amb negra.

quals s'apilen. Així, en el cas de la primera espècie, T4 s'apila sobre G3-T6 (contactes observats: H3T6-H1'T4, H1G3-MeT4) i T8 sobre G7-C2 (contactes H1G7-H1'T8, H1G7-MeT8), mentre en la segona espècie tant T4 com T8 s'apilen sobre la tètrada mixta GCGT, donant lloc a contactes del tipus H1G3'-MeT8', H22G3'-MeT8', H22G7-MeT8'.

Així doncs, podem afirmar que l'octàmer cíclic d<pTCGTATGT> s'estructura en forma de dos *bi-loops* diferents, estabilitzats per parells G·T i G·C. El fet que les dues espècies presentin un gran nombre de senyals comuns, no permet la integració fiable d'aquests pics de correlació NOESY per poder extreure'n distàncies i calcular-ne les estructures, però cal pensar que aquestes serien molt semblant a l'estructura de d<pCCGTCCGT>, amb petits canvis en les tètades.

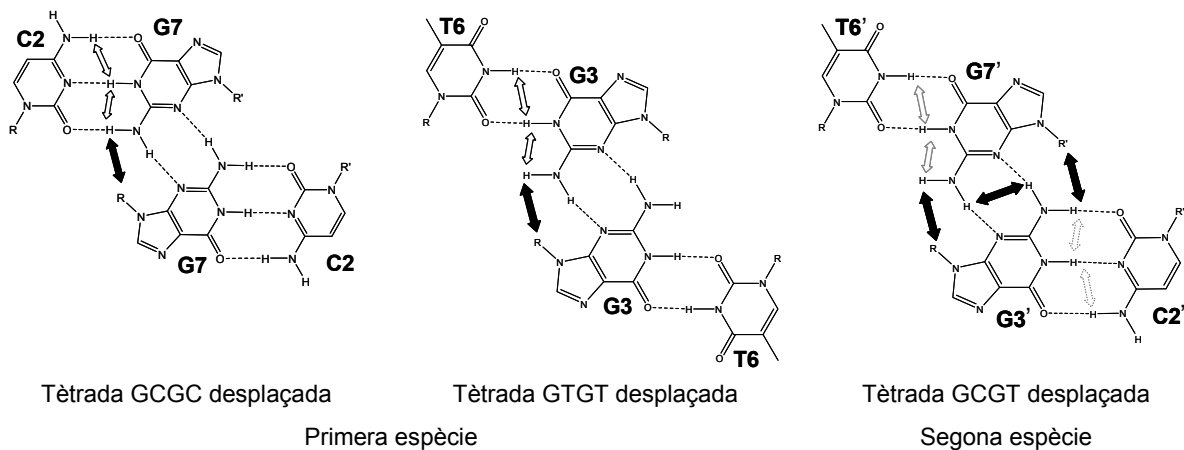


Figura 4.16. Representació de les tètades que es formen amb indicació dels contactes claus que permeten caracteritzar-les

Nosaltres no hem pogut determinar l'estructura d'aquestes tètades GTGT, però cal dir que una tètada de solc menor GTGT desplaçada ja havia estat observada anteriorment¹⁴⁶ en solució en les estructures de d(TCCCGTTTCCA)₂ i d(CCCGTTTCC)₂. Aquests oligonucleòtids, que són part de la capsa de reconeixement de la proteïna centromèrica B (CENP-B), s'estructuren en medi àcid en forma de dímers paral·lels amb una part central tetracatenària amb parells C·C⁺ intercalats (*i-motif*) i dos *loops* GTTT, que formen la tètada GTGT (Figura 4.17). La tètada està formada per dos parells G·T *wobble* que s'enfronten pel solc menor de manera desplaçada, donant lloc a un contacte G·G a través de dos ponts d'hidrogen HN2-N3 entre dues guanines relacionades per simetria. Aquestes guanines presenten un angle de 31° entre elles, similar als angles observats en les tètades de solc menor anteriorment estudiades.

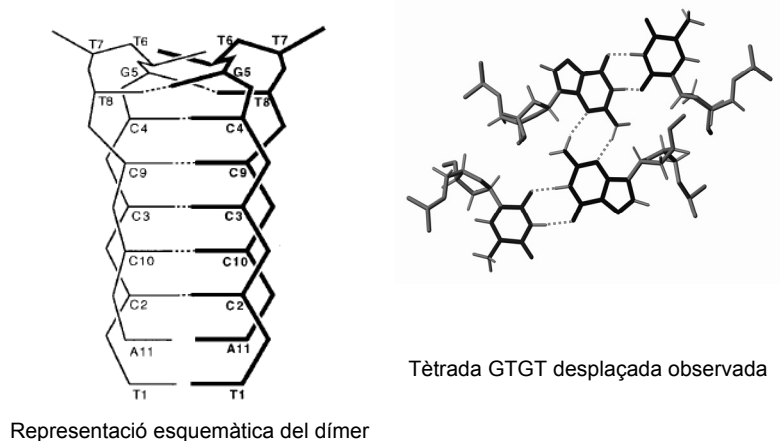


Figura 4.17. Estructura de d(TCCCGTTTCCA)₂ en medi fosfat sòdic 50 mM, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 4.1

5 EL MOTIU BI-LOOP AMB OLIGONUCLEÒTIDS LINEALS

Per reforçar l'idea que aquest motiu podria existir a la natura i tenir rellevància biològica, seria de gran importància poder observar-ne la seva formació amb oligonucleòtids lineals en solució. Recordem que aquesta estructura va ser observada en el cristall d'un oligonucleòtid lineal per difracció de Raig X: d(GCATGCT)^{58a}. Aquesta estructura es va trobar quan s'intentava observar el dúplex d(GCATGCT)₂, estructura que hom esperaria al tractar-se d'una seqüència quasi autocomplementària. És ben sabut que les forces d'empaquetament en el cristall juguen un paper molt important a l'hora de determinar quina és l'estructura que es forma en estat sòlid, però, tot i així, aquesta estructura ha d'existir en solució, encara que sigui en proporcions petites, perquè pugui cristal·litzar. La mateixa estructura es va tornar a resoldre posteriorment per cristal·lografia de Raigs X a major resolució^{58b}, però no s'ha pogut observar en solució, ni amb aquesta seqüència ni amb cap altra.

La gran problemàtica per observar el *bi-loop* en solució és el fet que la formació de parells WC intermoleculares que l'estabilitzen també poden tenir lloc intramolecularment i donar lloc a altres estructures, tipus *dumbbell* en el cas dels oligonucleòtids cíclics o forqueta en el cas dels lineals. A més a més, amb els oligonucleòtids lineals existeix la possibilitat de formar dúplexs parcials o agregats. És aquesta competència entre diverses estructures en solució el que en dificulta l'observació. Cal pensar que si aquesta estructura es formés en un medi biològic, probablement estaria estabilitzada per interacció amb altres molècules, per exemple amb proteïnes.

5.1 Elecció de Les seqüències

Per resoldre el problema de la competència d'estructures, vam decidir triar molt bé les seqüències oligonucleotídiques a estudiar, partint de les seqüències d'octàmers cíclics que sabem que formen *bi-loops* estables però que no s'autoestructuren en forma de *dumbbell*: d<pC**CGTCCGT**> i d<pC**GCTCCGT**>. Vam decidir estudiar els oligonucleòtids lineals provinents d'aquest cicles, ja fos per tall entre els dos nucleòtids del llaç o entre els nucleòtids aparellats, donant lloc a un total de quatre seqüències: d(TCGTTCGT) (L1), d(GTTCGTTC) (L2), d(TGCTTCGT) (L3) i d(GTTGCTTC) (L4) (veure Figura 5.1). En tots els casos es van posar timines en les posicions no aparellades, per minimitzar possibles estructures no desitjades. Posteriorment, en vista dels resultats obtinguts en

l'estudi per RMN, es va decidir estudiar també una nova seqüència: d(TCGTTGCT) (L5).

A més a més, en aquest estudi s'hi va voler incloure també l'heptàmer lineal d(GCATGCT), a efectes comparatius. Tot i que pot formar un dúplex en solució, en volíem veure el comportament en realitzar l'exploració de condicions per intentar establir el *bi-loop*.

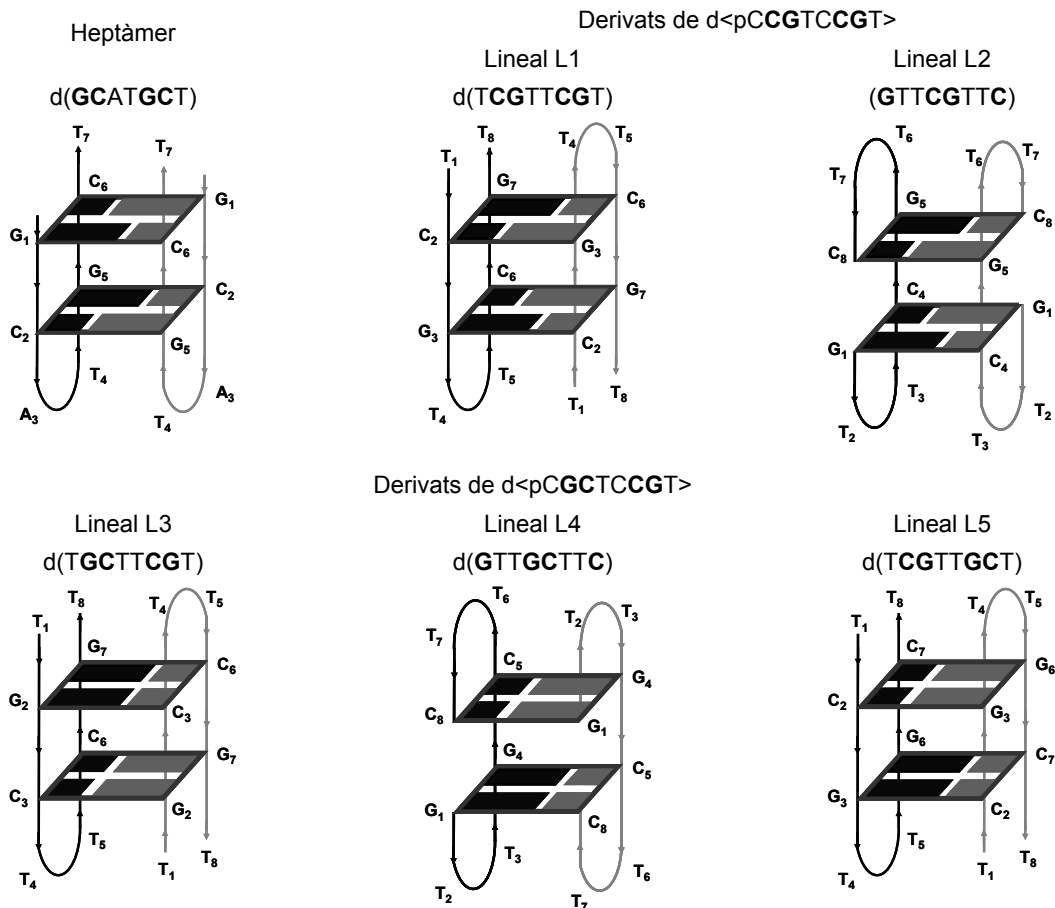


Figura 5.1. Seqüències lineals escollides i esquemes dels possibles *bi-loops*

5.2 Síntesi dels oligonucleòtids

Les síntesis d'aquests oligonucleòtids lineals es van realitzar en el sintetitzador Expedite emprant cicles de síntesi estàndard a escala 1 μmol i eliminant sempre el protector DMT de l'extrem 5' (*DMT off*). Les síntesis en general van tenir lloc amb bons rendiments i van donar lloc a crus força purs. Els productes van ser purificats per MPLC i posteriorment dessalats o, si la puresa ja era suficient, només dessalats abans del seu ús posterior, ja fos per estudis de dicromisme circular o per RMN. En la Taula 5.1 es resumeixen les diferents síntesis realitzades. Els productes es van caracteritzar per MS-MALDI-TOF.

Nom	Seqüència	Síntesi	Rend. total cru (%)	Rend. prod. pur (%)
L1	d(TCGTTCGT)	2x1 µmol	53 % (74 OD)	18 % (25 OD)
		1 µmol	81 % (57 OD)	19 % (13 OD)
		2x1 µmol	--	39 % (55 OD)
L2	d(GTTCGTTC)	2x1 µmol	56 % (79 OD)	18 % (26 OD)
		1 µmol	95 % (67 OD)	47 % (33 OD)
		1 µmol	--	31% (22 OD)
L3	d(TGCTTCGT)	2x1 µmol	44 % (60 OD)	20 % (27 OD)
		1 µmol	65 % (44 OD)	25 % (17 OD)
		2x1 µmol	--	29 % (35 OD)
		2x1 µmol	58 % (78 OD)*	
		2x1 µmol	76 % (103 OD)	35 % (47 OD)
L4	d(GTTGCTTC)	2x1 µmol	63 % (85 OD)	33 % (45 OD)
		2x1 µmol	--	40 % (54 OD)
L5	d(TCGTTGCT)	3x1 µmol	64 % (129 OD)	54 % (104 OD)
		2x1 µmol	77 % (104 OD)*	
H	d(GCATGCT)	2x1 µmol	53 % (67 OD)	13 % (17 OD)

*productes no purificats

Taula 5.1. Resum de les síntesis realitzades dels oligonucleòtids lineals estudiats en aquest capítol

5.3 Estudis mitjançant dicroisme circular i espectroscòpia UV

5.3.1 Escombrat de condicions d'estructuració mitjançant DC

La idea de l'estudi realitzat per dicroisme circular fou la d'intentar trobar unes condicions especials que afavorissin el *bi-loop*. Amb aquesta intenció es va decidir veure l'efecte de canviar la concentració i tipus de catió divalent, el tipus de catió monovalent i la concentració d'oligonucleòtid.

Fins aquí les condicions per als estudis de dicroisme circular havien estat: 10 µM d'oligonucleòtid, 10 mM de Na₂PIPES pH 7, 100 mM de NaCl i 10 mM de MgCl₂, T=10 °C. Vam decidir continuar fent servir aquestes condicions de base i anar canviant cadascun dels paràmetres en estudis independents. Així, es va estudiar l'efecte d'augmentar la concentració de MgCl₂ de 10 a 50 i 100 mM, l'efecte de canviar Mg²⁺ per Ba²⁺, Co²⁺ o Ni²⁺, l'efecte de canviar Na⁺ per K⁺ o NH₄⁺ i l'efecte d'augmentar la concentració d'oligonucleòtid de 10 a 100, 500 i 1000 µM. Cal dir que aquestes són concentracions molt elevades d'oligonucleòtid pel que acostumen a ser els estudis de dicroisme circular, que generalment s'enregistren a una concentració de 5 µM o menor. Per treballar en aquestes concentracions, cal emprar cubetes de pas de llum més curt, fins a 0.01 cm per a concentracions de 500 i 1000 µM.

Primer de tot es van enregistrar els espectres dels oligonucleòtids cíclics que serveixen com a patró, a una concentració de 10 µM, tant en aigua com en medi tamponat. Podem observar el que ja havíem explicat en descriure les característiques del motiu *bi-loop*. Pel cas de la seqüència d<pCCGTCCGT>, es produeix un desplaçament hipsocròmic del màxim fins a 264.5 nm (Figura 5.2.A). El fet de canviar

el sodi per potassi, no afecta a l'estabilització. L'augment de la concentració de Mg^{2+} tampoc afecta a l'estabilització (espectres que no es mostren), indicant que en les condicions d'estudi ja ens trobem en situació de total estructuració. Pel cas de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$, també es produeix un desplaçament hipsocròmic del màxim fins a 275 nm (Figura 5.2.B).

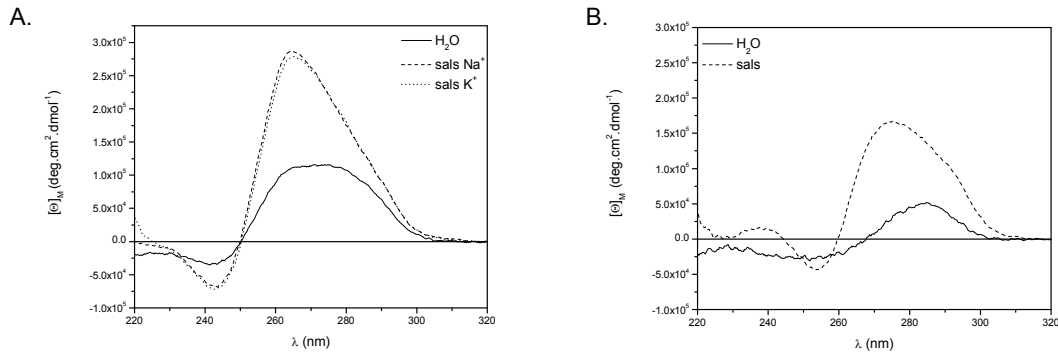


Figura 5.2. Espectres de diroisme circular dels patrons de referència. A. $d\langle pCCGTTCCGT \rangle$. B. $d\langle pCGCTCCGT \rangle$

5.3.1.1 Efecte de canviar a la concentració de catió divalent (Figura 5.3)

Com ja s'ha comentat, anteriorment s'havia vist que l'augment de la concentració de magnesi afavoria l'estructuració i estabilització del *bi-loop* en el cas de tenir parells A·T, és a dir, en els *bi-loops* menys estables. Per això vam voler veure l'efecte sobre els nostres oligonucleòtids lineals.

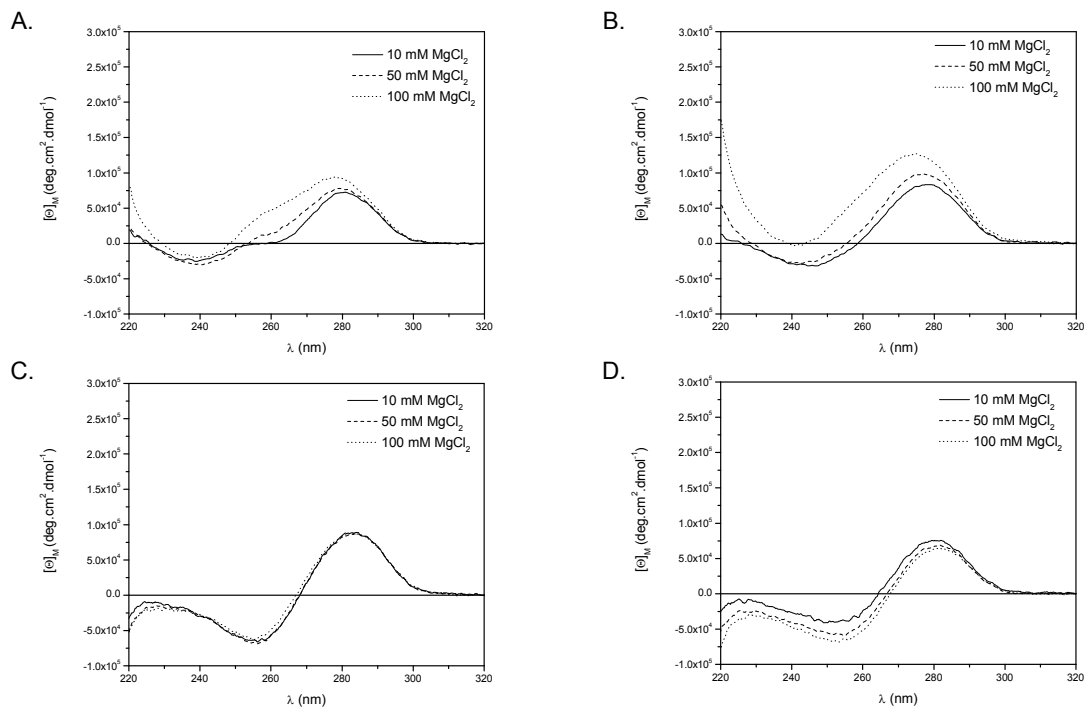


Figura 5.3. Efecte d'augmentar la concentració de magnesi: A. L1, $d(TCGTTCCGT)$. B. L2, $d(GTTCCGTTCC)$. C. L3, $d(TGCTTCGT)$. D. L4, $d(GTTGCTTC)$ (10 μ M, 10 mM Na₂PIPES pH 7, 100 mM NaCl, x mM MgCl₂, 10 °C).

Pel cas de les seqüències derivades de $d\langle pCCGTCCGT \rangle$, L1 i L2, s'observa una certa estabilització en augmentar la concentració de MgCl₂ que s'aprecia per un augment de l'el·lipticitat i un canvi del perfil (desplaçament hipsocròmic del màxim), contràriament al que succeeix amb el seu anàleg cíclic.

En canvi, per L3 i L4, derivats de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$, no existeix una estabilització en augmentar la concentració de $MgCl_2$. En tots els casos, el màxim d'absorció es troba al voltant de 280 nm i els espectres no concorden gaire amb els dels patrons de referència, pel que no semblaria que en aquestes condicions s'estructurin en forma de dímers.

5.3.1.2 Efecte de canviar el catió monovalent (Figura 5.4)

No existia cap estudi sobre l'efecte de canviar el catió monovalent en l'estructura del motiu *bi-loop*. Sabem que quan està estabilitzat per tètades ATAT i GCAT pot coordinar un catió Na^+ al centre de la molècula, tal i com es va observar en l'estructura de RX^{58} i com es va calcular per a la tètada mixta¹⁰⁶, però es desconeix l'efecte que pot tenir en les interaccions amb els fosfats tan propers en l'espai o amb altres parts de la molècula. Per això vam voler estudiar si en podíem millorar l'estabilitat per efecte del catió monovalent, com succeeix amb els quàdruplexs de guanina, que poden presentar diferents estructures i diferents estabilitats segons si el catió és Na^+ o K^+147 .

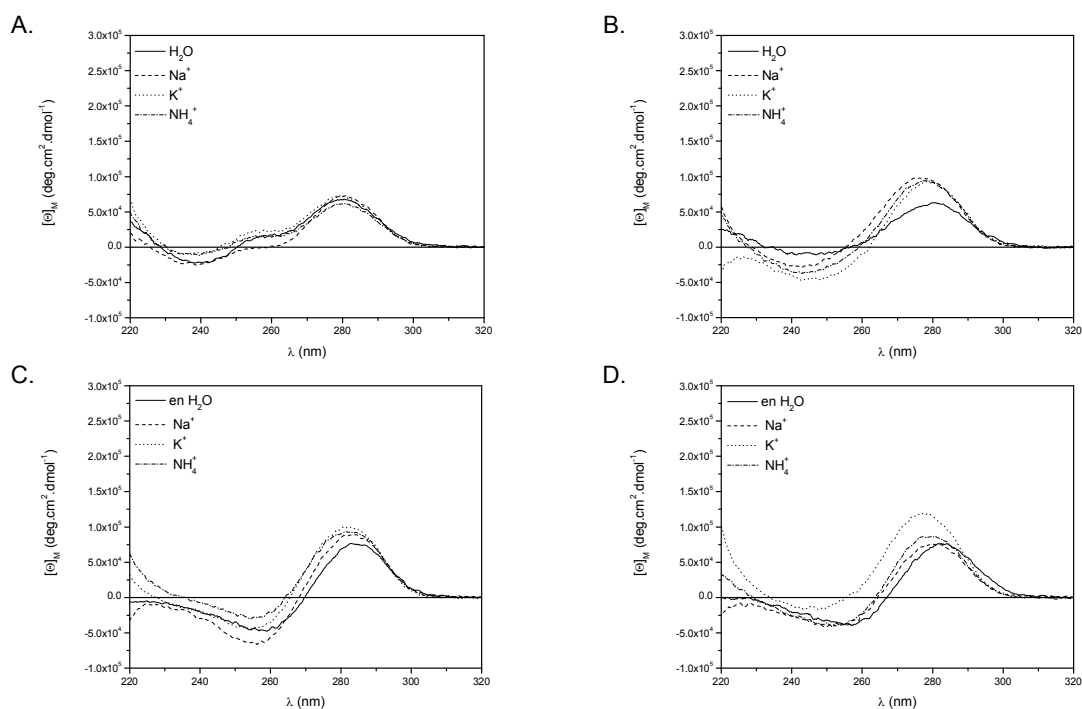


Figura 5.4. Efecte de canviar el catió monovalent: A. L1, $d(TCGTTCGT)$. B. L2, $d(GTTCGTTT)$. C. L3, $d(TGCTTCGT)$. D. L4, $d(GTTGCTTC)$ ($10 \mu M$, $10 mM Na_2PIPES$ pH 7, $100 mM XCl$, $10 mM MgCl_2$, $10 ^\circ C$)

L'efecte de canviar el catió monovalent no és gaire pronunciat, excepte pel cas del K^+ amb l'oligonucleòtid $d(GTTGCTTC)$, L4, en què sembla que sí que es produeix una estabilització addicional per l'augment de l'el·lipticitat i desplaçament hipsocròmic del màxim.

5.3.1.3 Efecte de canviar el catió divalent (Figura 5.5)

En les estructures de Raig X en què s'ha observat el *bi-loop*, sempre s'han pogut localitzar cations divalents interaccionant amb els fosfats, ja fos Mg^{2+} , en la primera estructura de l'heptàmer lineal^{58a}, Co^{2+} en la segona estructura del mateix oligonucleòtid a major resolució^{58b} o Ba^{2+} , en l'estructura de l'octàmer cíclic $d\langle pCATTCAATT \rangle^{59}$. A més a més, cal recordar que el Co^{2+} sempre estava present en

les estructures de d(CGACG) amb els agents intercalants, formant una plataforma quàdruplex molt semblant al *bi-loop*¹¹⁹. Així doncs, pensàvem que el catió divalent podia tenir un paper important en l'estabilització global de l'estructura i vam decidir assajar Mg²⁺, Ba²⁺, Co²⁺ i Ni²⁺, aquest darrer perquè també s'ha observat estructures de RX en què es donen contactes entre parells G·C pel solc menor.

Els efectes observats són molt similars als del canvi del catió monovalent, és a dir, canvis mínims poc significatius, excepte pel cas de l'oligonucleòtid d(GTTGCTTC), L4, l'estructuració del qual es veu especialment afavorida en medi amb Ba²⁺. Així doncs, si realment existeix una interacció dels cations divalents amb els fosfats, sembla que el tipus de catió no és especialment important per a l'estabilització en solució. Una qüestió diferent és l'efecte que pugui tenir per a l'empaquetament i la cristallització de l'oligonucleòtid.

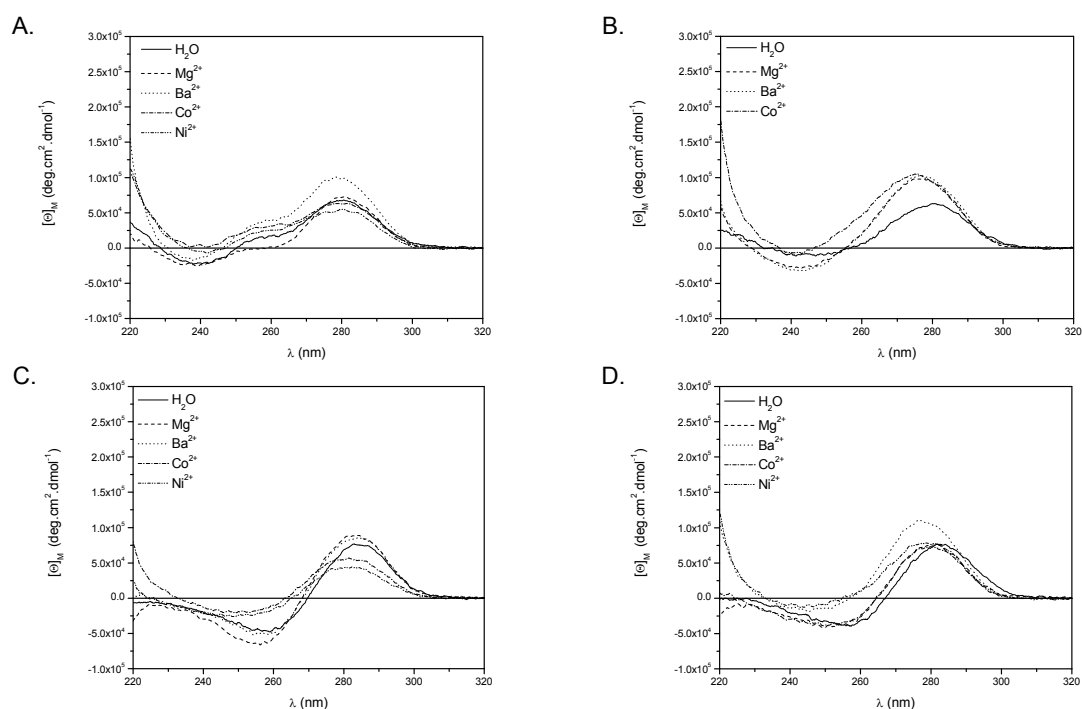


Figura 5.5. Efecte de canviar el catió divalent: A. L1, d(TCGTTCGT). B. L2, d(GTTCGTTC). C. L3, d(TGCTTCGT). D. L4, d(GTTGCTTC) (10 μM, 10 mM Na₂PIPES pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM XCl₂, 10 °C)

5.3.1.4 Efecte d'augmentar la concentració d'oligonucleòtid (Figura 5.6)

Com que es tracta d'equilibris d'associació entre dues molècules, l'efecte d'augmentar la concentració sempre serà el d'una major estabilització ja que desplaçarem l'equilibri cap a la forma dimèrica. Però cal veure fins a quin punt és necessari augmentar la concentració per poder observar un *bi-loop* estable. Aquesta informació ens servirà per als posteriors estudis mitjançant RMN i per decidir les condicions per a les proves de ciclació (capítol 4 del bloc 2).

Com s'observa a la Figura 5.6, l'efecte d'augmentar la concentració d'oligonucleòtid és realment espectacular. En el cas dels oligonucleòtids L1 i L2 s'observa molt clarament un augment considerable de l'el·lipticitat molar i desplaçament hipsocròmic del màxim fins a 265 nm, donant lloc a un perfil molt semblant al de l'espectre de l'oligonucleòtid patró d<pCCGTCCGT> (Figura 5.7.A).

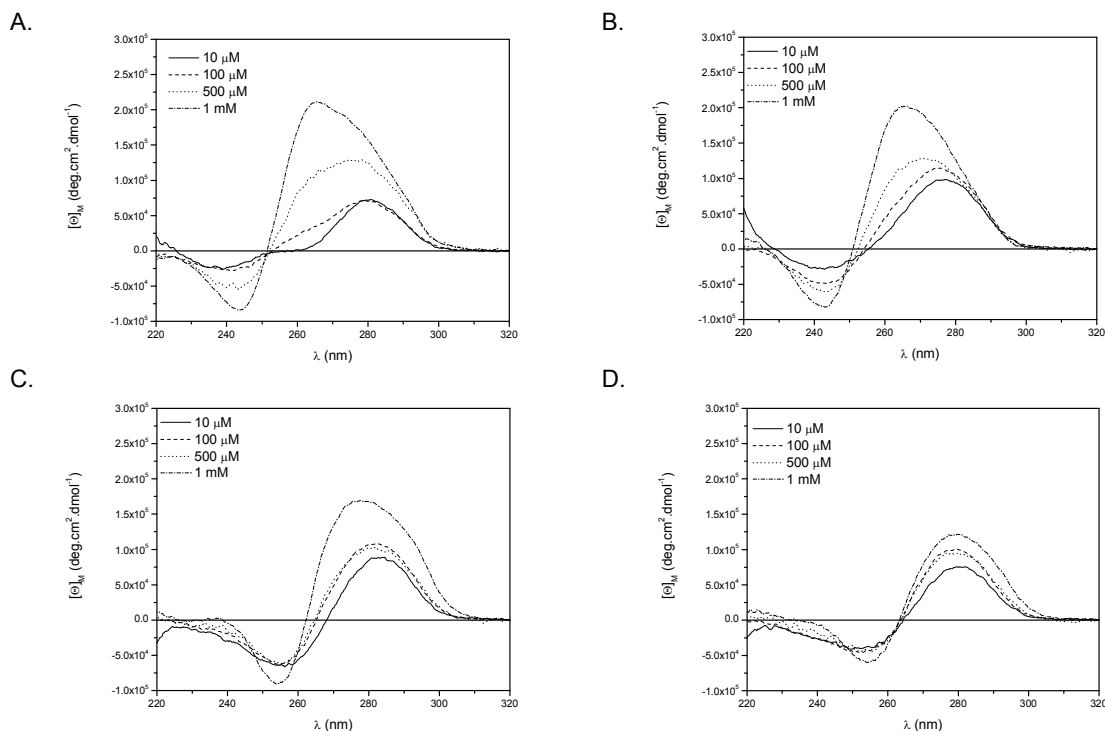


Figura 5.6. Efecte d'augmentar la concentració d'oligonucleòtid: A. L1, d(TCGTTCGT). B. L2, d(GTTCGTTTC). C. L3, d(TGCTTCGT). D. L4, d(GTTGCTTC) (10 mM Na₂PIPES pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 °C per les mostres a conc. 10, 100 i 500 μM; 10 mM Na₂PIPES pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 5 °C per les mostres a conc. 1 mM)

En el cas dels oligonucleòtids L3 i L4, l'efecte d'augmentar la concentració no és tan marcat, però l'espectre a elevada concentració també mostra una elevada similitud amb el del seu anàleg cíclic a concentració 10 μM (Figura 5.7.B). A part, els dos presenten el curiós efecte que els espectres a concentració 100 i 500 μM són pràcticament superposables. Com que l'oligonucleòtid L4, d(GTTGCTTC), semblava estructurar-se en major grau tant en medi amb K⁺ com en Ba²⁺, es va decidir enregistrar el seu espectre en presència d'aquests dos cations a concentració 1 mM d'oligonucleòtid. Aquest espectre es mostra a la Figura 5.7.B i, malauradament, cal dir que en aquestes condicions d'elevada concentració d'oligonucleòtid, aquest efecte estabilitzador no s'observa.

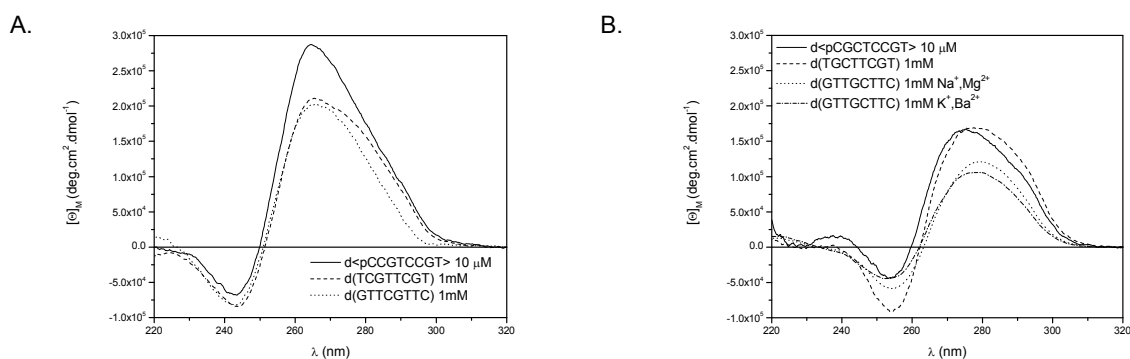
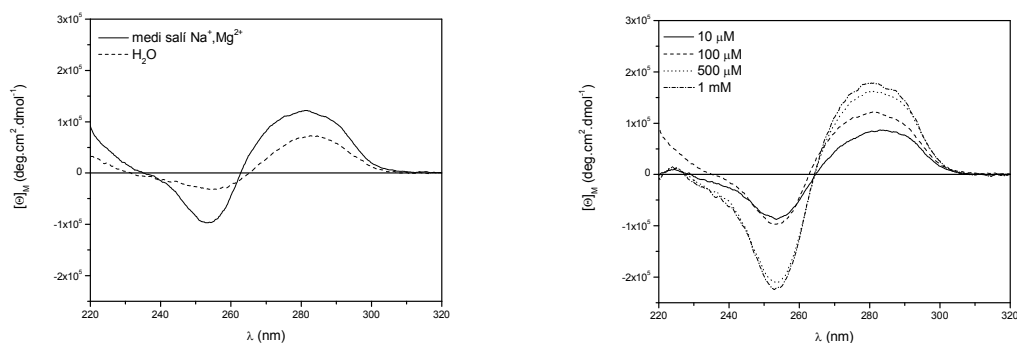


Figura 5.7. Comparació dels espectres dels oligonucleòtids lineals a concentració 1 mM amb els dels seus respectius patrons, a concentració 10 μM

Cal concloure, doncs, que l'únic paràmetre que afecta substancialment a l'estructuració i dóna lloc a espectres anàlegs als dels patrons cíclics és la concentració d'oligonucleòtid. Sembla que l'efecte dels cations, tant monovalents com divalents, és purament electrostàtic i no de coordinació en una posició determinada que requereixi una mida adequada, com sí que ocorre en les estructures de RX. Per tant, es va decidir realitzar els posteriors estudis mitjançant RMN en un medi anàleg: solució amortidora de fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, tot i la pèrdua de sensibilitat que comporta treballar amb un catió divalent en el medi.

5.3.1.5 Estudi de l'heptàmer (Figura 5.8)

Per últim, comentar els resultats que es van obtenir de l'estudi amb l'heptàmer d(GCATGCT). El perfil que mostra és força diferent al dels altres oligonucleòtids lineals, amb un màxim molt ample al voltant de 280 nm i un mínim a 253 nm (Figura 5.8). Aquest perfil concorda força amb l'esperat per un B-DNA.



A. Comparació dels espectres en aigua i en medi salí B. Efecte d'augmentar la concentració d'oligonucleòtid

Figura 5.8. Estudi de l'heptàmer d(GCATGCT)

L'oligonucleòtid mostra una major estructuració en medi salí que en aigua, però l'efecte de canviar els cations no ha donat resultats positius, observant-se només variacions petites i que la major estabilització es dóna en medi amb Na⁺ i Mg²⁺. El fet d'augmentar la concentració de catió divalent no modifica l'espectre. Els majors canvis s'observen en variar la concentració d'oligonucleòtid, amb un augment de l'el·lipticitat i un desplaçament molt lleuger del màxim, però a 500 μM ja s'ha arribat a l'estructuració total, contràriament al que succeeix amb els altres oligonucleòtids.

5.3.2 Fusions per dicromisme circular (Figura 5.9)

Finalment, a les condicions de concentració d'oligonucleòtid aproximadament 1 mM, solució amortidora 10 mM de Na₂PIPES pH 7, 100 mM de NaCl i 100 mM de MgCl₂, es van enregistrar també corbes de fusió per dicromisme circular i espectres a diferents temperatures (Figura 5.9).

Les fusions s'han seguit a la longitud d'ona del màxim de l'espectre de DC a 5 °C, és a dir: a 265 nm per L1 i L2, a 277 nm per L3 i a 280 nm per L4. Les temperatures de fusió han estat calculades amb el mètode de la mediana, tot i ser força subjectives ja que en alguns casos no tenim plafo a alta o a baixa temperatura, però les primeres derivades no donen mínims clars i no en podem extreure temperatures fiables.

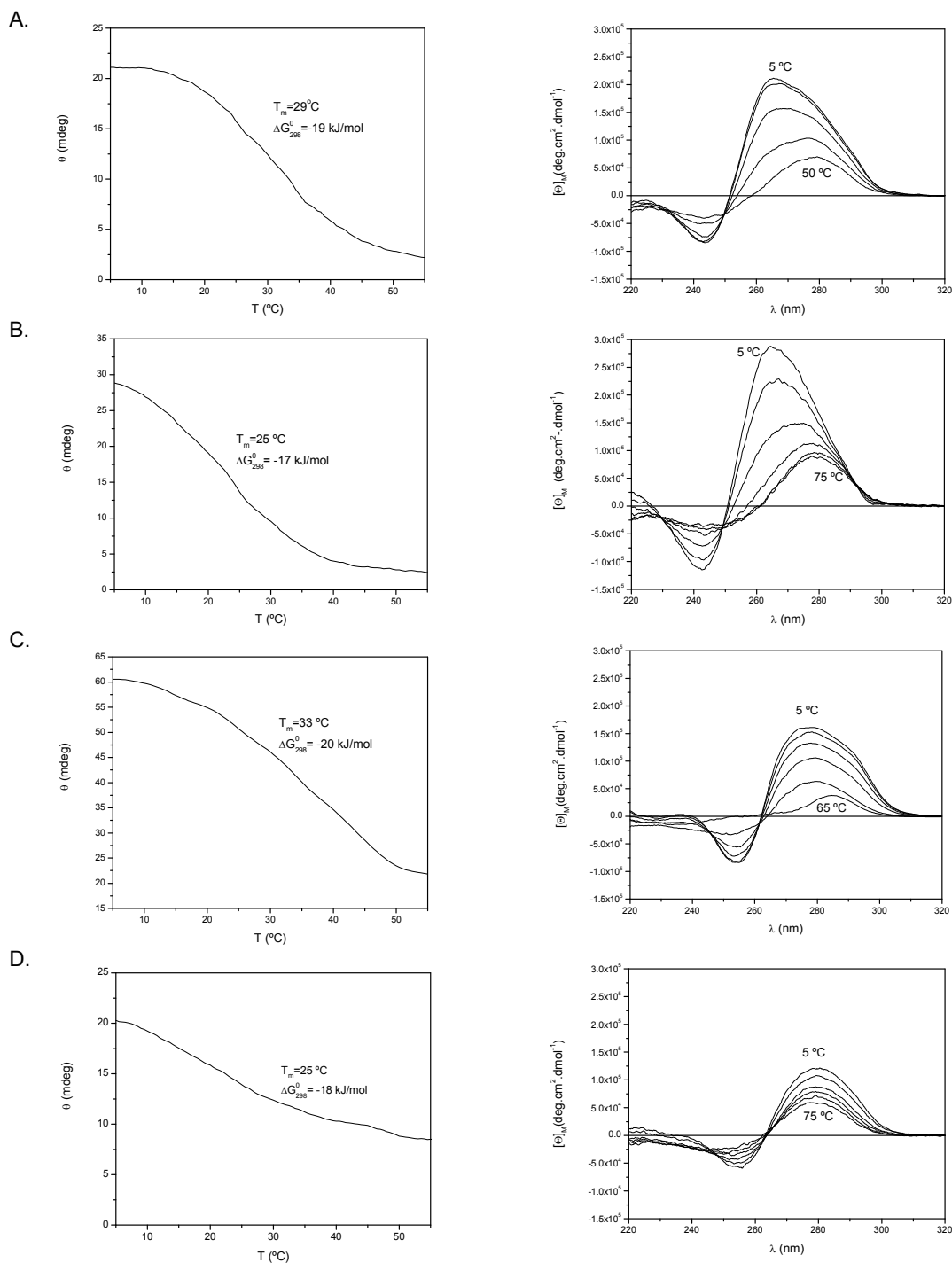


Figura 5.9. Fusions dels diferents oligonucleòtids: A. L1, d(TCGTTCGT) 1.2 mM, B. L2, d(GTTCGTTC) 1.7 mM, C. L3, d(TGCTTCGT) 2.5 mM, D. L4, d(GTTGCTTC) 1.2 mM (10 mM Na_2PIPES pH 7, 100 mM NaCl i 100 mM MgCl_2)

A partir de només una corba s'han calculat els paràmetres termodinàmics. Com que partim d'un informació força pobre, només s'han considerat vàlids els valors de ΔG^0 obtinguts. Els valors de T_m i ΔG^0 es mostren en les gràfiques.

A jutjar pel perfil dels espectres a diferent concentració i a diferent temperatura i per la gran semblança entre l'espectre de l'oligonucleòtid lineal i el del corresponent anàleg i patró cíclic, sembla que la seqüència més prometedora és d(GTTCGTTC) (L2). Els oligonucleòtids d(TCGTTCGT) (L1) i

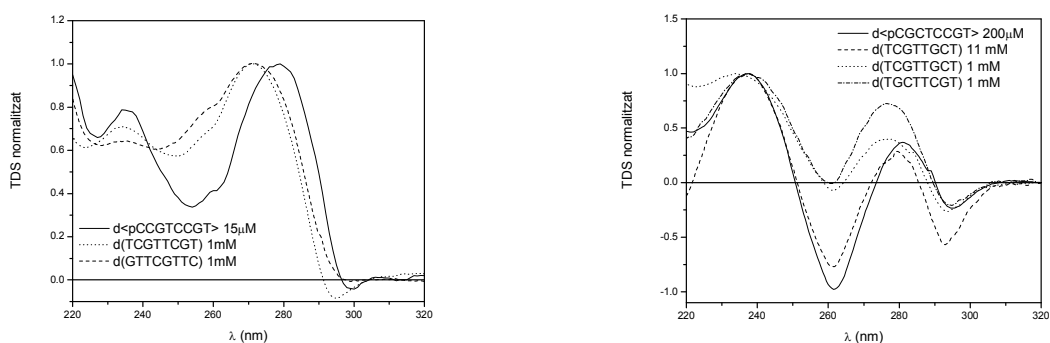
d(TGCTTCGT) (L3) també semblen presentar una estructuració clara, però es fa difícil de dir només en base als espectres de dicroisme circular si aquesta estructuració correspondria a un *bi-loop*.

5.3.3 Espectres de diferència tèrmica (TDS)

Com s'ha comentat en els fonaments, recentment s'ha descrit l'ús de l'espectroscòpia d'ultraviolat per caracteritzar les diferents estructures dels àcids nucleics mitjançant el seu espectre de diferència tèrmica⁷⁶. El perfil de l'espectre de TDS reflecteix les subtilitats dels diferents apilaments de les bases que es donen en cada tipus d'estructura del DNA i complementa al dicroisme circular per a la caracterització d'estructures en solució. Nosaltres hem volgut aplicar aquesta metodologia per veure si és útil per a la caracterització del *bi-loop*.

En la Figura 5.10.A observem els perfils de TDS de l'oligonucleòtid cíclic d<pCCGTCCGT>, que forma un *bi-loop* amb les tètades desplaçades, i dels seus dos anàlegs lineals. Tot i que els perfils són força semblants, la posició de la banda més intensa difereix substancialment entre l'espectre de l'oligonucleòtid cíclic i els dels lineals, indicant que no es deu tractar de la mateixa estructura, ja que en l'article original no s'observen variacions tant notables en cap de les famílies d'estructures.

En la Figura 5.10.B observem que els espectres de TDS presenten el mateix perfil tant per l'oligonucleòtid cíclic d<pCGCTCCGT> com per als seus anàlegs lineals d(TGCTTCGT), L3, i d(TCGTTGCT), L5, de manera que si finalment corroborarem que aquests oligonucleòtids s'estructuren en forma de *bi-loop*, tindrem una metodologia molt fàcil per detectar aquesta estructura. Els espectres de diferència tèrmica presenten un màxim al voltant de 280 nm per al cas de les mostres més estructurades, l'oligonucleòtid cíclic a 200 µM i l'oligonucleòtid lineal d(TCGTTGCT) a 11 mM, i al voltant de 276 nm per a les que no ho estan tant, com és el cas dels oligonucleòtids lineals a menor concentració. El mínim coincideix en tots els casos al voltant de 261 nm, al igual que el segon màxim al voltant de 237 nm.



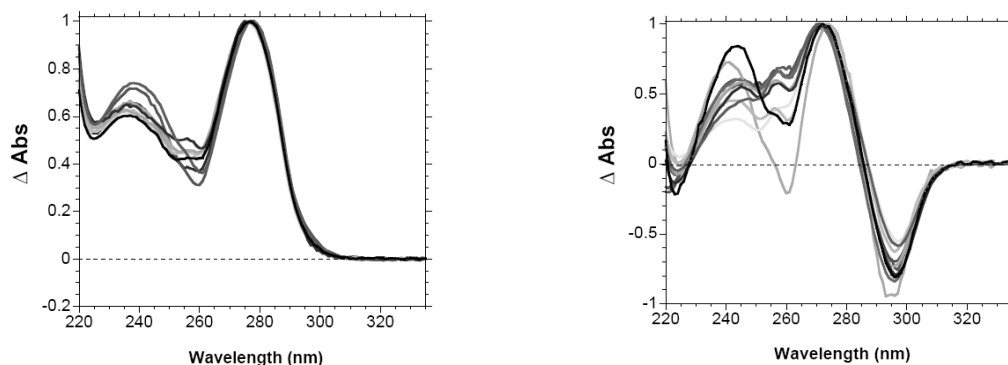
A. Anàleg cíclic d<pCCGTCCGT> (15 µM) i derivats lineals d(TCGTTGCT) i d(GTTCGTTC) (1 mM).

B. Anàleg cíclic d<pCGCTCCGT> (200 µM) i derivats d(TCGTTGCT) (1 i 11 mM) i d(TGCTTCGT) (1 mM).

Figura 5.10. Espectres de TDS normalitzat per als oligonucleòtids cíclics i els seus anàlegs lineals

Si comparem aquests espectres TDS amb els descrits (veure Figura 5.11), els perfils de la Figura 5.10.A s'assemblen força als d'un dúplex (Figura 5.11.A), mentre que els de la Figura 5.10.B recorden als dels quàdruplex de guanina en medi amb Na⁺ (Figura 5.11.B), indicant similituds en els apilaments de les bases en aquestes estructures.

El que ja imaginàvem era que no seria possible trobar un perfil igual per a tots els *bi-loops* ja que, com s'ha comentat a la introducció, els apilaments de les bases són molt diferents, especialment entre el *bi-loop* amb tètredes desplaçades i tota la resta.



A. B-DNA dúplexs autocomplementaris 100% G·C

B. G-quadruplex en medi amb Na⁺Figura 5.11. Perfils de TDS de referència per a dúplex i quàdruplex⁷⁶

5.4 Estudis mitjançant Ressonància Magnètica Nuclear

Inicialment es va començar l'estudi mitjançant RMN de l'oligonucleòtid lineal d(GTTCGTTC) (L2), que semblava el més prometedora segons els estudis de DC, però els resultats no van ser satisfactoris. En reanalitzar la mostra d'RMN per dicroisme circular, es va observar que el perfil no corresponia a l'observat en l'estudi anterior. Segurament aquest fet es deu a què amb aquests oligonucleòtids lineals és molt important realitzar una desnaturalització i renaturalització prèvia i lenta, i mantenir sempre la mostra a baixa temperatura fins a enregistrar-ne l'espectre. A part, seria possible que el dicroisme circular ens hagués enganyat respecte a quina és la seqüència més prometedora. Per això es va decidir comprovar l'estructuració de tots els oligonucleòtids en el medi de treball d'RMN per dicroisme circular, i prosseguir l'estudi mitjançant RMN amb totes les seqüències. A més a més, s'hi va incorporar d(TCGTTGCT) (L5), derivat de d<pCGCTCCGT>, al igual que la seqüència d(TGCTTCGT) (L3), però tallat per l'altre llaç.

5.4.1 Anàlisi dels espectres monodimensionals

Abans de procedir a enregistrar els espectres de ressonància magnètica nuclear, es van enregistrar nous espectres de dicroisme circular a concentració aproximadament 1 mM en medi de fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂. Quan es va haver comprovat que l'estructuració era la correcta (perfils de dicroisme circular iguals als enregistrats en l'estudi previ), les mostres es van transvasar directament als tubs d'RMN i es va procedir a enregistrar els espectres monodimensionals de protó. A la Figura 5.12 es mostren els espectres monodimensionals enregistrats en el medi amortidor a 5 °C. Només amb aquests espectres ja podem extreure força informació.

L'oligonucleòtid d(TCGTTCGT), L1, sembla que sí que s'estructura, com ho demostra el senyal d'imino a 15.3 ppm; però aquest desplaçament és anormalment elevat i no correspon a un parell WC sinó a l'imino d'una citosina protonada. L'oligonucleòtid L2, d(GTTCGTTC), presenta un senyal a 13.6 ppm, que podria correspondre a un imino de G d'un parell G·C, però si s'estructurés en forma de *bi-loop*, s'haurien d'observar dos iminos de G diferents. Els oligonucleòtids d(TGCTTCGT), L3, i d(TCGTTGCT), L5, presenten dos senyals entre 13 i 14 ppm que poden correspondre als dos iminos de G dels parells G·C esperats per a la formació d'un *bi-loop*. L'oligonucleòtid d(GTTGCTTC), L4, no sembla que tingui cap estructura específica, ja que no s'observen senyals estrets d'iminos que indiquin l'existència de ponts d'hidrogen. Després d'aquest anàlisi preliminar, es va decidir continuar o no amb l'estudi dels diversos oligonucleòtids segons els resultats obtinguts.

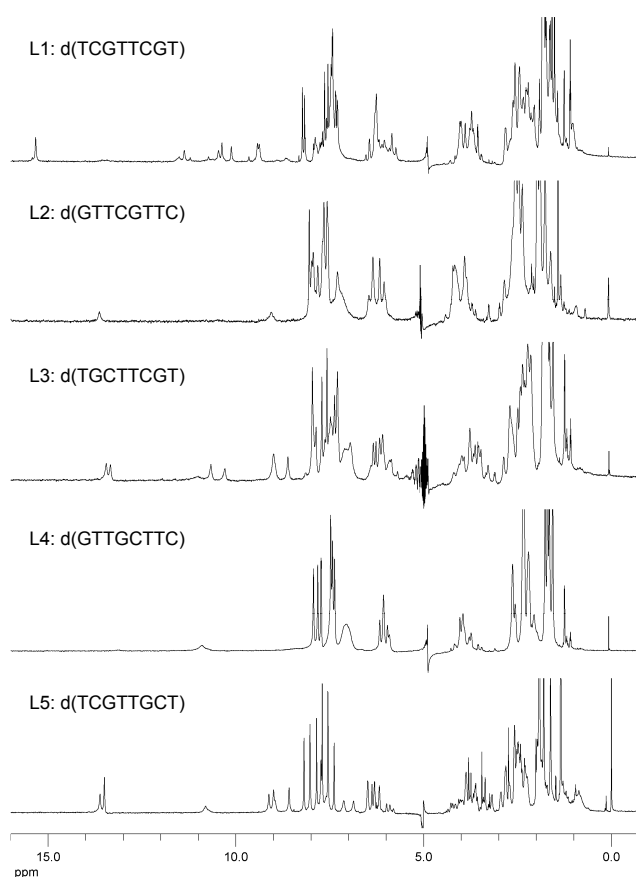


Figura 5.12. Espectres monodimensionals de protó dels oligonucleòtids lineals a conc ~1 mM (fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 5 °C)

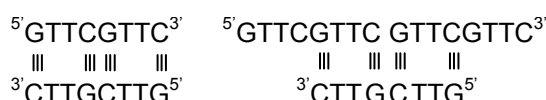
L1: d(TCGTTGCT)

Aquest oligonucleòtid sembla estructurar-se mitjançant parells C·C⁺. Vam realitzar espectres monodimensionals reduint el pH fins a 5 i l'estructura observada es va fer més estable.

L2: d(GTTCGTTC)

Aquest oligonucleòtid presenta algun tipus d'estructuració que fon a molt baixa temperatura i que s'estabilitza amb la presència de magnesi, però no pot correspondre al *bi-loop*. En els espectres bidimensionals no s'observa cap pic de correlació del protó imino a 13.6 ppm ja que intercanvia amb el dissolvent. S'observen 8 sistemes de spin, però cap dels trets característics del *bi-loop*. S'ha de tractar de contactes entre parells G·C tipus dúplex, com els que es mostren en la següent figura:

Figura 5.13. Possibles estructuracions de l'oligonucleòtid d(GTTCGTTC)



L3: d(TGCTTCGT)

En el cas de d(TGCTTCGT), tant els espectres monodimensionals com els bidimensionals mostren que ens podem trobar davant d'un oligonucleòtid lineal que s'estructura en forma de *bi-loop*. A la Figura 5.15 es mostren espectres monodimensionals a diferents concentracions, on s'observa que es tracta d'una estructura multimèrica ja que els espectres varien amb concentració

L4: d(GTTGCTTC)

En aquest cas ni tan sols es van enregistrar espectres bidimensionals ja que l'absència de protons imino indiquen l'absència d'una estructuració específica.

L5: d(TCGTTGCT)

Aquesta nova seqüència, introduïda arran de d(TGCTTCGT) (L3), es comporta com aquesta darrera; és a dir, mostra trets característics del *bi-loop* tant en els espectres mono com bidimensionals. A la Figura 5.15 es mostra una fusió d'aquest oligonucleòtid seguida per RMN on es veu la progressiva desaparició dels senyals imino a mesura que s'augmenta la temperatura i els canvis de desplaçaments que experimenten la resta de protons, com per exemple els aromàtics, que passen de mostrar una bona dispersió a baixa temperatura, quan l'oligonucleòtid està estructurat, a col·lapsar en un estret rang de desplaçaments quan l'oligonucleòtid es desestructura.

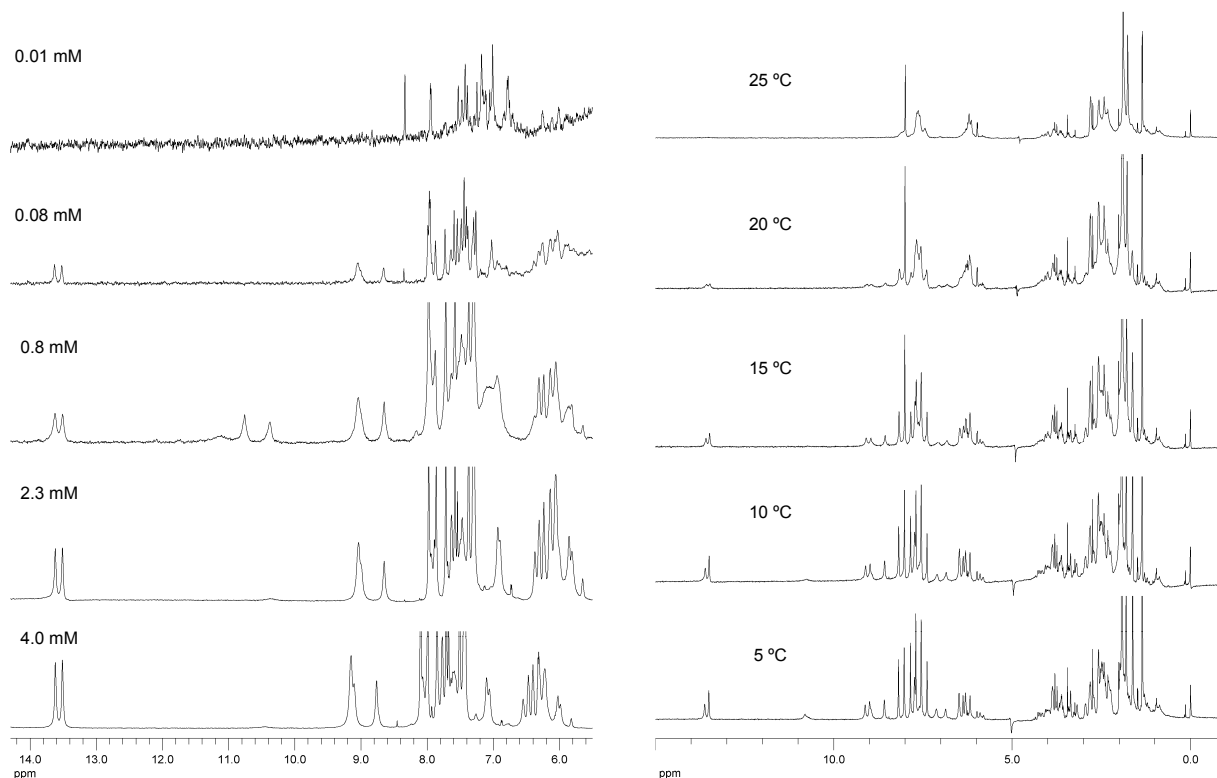


Figura 5.15. Espectres monodimensionals de d(TGCTTCGT) a diferents concentracions (fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 5 °C)

Figura 5.15. Espectres monodimensionals de d(TCGTTGCT) a diferents temperatures (1.2 mM, fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂)

Així doncs, es va decidir prosseguir amb l'estudi de d(TCGTTCGT) (L1) a pH 5, per una banda, i amb l'estudi de d(TGCTTCGT) (L3) i d(TCGTTGCT) (L5), per una altra. Els altres dos oligonucleòtids, d(GTTTCGTTTC) (L2) i d(GTTGCTTC) (L4), els provinents de tallar els corresponents anàlegs cíclics pel motiu, es van descartar per manca d'estructuració específica.

Cal destacar, doncs, que el dicromisme circular no s'ha mostrat gaire útil per triar les seqüències que poden ser més prometedores per a la formació del *bi-loop* i que, en alguns casos, ens pot dur a conclusions enganyoses. El TDS sembla que sí que pot ser una metodologia ràpida, senzilla i bona per a la caracterització del *bi-loop* en solució. Tot i així, la tècnica que ens dóna una informació més fiable és la RMN, encara que només sigui a través dels espectres monodimensionals. Afortunadament, actualment es requereix poca mostra d'oligonucleòtid per dur a terme aquests experiments, gràcies als espectròmetres d'alt camp i als tubs de 3 mm, que requereixen un menor volum. Si les síntesis funcionen bé, una única síntesi automàtica a escala 1 μmol pot permetre dur a terme aquests experiments.

5.4.2 Assignació espectral i informació estructural de d(TCGTTCGT) (L1)

Si ens fixem bé en l'espectre monodimensional de protó (Figura 5.16) i també en els bidimensionals, veiem que tenim no un, sinó dos senyals per sobre de 15 ppm: un senyal molt intens a 15.3 ppm i un altre molt menys intens a 15.4 ppm. Aquests senyals corresponen a dos parells simètrics hemiprotonats $C\cdot C^+$. En aquests parells, les dos citosines estan relacionades per simetria i comparteixen el protó imino HN3, que ressona a camps molt baixos a causa de l'efecte inductiu extra de la càrrega positiva repartida sobre les dues citosines. Els protons amino de les C presenten desplaçaments químics entre 7.5 i 9.5 ppm, que són intermedis entre els d'una citosina neutra (parell WC: 6.8-8.5 ppm) i una de protonada (parell Hoogsteen $C^+\cdot G$: 9-10ppm). Aquests dos trets són característics de les estructures *i-motif*¹⁴⁸.

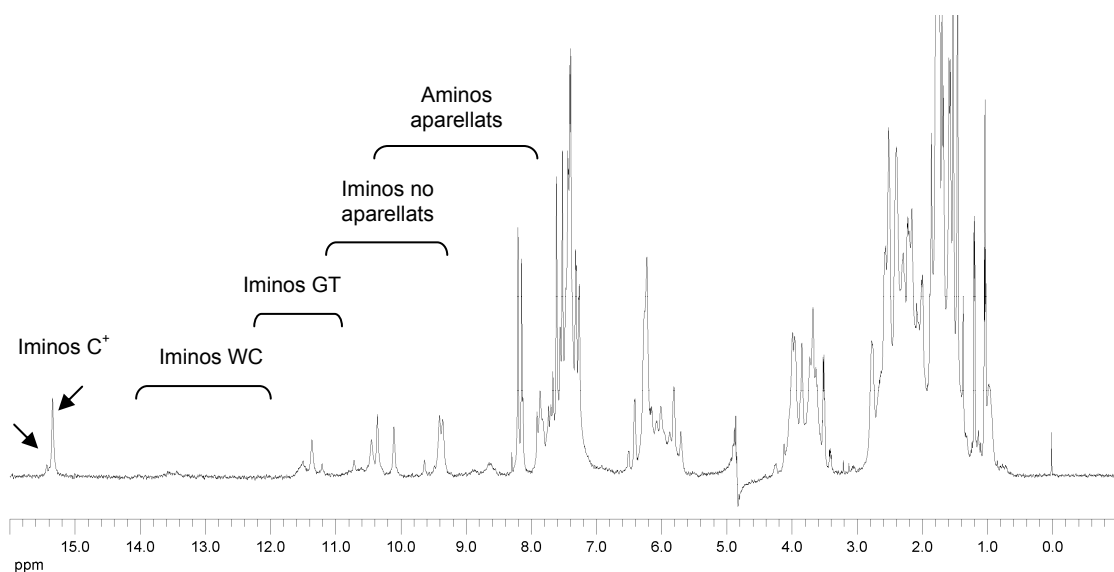


Figura 5.16. Espectre monodimensional de protó de d(TCGTTCGT) (0.8 mM, fosfat sòdic 25 mM pH 5, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 5 °C)

En els espectres bidimensionals NOESY enregistrats en H₂O observem altres característiques que ens poden donar pistes per intentar resoldre l'estructura:

- Dels dos parells C-C⁺, un d'ells només està parcialment format ja que no dona pics de correlació amb els seus aminos.
- Les citosines presenten desplaçaments d'H2' a camps molt alts, per sota d'1 ppm. Els H2" d'aquestes citosines presenten valors normals de 2.2-2.3 ppm. Aquests desplaçaments anòmals d'H2' també s'observen en les citosines dels passos CG de dúplexs paral·lels a pH àcid^{15c,d} i es deuen a que el protó es troba a prop del corrent d'anell de la guanina veïna.
- Per alguns residus, els desplaçaments d'H2' són majors que els d'H2", com ocorre sovint en hèlixs paral·leles¹⁴⁹, i contràriament al que s'acostuma a observar per B-DNA.
- En els espectres enregistrats a pH 7 (τ_m de 300 i 50 ms) s'observen gairebé 16 sistemes de spin, que corresponen a l'espècie estructurada i a la desestructurada. En canvi, a pH 5 (τ_m de 200 i 50 ms) només s'observen 8 sistemes de spin (més algun senyal que sobra).

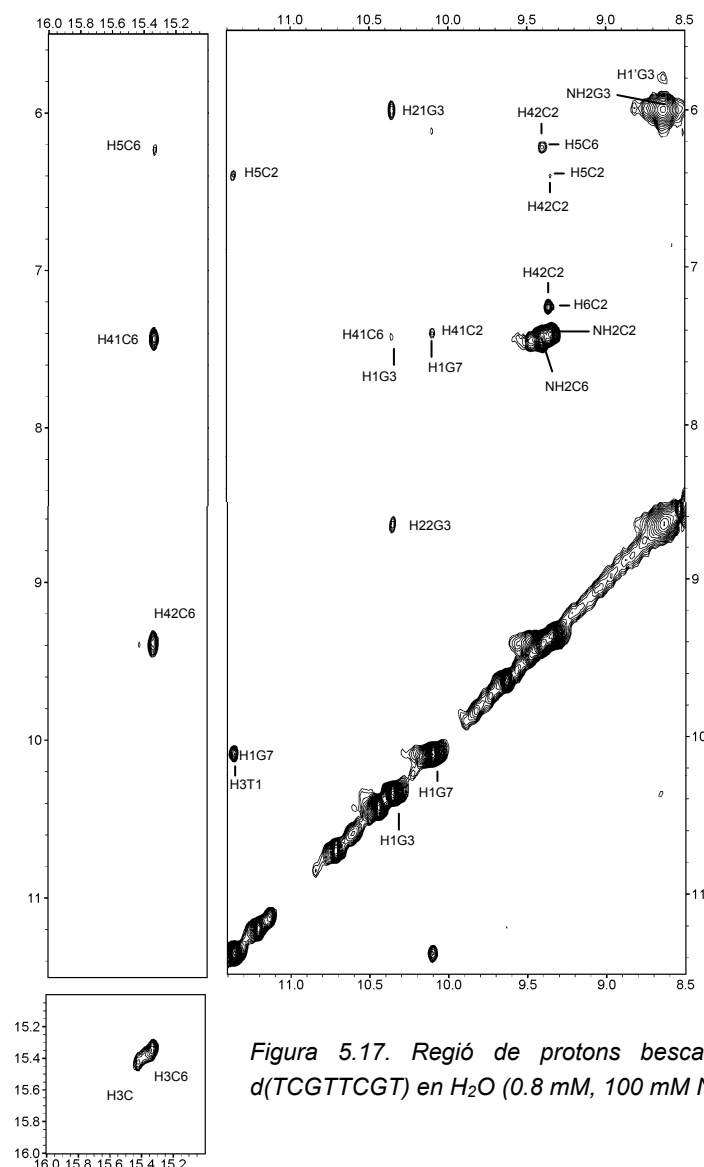


Figura 5.17. Regió de protons bescanviables de l'espectre NOESY (50 ms) de d(TCGTTCGT) en H₂O (0.8 mM, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, pH 5, 5 °C)

- Podem seguir l'assignació seqüencial per T1-C2 i T5-C6 en H2"-H_{Ar} i per C2-G3 i C6-G7 tant en H2'/H2"-H_{Ar} com en H1'-H_{Ar}, amb la particularitat que en H1' el contacte s'observa en els dos sentits, com sol ocorre en el cas de l'*i-motif*¹⁴⁸. Per G3-T4 s'observa el contacte seqüencial en H1'-H_{Ar}, però no observem contacte seqüencial entre G7 i T8. Així doncs, tenim un pas **TCGT** i un **TCG** que s'han pogut assignar específicament als residus de la seqüència. No s'observa cap connectivitat entre T4-T5, fet que ens indica que tenim un trencament de l'estructura helicoïdal, probablement degut a un gir de la cadena.

- Observem dos protons imino a 10.11 i 11.36 ppm que presenten un fort pic de correlació entre ells (Figura 5.17) i han de correspondre als iminos de G i T d'un **parell G-T**. Aquests senyals

s'han assignat a T1 i G7. L'imino de G no dona cap pic de correlació amb els seus aminos, de manera que es dedueix que aquests no estan formant pont d'hidrogen i intercanvien amb el dissolvent.

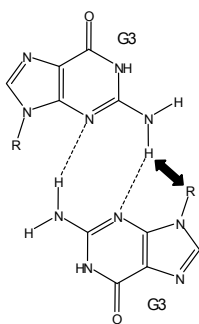
- S'observa un senyal d'un imino a 10.35 ppm, corresponent, en principi, a un imino no aparellat, que dona dos pics de correlació amb un parell d'aminos, un dels quals està formant un pont d'hidrogen (8.64 ppm) i l'altre no (6.00 ppm) i amb un H1' de G. Aquest senyal s'ha assignat a l'imino d'una guanina que forma un **contacte G·G** amb una altra guanina amb la qual es relaciona per simetria. El pic de correlació H1G amb H1'G apareix ja que el contacte entre les guanines té lloc pel solc menor.

- S'observen contactes especials del tipus: T1H3-C2H5, G7H1-C2H41, G3H1-C6H41 i T4Me-G3H22/H8/H1'/H2'/H2" indicant que ha d'existir un apilament d'aquests residus.

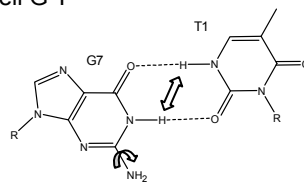
- La intensitat dels pics de correlació H1'-H_A intra residu indica que els angles glicosídics estan en *anti*.

De tota aquesta informació s'ha deduït que es forma un dímer antiparal·lel amb un contacte G3·G3, un parell C·C⁺ de C6 ben definit, parell C·C⁺ de C2 menys definit, i dos parells G7·T1, que no sabem si són inter o intramoleculars. Els residus T4 i T5 formen part d'un llaç del qual no es coneix la disposició. A la Figura 5.18 es mostren els contactes entre bases observats, així com un esquema del què es pensa que podria ser l'estructura d'aquest oligonucleòtid. Aquesta estructura no s'ha resolt ja que no es trobava dins dels objectius d'aquesta tesi, però és interessant i s'abordarà en estudis posteriors. A la Taula 5.2 es mostra l'assignació parcial que s'ha dut a terme per poder extreure la informació estructural a partir dels contactes observats.

Parell G·G



Parell G·T



Parell C·C⁺

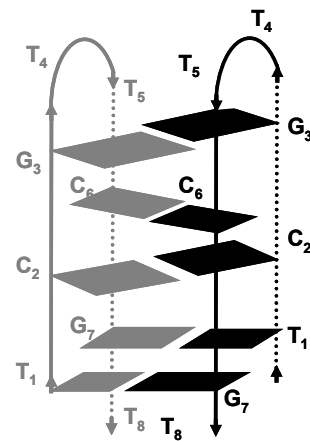
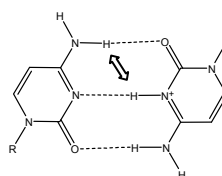


Figura 5.18. Representació esquemàtica del model i parells de bases que s'observen en l'estructura de l'oligonucleòtid d(TCGTTCGT)

Si ens fixem en l'orientació de les cadenes en el model, aquesta és la correcta. Els parells C·C⁺ es formen entre cadenes amb la mateixa orientació, mentre que el següent parell intercalat es forma entre cadenes antiparal·leles a les primeres.

	NH	NH ₂ (2)	NH ₂ (1)	H6/H8	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'
T1	11.36	--	--	7.52	1.79	6.25	2.56	2.39	4.83	n.a.
C2	15.40	9.36	7.42	7.26	6.42	6.23	0.98	2.21	4.70	3.73
G3	10.36	8.64	6.00	8.14	--	5.80	2.76	2.51	4.95	n.a.
T4	**	--	--	7.34	1.51	5.72	1.85	2.02	4.27	n.a.
T5	**	--	--	7.61	1.74	6.11	2.40	2.52	n.a.	n.a.
C6	15.34	9.40	7.44	7.30	6.24	6.21	0.95	2.27	4.68	4.46
G7	10.10		n.o.	8.20	--	5.69	2.78	2.50	4.96	n.a.
T8	**	--	--	7.42	1.56	6.14	2.41/1.97		n.a.	n.a.

** Els protons imino de T4, T5 i T8 ressonen a 10.44, 10.71 i 11.21, però no s'ha pogut assignar quin és quin. n.o.=no observat. n.a.=no assignat

Taula 5.2. Taula d'assignació de *d*(TCGTTTCGT) a 5 °C (fosfat sòdic 25 mM pH 5, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂)

En el nostre grup de recerca, dins del projecte d'intentar trobar uns requeriments per la formació del *bi-loop*, s'estan estudiant oligonucleòtids cíclics 6 mer i 10 mer per veure si es pot formar el motiu dimèric amb llaços d'1 o 3 residus, respectivament. En el curs d'aquest estudi, s'ha observat que el decàmer *d*<pCGTTTCGTTT> no s'estructura en forma de *bi-loop* sinó que forma un dímer amb parells C·C⁺ intercalats i dues tètredes de solc menor GTGT desplaçades, com l'observada en el capítol anterior (Figura 5.19).

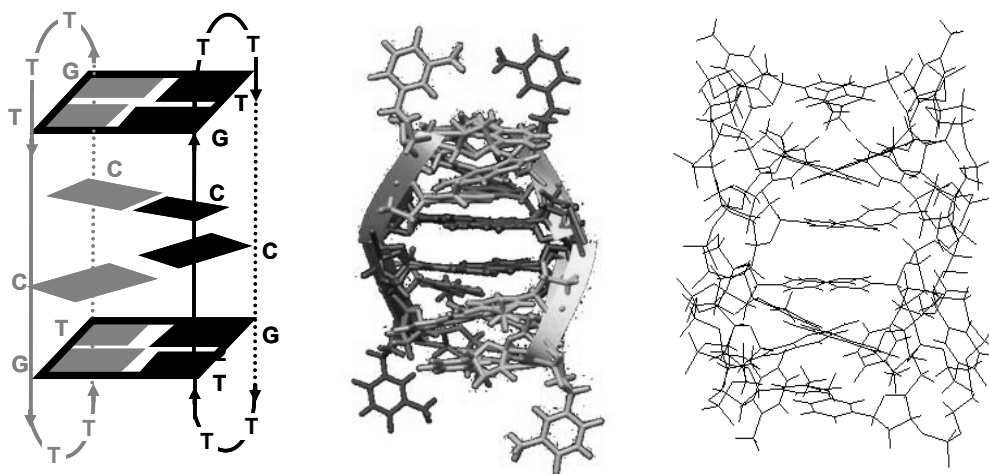


Figura 5.19. Estructura model de *d*<pCGTTTCGTTT>¹⁵⁰

L'estructura no és del tot igual a la proposada per a l'octàmer lineal *d*(TCGTTTCGT), però sí que presenta certes similituds, com són els dos passos C·C⁺ i els contactes G·G i G·T. En el cas de l'octàmer no es pot formar la tètreda GTGT perquè només tenim dues T en el *loop*. Aquestes similituds queden reflectides en els espectres de dicromisme circular de l'octàmer lineal i el decàmer cíclic, que són altament semblants. Els espectres presenten un màxim a 263 nm i un segon màxim, però d'intensitat molt petita, a 301 nm (Figura 5.20), associat a la formació dels parells C·C⁺, ja que desapareix en augmentar el pH.

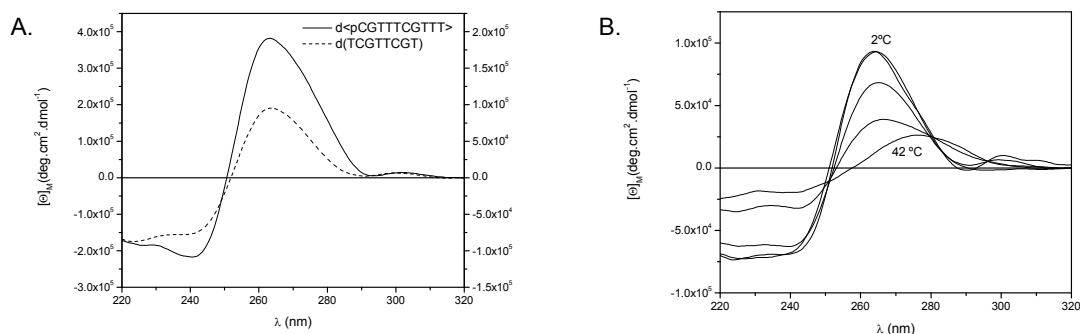


Figura 5.20. Espectres de dicroisme circular de *d*(TCGTTGCT) (0.66 mM, NaOAc 25 mM pH 4.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 °C). A. Comparació amb l'espectre de *d*<pCGTTTCGTTT> (0.050 mM, NaOAc 20 mM pH 4.5, 200 mM NaCl, 2 °C). B. Espectres a diferents temperatures (2-42 °C cada 10 °C).

5.4.3 Assignació espectral de *d*(TGCTTCGT) (L3) i *d*(TCGTTGCT) (L5)

L'assignació de *d*(TGCTTCGT) i *d*(TCGTTGCT) s'ha dut a terme en espectres enregistrats a concentració 4 mM i 1.2 mM, respectivament. Per a *d*(TGCTTCGT) ha estat necessari arribar a una major concentració per evitar la presència de senyals de l'espècie monomèrica desestructurada.

L'assignació quasi total (excepte alguns H5'/H5'' i alguns iminos de les T dels llaços) s'ha dut a terme mitjançant els contactes seqüencials típics d'hèlix dextrogires descrits en l'apartat 1.4.2 de fonaments i tenint en compte que aquests contactes es perden en el *bi-loop* en els residus del llaç, tal i com s'ha explicat en la introducció. Així doncs, s'han pogut seguir els passos T1-G2-C3-T4 i C6-G7-T8 per *d*(TGCTTCGT) i C2-G3-T4 i G6-C7-T8 per *d*(TCGTTGCT). Per a les T en la segona posició del *loop* (T5) s'observen alguns contactes amb les bases de la tètrada superior.

L'assignació s'ha pogut realitzar sense problema i s'ha pogut comparar amb la del corresponent anàleg cíclic; les diferències en els desplaçaments químics dels protons dels residus aparellats són mínimes (<0.15 ppm) i la resta de protons també presenten desplaçaments molt semblants.

	NH	NH ₂ (2)	NH ₂ (1)	H6/H8	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'H5''	
T1	n.o.	-	-	7.72	1.93	6.41	2.48	2.62	4.90	4.30	3.89	n.a.
G2	13.52	9.11	6.04	8.11	-	6.25	2.77	2.99	5.04	4.62	4.06	4.19
C3	-	8.77	6.55	7.45	5.38	6.31	2.35	2.44	5.00	4.34	4.08	n.a.
T4	**	-	-	7.52	1.66	5.99	1.90	2.41	4.71	3.76	n.a.	
T5	n.o.	-	-	7.86	1.94	6.48	2.32	2.54	4.64	n.a.	3.91	4.21
C6	-	9.13	7.12	7.78	6.03	6.32	2.26	2.72	4.96	4.36	n.a.	
G7	13.63	9.16	7.08	8.00	-	6.22	2.83	2.54	5.16	4.81	4.23	4.35
T8	**	-	-	7.43	1.86	5.83	1.92	2.27	4.33	3.61	3.41	3.75

** Els protons imino de T4 i T8 ressonen a 10.47 i 10.83 ppm, però no s'ha pogut assignar quin és quin. n.o.=no observat. n.a.=no assignat

Taula 5.3. Taula d'assignació de *d*(TGCTTCGT) a 1 °C (fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂)

	NH	NH ₂ (2)	NH ₂ (1)	H6/H8	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'H5''	
T1	n.o.	-	-	7.71	1.91	6.38	2.47	2.58	4.87	4.27	3.88	n.a.
C2	-	9.01	6.88	7.74	5.99	6.32	2.25	2.72	5.01	4.33	4.15	n.a.
G3	13.63	8.99	7.15	8.04	-	6.31	2.84	2.53	5.12	5.00		n.a.
T4	**	-	-	7.39	1.81	5.90	1.93	2.39	4.66	3.36	3.18	3.63
T5	n.o.	-	-	7.85	1.93	6.49	2.30	2.51	4.58	4.02		n.a.
G6	13.51	9.13	5.88	8.19	-	6.19	2.82	2.95	5.03	4.62	4.23	4.06
C7	-	8.59	6.53	7.55	5.46	6.18	2.43	2.58	4.98	4.29	4.43	n.a.
T8	**	-	-	7.56	1.62	5.80	2.33	1.98	4.40	3.81		n.a.

** Els protons imino de T4 i T8 ressonen a 10.42 i 10.90 ppm, però no s'ha pogut assignar quin és quin. n.o.=no observat. n.a.=no assignat

Taula 5.4. Taula d'assignació de *d*(TCGTTGCT) a 1 °C (fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂)

A la Figura 5.21 es mostren diverses regions de l'espectre NOESY de *d*(TCGTTGCT) (L5), on es pot seguir el camí d'assignació i veure els contactes típics de parells WC entre els protons bescanviables.

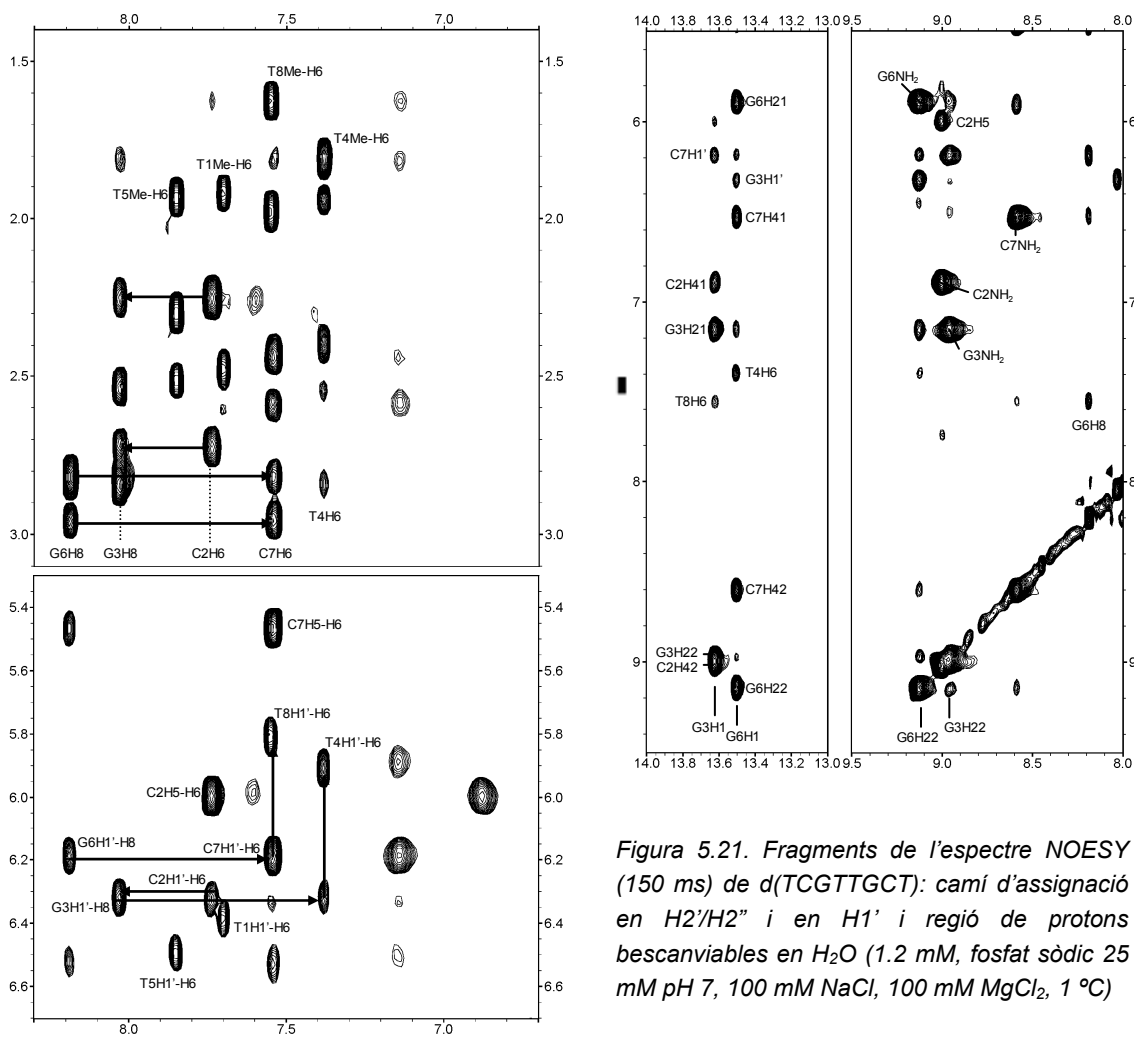


Figura 5.21. Fragments de l'espectre NOESY (150 ms) de *d*(TCGTTGCT): camí d'assignació en H2'/H2'' i en H1' i regió de protons bescanviables en H₂O (1.2 mM, fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 1 °C)

5.4.4 Càlcul de les estructures de d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT)

Com s'ha dit en els fonaments, l'habilitat d'obtenir bones estructures depèn de la quantitat, exactitud i distribució de les restriccions. Per tant, cal assignar el major nombre de senyals de correlació dels experiments NOESY i integrar-les per extreure'n les distàncies NOE. En el cas de les espècies dimèriques, la conversió del pic NOE en restricció de distància no és directa, degut a l'ambigüitat de si un pic NOE correspon a una distància intra o intermolecular. En el nostre cas, tenim la sort de disposar de l'estructura de l'anàleg cíclic, sobre la qual podem veure les distàncies entre dos àtoms determinats i decidir si el pic NOE que observem pot correspondre a un contacte intra o intermolecular. A més a més, al tractar-se d'una molècula petita, podem realitzar càlculs ràpids de l'estructura amb el programa DYANA utilitzant diferents combinacions de restriccions i/o anant introduint noves restriccions en cada cicle de càlcul. Les estructures dels *bi-loops* anteriors i altres estructures de molècules simètriques¹⁵¹ s'han resolt també a través de la inspecció d'un model preliminar i assajant diferents assignacions de les restriccions.

Les intensitats dels pics NOE es converteixen en restriccions de distància qualitatives amb la rutina CALIBA del paquet de DYANA. Posteriorment, s'eliminen les distàncies no significatives (per exemple, de distàncies intraresidu de l'anell de ribosa només es conserven $d_i(2''; 4')$ i $d_i(1'; 4')$) i la resta s'assignen a contactes intra o intermoleculars a partir d'una inspecció del model de l'anàleg cíclic, tot i anant realitzant càlculs ràpids amb DYANA fins a què s'arriba a tenir una llista de restriccions de distància superiors consistentes, que donen lloc a unes estructures preliminars acceptables. Si es troben restriccions molt violades, bé per estar violades en totes les estructures o per presentar valors molt diferents entre la restricció i el valor real en algunes d'elles, cal revisar l'assignació i la posterior integració, ja que segurament existeix algun error que cal corregir. En el cas de pics NOE que puguin tenir contribució de component intramolecular i també intermolecular, aquests no s'han utilitzat en el càlcul. En aquestes llistes de restriccions també s'hi inclouen: restriccions de distància entre les bases que sabem que s'aparellen mitjançant enllaços d'hidrogen i restriccions "falses" per tancar els anells de ribosa, ja que el programa DYANA treballa en l'espai d'angles de torsió i considera una cadena lineal. Per aquest mateix motiu, en el cas d'estructures dimèriques cal incloure una cadena llarga de residus que fan de *linker* entre les dues unitats i que no interfereixen en l'estructura final ja que poden adoptar tots els angles de torsió possibles. Això sí, cal introduir un nombre suficient d'aquests residus *linker* per assegurar-nos que les dues subunitats poden estar en qualsevol posició relativa. Els càlculs amb DYANA es comencen amb estructures generades a l'atzar. El protocol utilitzat es descriu a l'apartat 5.5.2.1 de la part experimental. Així vam obtenir un conjunt de 10 estructures preliminars per a cada oligonucleòtid.

Per tal de refinar les estructures, es va procedir a obtenir un conjunt de restriccions de distància precises mitjançant el programa MARDIGRAS, que usa la teoria de la matriu completa de relaxació. Per estimar els errors de les distàncies resultants, els càlculs es van realitzar emprant les intensitats NOE d'espectres adquirits amb tres temps de mescla diferents, partint de tres estructures preliminars diferents i suposant tres temps de correlació molecular isòtrops ($3 \times 3 \times 3 = 27$ càlculs per cada oligonucleòtid). Com a resultats d'aquests càlculs es van obtenir cotes superiors i inferiors per a les

restriccions de distància.

A les taules 5.5 i 5.6 es resumeixen les restriccions de distància en funció del tipus de protó i tipus de restricció. Les restriccions intramoleculares es divideixen en: intraresidu, seqüencials (entre residus veïns a la seqüència) i de rang major que u (entre residus separats per més d'un nucleòtid). Els contactes intermoleculares són bàsicament entre protons bescanviables (s'hi inclouen tots els contactes en què almenys un protó és bescanviable). En les figures 5.22 i 5.23 es pot visualitzar una representació esquemàtica de com es distribueixen aquestes restriccions.

En els dos casos, tant per a l'oligonucleòtid d(TGCTTCGT) com per a d(TCGTTGCT), el nombre de restriccions és força elevat, al voltant de 20 restriccions per nucleòtid. El major nombre de restriccions per a d(TCGTTGCT) prové d'haver inclòs en aquest cas contactes dels protons H5'/H5", com a pseudoàtoms Q5'. En el cas de d(TGCTTCGT) no es van incloure perquè l'assignació i/o la integració no estava tan clara.

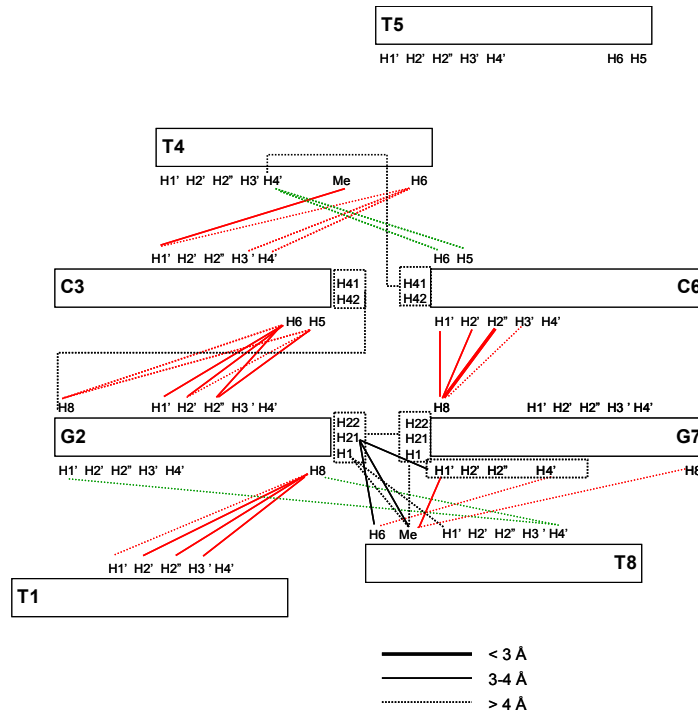
Tipus protó	Contactes intrasubunitat			Contactes intersubunitat	TOTAL
	Intraresidu	Seqüencial	Rang >1		
No bescanviable	62x2	22x2	4x2	4x2	184
Bescanviable	14x2	4x2	14x2	35x2	134
TOTAL	152	52 240	36	78	318

Taula 5.5. Resum de les distàncies interprotòniques emprades en el càlcul de l'estructura de d(TGCTTCGT)

Tipus protó	Contactes intrasubunitat			Contactes intersubunitat	TOTAL
	Intraresidu	Seqüencial	Rang >1		
No bescanviable	75x2	23x2	6x2	4x2	218
Bescanviable	16x2	4x2	13x2	27x2	118
TOTAL	182	54 274	38	62	336

Taula 5.6. Resum de les distàncies interprotòniques emprades en el càlcul de l'estructura de d(TCGTTGCT)

Les llistes amb distàncies precises obtingudes amb MARDIGRAS es van emprar per calcular unes noves estructures preliminars amb DYANA. Amb les 10 estructures amb valors més petits de la funció blanc i les llistes de restriccions precises es va procedir a realitzar els càlculs de dinàmica molecular restringida (RMD) en l'espai de coordenades cartesianes, amb el mòdul SANDER del paquet d'AMBER¹⁵², versió 7.0. Per a aquests càlculs, ja no calen els residus *linkers* ni les restriccions per mantenir els anells de ribosa tancats. Primer de tot es realitza un refinament al buit introduint contraions Na⁺ hexahidratats. Posteriorment es realitza un segon refinament en què s'introdueix l'aigua com a solvent explícit. Finalment, es promitgen els 10 últims picosegons de les trajectòries i es minimitzen les estructures. El protocol detallat es troba a l'apartat 5.5.2.2 de la part experimental.



En vermell, contactes seqüencials, en verd, contactes rang >1; en negre, contactes que impliquen protons bescanviables

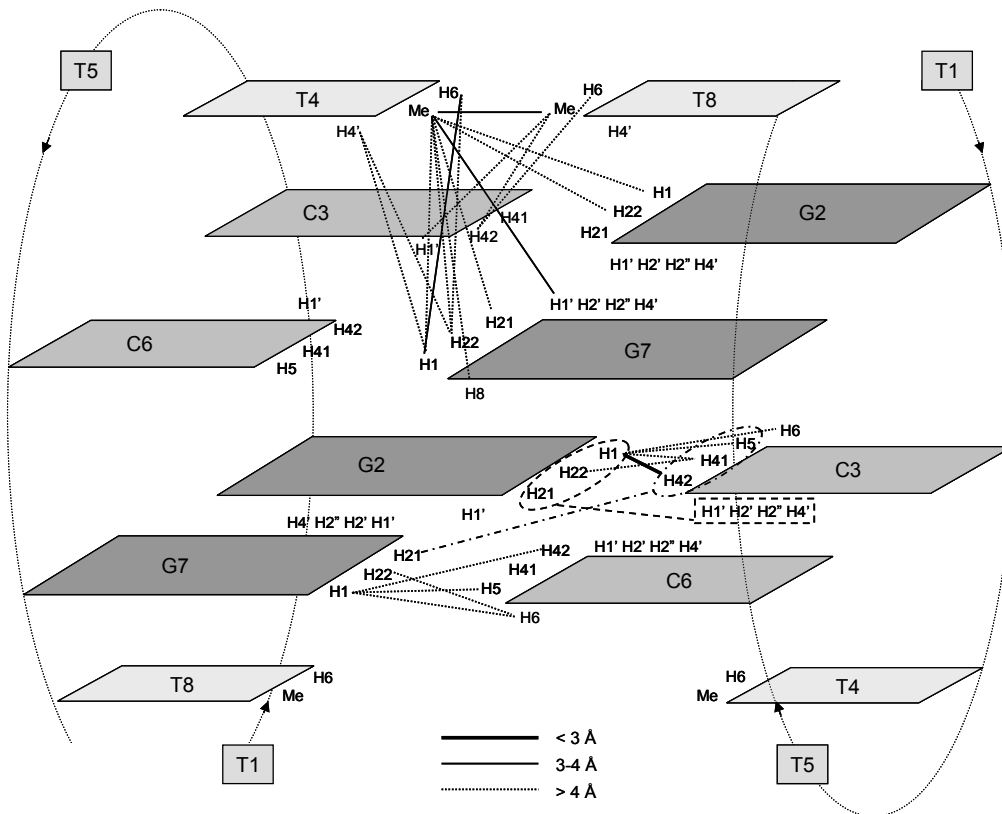
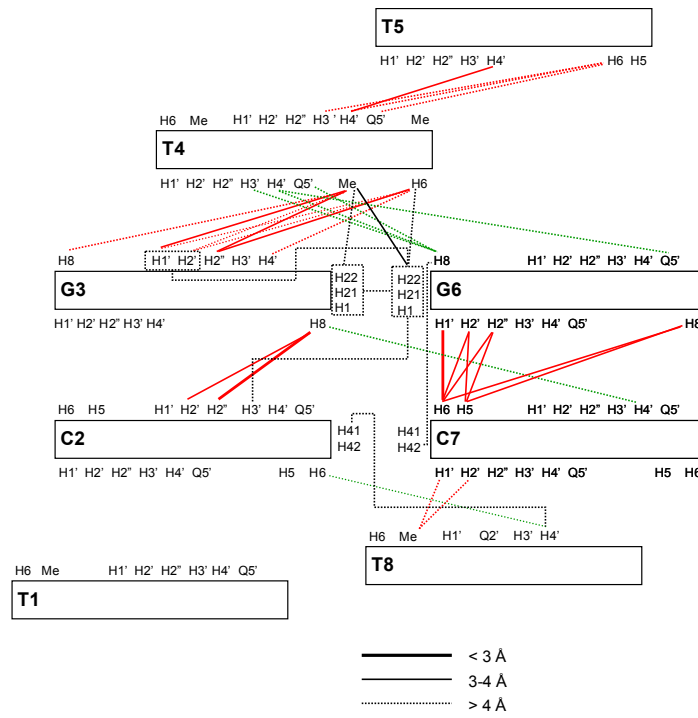


Figura 5.22. Representació esquemàtica de les restriccions intra i intersubunitat de d(TGCTTCGT)



En vermell, contactes seqüencials, en verd, contactes rang >1; en negre, contactes que impliquen protons bescanviables

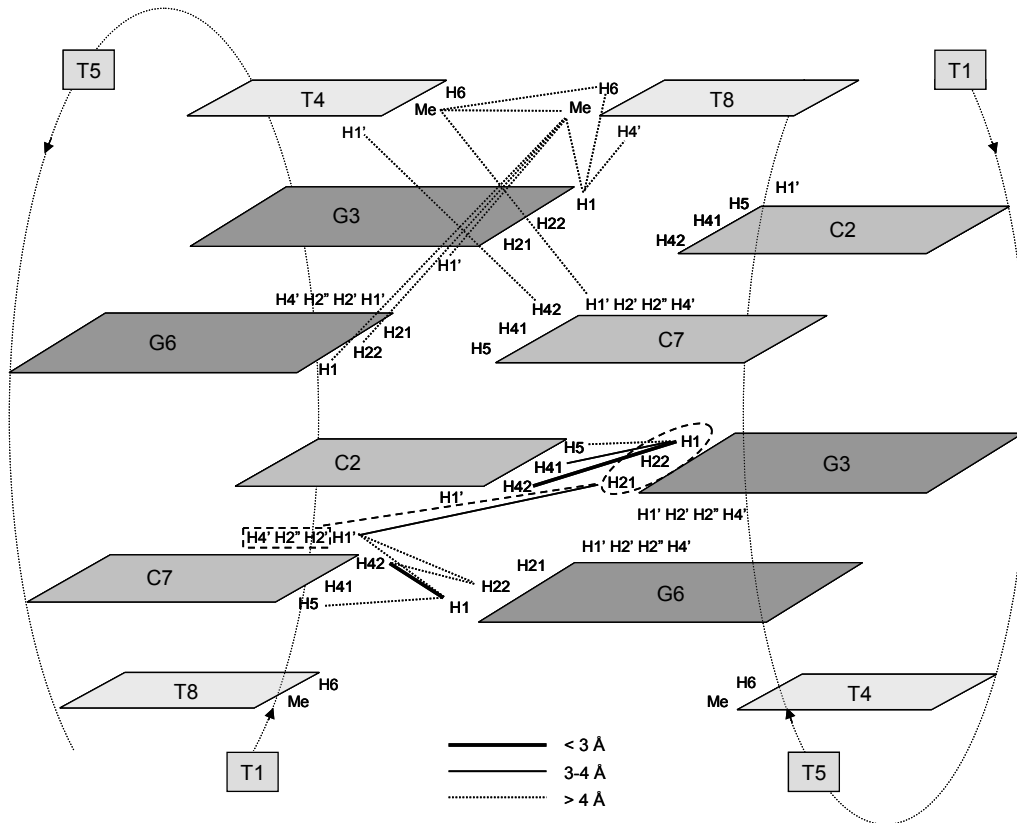


Figura 5.23. Representació esquemàtica de les restriccions intra i intersubunitat de d(TCGTTGCT)

Com es mostra a les taules 5.7 i 5.8, les estructures resultants del refinament presenten poques violacions de distància i valors d'energies finals baixos. La part no experimental d'aquestes energies, amb valors baixos i similars entre sí en totes les estructures, indica que el potencial teòric és compatible amb les restriccions de distància i que no s'introdueixen distorsions importants en l'estructura per satisfer-les.

Estructura	Etotal (kcal/mol)	Ebond	Eangle	Edihedral	EVdW	Eele	Eexp	Σ viol (Å)	Viol. Màx (Å)
1	-1067	21	97	286	-198	-864	28	6.59	0.38
2	-878	22	88	282	-220	-643	29	7.49	0.38
3	-1045	19	93	280	-202	-817	27	7.10	0.39
4	-1144	19	93	285	-194	-932	30	7.20	0.49
5	-1047	18	96	283	-185	-846	26	6.99	0.35
6	-1337	23	106	293	-162	-1176	26	6.70	0.36
7	-1146	21	100	280	-175	-955	27	6.69	0.36
8	-1086	18	90	283	-210	-859	29	7.57	0.38
9	-988	20	102	284	-212	-771	28	6.87	0.36
10	-1076	18	97	287	-191	-882	26	6.76	0.36
Promig	-1081±118	20±2	96±6	284±4	-195±18	-874±137	28±1	7.00±0.04	0.38±0.34

Taula 5.7. Valors d'energia i violacions de distància per a les 10 estructures refinades de d(TGCTTCGT)

Estructura	Etotal (kcal/mol)	Ebond	Eangle	Edihedral	EVdW	Eele	Eexp	Σ viol (Å)	Viol. Màx (Å)
1	-1314	21	95	285	-154	-1159	42	8.09	0.49
2	-1302	24	98	281	-152	-1147	38	7.75	0.49
3	-1297	19	104	283	-163	-1134	40	7.98	0.49
4	-1290	22	102	281	-176	-1109	39	7.49	0.51
5	-1214	22	104	294	-188	-1033	38	7.99	0.43
6	-1456	20	99	288	-135	-1325	42	8.10	0.50
7	-1414	18	97	294	-150	-1259	41	8.01	0.58
8	-1348	24	104	279	-159	-1173	41	8.09	0.47
9	-1179	19	105	284	-176	-1001	43	8.34	0.45
10	-1119	19	97	280	-184	-927	39	8.31	0.47
Promig	-1293±102	21±2	101±4	285±5	-164±17	-1127±118	39±2	8.00±0.25	0.49±0.04

Taula 5.8. Valors d'energia i violacions de distància per a les 10 estructures refinades de d(TCGTTGCT)

5.4.5 Anàlisi de les estructures de d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT)

A les figures 5.24 i 5.25 es mostra la superposició de les 10 estructures finals dels dímers. Gràcies a la quantitat i precisió de restriccions, aquestes estructures estan força ben definides, com s'observa gràficament i s'aprecia pels valors de RMSD (Taula 5.9). Com és habitual en les estructures d'àcids nucleics obtingudes mitjançant RMN i RMD, les bases estan millor definides que l'esquelet. Tot i així, com succeeix per a la resta de *bi-loops*, les bases de la segona posició del *loop*, exposades al dissolvent, estan poc definides, degut a una manca de restriccions per aquests residus. En aquest cas, a més a més, en tractar-se d'oligonucleòtids lineals, els extrems són més flexibles i, per tant, apareixen més desordenats, especialment l'extrem 5', ja que el residu de l'extrem 3' es troba apilat fent de tapa.

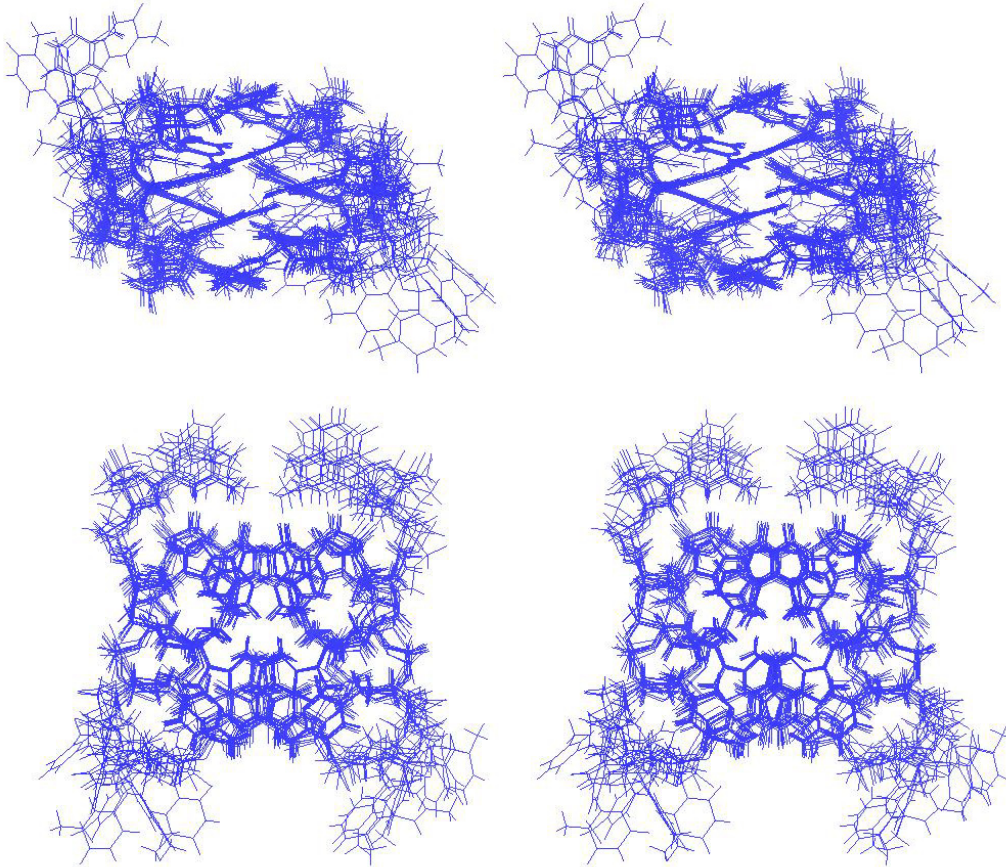


Figura 5.24. Vistes estereoscòpiques laterals i superiors de la superposició de les 10 estructures resultants del dímer de d(TGCTTCGT)

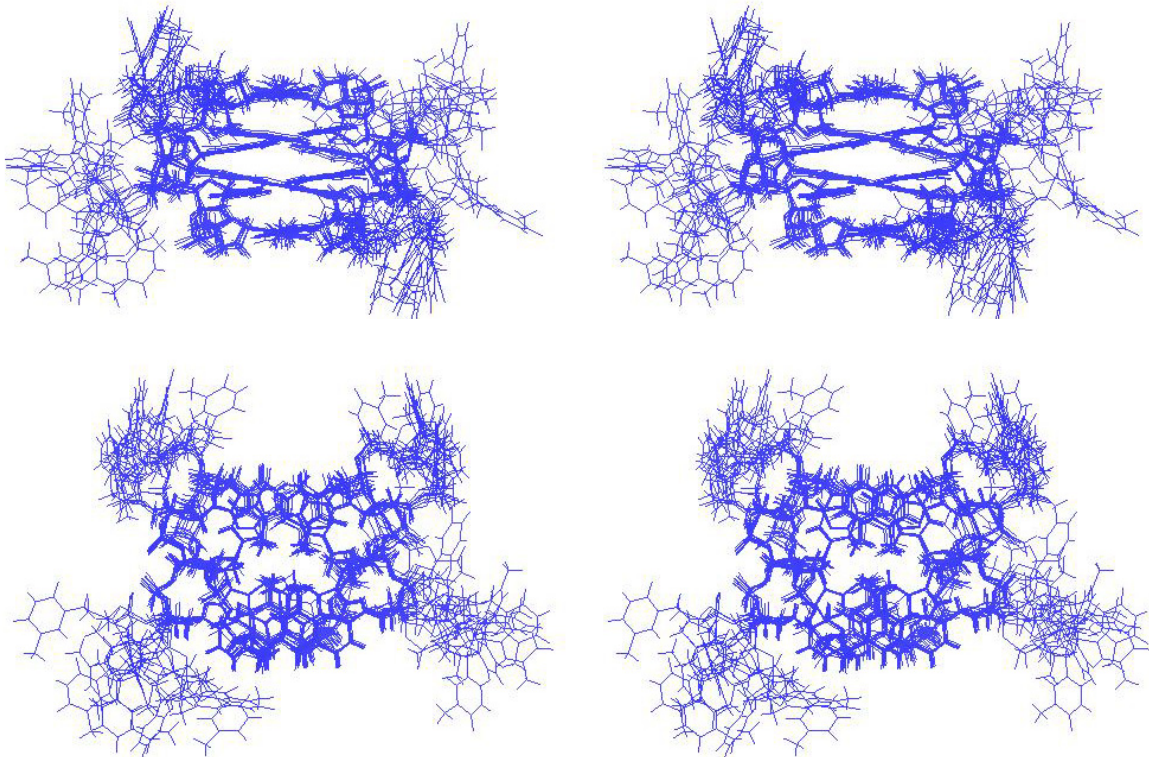


Figura 5.25. Vistes estereoscòpiques laterals i superiors de la superposició de les 10 estructures resultants del dímer de d(TCGTTGCT)

Els valors de RMSD es troben dins dels esperats. Per a les bases dels residus ben definits, aquests valors són extremadament petits. Quan hi incorporem tots els àtoms pesats d'aquests residus, els valors de RMSD augmenten, com és lògic, però situant-se encara per sota d'1Å. Si considerem tots els àtoms pesats aquests valors són molt majors degut als residus de la segona posició del llaç, que es troben majoritàriament desordenats.

Àtoms considerats	d(TGCTTCGT)	d(TCGTTGCT)
Bases ben definides*	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Àtoms pesats ben definits*	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Tots els àtoms pesats	2.3 ± 0.5	2.7 ± 0.6

* tots els residus excepte 1, 5, 9 i 13.

Taula 5.9. Valors mitjos de la RMSD entre les 10 estructures finals per a cada dímer

Les estructures s'analitzen calculant-ne els valors d'angles de torsió, angle i amplitud de pseudorotació de l'anell de ribosa i paràmetres helicoidals pels apilaments de les bases. Aquests càlculs es realitzen amb el propi programa de visualització MOLMOL¹⁵³ o amb el programa CURVES¹⁰⁵.

5.4.5.1 Anàlisi dels angles de torsió

Els valors dels angles de torsió promig per a cada residu de les estructures dimèriques es mostren en les taules 5.10 i 5.11. Els valors promig corresponen a la mitjana geomètrica i s'utilitza el paràmetre d'ordre¹⁵⁴ (S) com a indicador del grau de definició: S=1 indica que l'angle està perfectament definit i és el mateix en totes les estructures, mentre que S=0 indicaria una distribució totalment aleatòria d'aquest angle de torsió.

Nt	α		β		γ		δ		ϵ		ζ		χ	
	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre
T1	--	--	--	--	138.2	0.35	128.2	0.90	-91.7	0.99	--	--	-42.2	1.00
G2	-161.0	0.13	-178.1	0.97	82.3	0.25	133.6	0.95	139.5	0.47	-83.6	0.97	-106.1	1.00
C3	-105.0	0.75	-177.9	1.00	47.5	1.00	99.5	0.97	-81.6	0.59	-52.2	0.30	-126.6	1.00
T4	-31.4	0.58	125.4	0.74	23.7	0.87	84.2	0.99	-108.0	0.29	122.7	0.54	-167.1	0.99
T5	7.2	0.26	143.0	0.73	-149.0	0.52	114.8	0.92	-129.4	0.48	122.5	0.42	-99.4	0.96
C6	91.0	0.54	-167.0	0.87	179.4	0.82	88.2	0.99	66.7	0.67	125.0	0.16	-123.3	1.00
G7	-143.6	0.68	-172.6	0.86	42.8	0.99	93.1	0.96	-27.6	0.62	51.6	0.64	-114.7	0.99
T8	-139.3	0.67	-162.0	0.71	41.1	0.83	100.5	1.00	--	--	76.3	0.45	-153.8	1.00
T9	--	--	--	--	159.2	0.43	129.5	0.71	-87.3	0.99	--	--	-42.2	1.00
G10	56.5	0.71	-173.0	0.90	-160.4	0.84	145.0	0.99	169.1	0.71	-89.0	0.96	-104.3	1.00
C11	-88.4	0.82	178.3	1.00	48.1	1.00	106.6	1.00	-88.1	0.99	-82.0	0.61	-126.5	1.00
T12	-50.5	0.69	131.1	0.78	36.0	1.00	85.0	1.00	-108.7	0.50	126.2	0.93	-171.2	1.00
T13	44.6	0.55	-175.7	0.56	-141.3	0.33	106.8	0.86	-149.4	0.82	100.7	0.56	-104.2	0.97
C14	67.0	0.63	-175.5	0.93	173.9	0.65	92.1	0.99	119.6	0.35	110.9	0.54	-122.7	1.00
G15	-110.7	0.61	-174.0	0.88	43.5	0.99	96.0	0.97	-45.9	0.65	-11.4	0.37	-118.6	0.99
T16	-113.0	0.76	-156.1	0.85	47.8	0.87	98.9	1.00	--	--	82.4	0.64	-155.6	1.00

Taula 5.10. Valors promig dels angles de torsió del dímer de d(TGCTTCGT)

Nt	α		β		γ		δ		ϵ		ζ		χ	
	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre	Promig	Paràm. d'ordre
T1			-131.2	0.12	-159.7	0.73	102.5	0.98	-109.9	0.73			-123.6	0.99
C2	94.7	0.37	146.9	0.36	-116.9	0.44	108.8	1.00	-179.5	0.99	101.8	0.41	-112.1	1.00
G3	-78.6	0.99	171.1	0.99	54.6	0.99	100.6	0.99	-98.3	0.72	-95.3	1.00	-143.8	1.00
T4	10.5	0.33	-176.2	0.97	118.5	0.18	154.0	0.99	-120.4	0.90	144.0	0.70	-152.1	0.99
T5	-32.3	0.44	165.6	0.54	160.5	0.64	122.2	0.98	-59.2	0.57	63.5	0.81	-84.5	0.97
G6	-59.5	0.39	-118.9	0.47	-58.3	0.70	134.1	0.99	168.1	0.84	34.4	0.26	-105.4	1.00
C7	-80.8	0.22	177.0	0.95	94.5	0.48	77.0	0.99	171.9	0.99	-84.6	0.83	-143.6	1.00
T8	-51.1	1.00	-167.7	0.99	47.3	0.99	85.4	0.99			-105.6	0.99	-159.8	1.00
T9			92.7	0.34	-177.2	0.54	101.2	0.98	-114.5	0.79			-123.6	1.00
C10	86.3	0.37	168.0	0.44	-133.5	0.32	108.7	0.99	-178.3	0.81	-34.0	0.22	-113.3	0.99
G11	-83.6	0.90	171.0	0.97	55.5	0.98	97.9	0.99	-109.3	0.66	-92.7	0.81	-141.4	1.00
T12	-17.8	0.38	-175.4	0.97	78.4	0.28	150.3	0.99	-116.6	0.73	157.4	0.60	-151.7	0.99
T13	-4.0	0.30	134.0	0.61	144.7	0.46	119.5	0.94	-83.4	0.44	48.7	0.63	-89.1	0.96
G14	-75.2	0.34	-137.8	0.58	-43.6	0.70	137.0	1.00	173.7	1.00	38.3	0.30	-108.2	1.00
C15	-65.4	0.99	165.4	1.00	51.2	0.99	76.4	1.00	173.9	0.99	-86.7	1.00	-139.9	1.00
T16	-46.4	0.86	-168.0	0.99	37.5	0.86	89.8	0.96			-106.0	0.98	-155.7	0.99

Taula 5.11. Valors promig dels angles de torsió del dímer de d(TCGTTGCT)

Com és habitual, l'angle glicosídic i l'angle de l'anell del sucre (δ) estan més ben definits que no pas la resta d'angles de torsió de l'esquelet. En general, els residus que formen el nucli del *bi-loop* presenten valors d'angles dins dels esperats per a un B-DNA: *sc⁻* per α (de -50 a -60°), *anti* per β (sobre 150°), *sc⁺* per γ (40 a 60°), *anti* per ϵ (150 a 220°), *anti* per δ (al voltant de 150°), *sc⁻* per ζ (-60 a -100°) i *anti* per l'angle glicosídic χ . Els residus del *loop* presenten alguns valors especials degut al gir de la cadena, com valors *anti* de γ tant pel segon residu del *loop* com pel primer residu de l'*stem*. A més a més, en general, pels residus del *loop* els paràmetres d'ordre són més baixos.

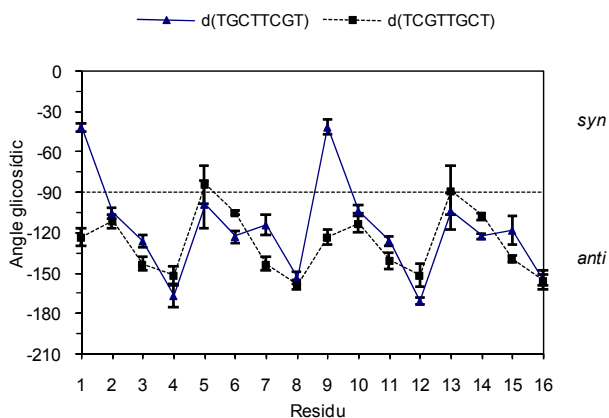


Figura 5.26. Representació de la variació de l'angle glicosídic en funció del residu

L'angle glicosídic (veure Figura 5.26) es troba majoritàriament en *anti*, però amb valors que oscil·len segons la posició del residu. Així, els primers residus aparellats (2,6,10 i 14) presenten valors al voltant de -100° , mentre que els residus en la segona posició de l'*stem* (3,7,11 i 15) presenten valors més negatius (de -115 a -145°). Respecte als residus del *loop*, els de la primera posició (4,8,12 i 16) presenten valors al voltant de -150° i els de la segona (1,5,9 i 13) mostren valors d'angles inferiors. És curiós que per al dímer de d(TGCTTCGT), els residus 1 i 9 (mateix residu de cada unitat del dímer) presenten un valor de -42.2° , que correspon a una orientació *syn* de l'enllaç glicosídic.

5.4.5.2 Conformació de l'anell de ribosa

A la Taula 5.12 es mostren els valors dels angles de pseudorotació, amb la seva amplitud i la conformació que representen. A la Figura 5.27 es representa la variació de l'angle de pseudorotació al llarg de la seqüència.

Nt	Angle de pseudorotació	Amplitud	Conformació	Nt	Angle de pseudorotació	Amplitud	Conformació
T1	139 ± 15	44	C1'-exo,C2'-endo	T1	82 ± 18	38	O4'-endo
G2	173 ± 38	31	C2'-endo,C3'-exo	C2	153 ± 44	43	C2'-endo
C3	86 ± 12	35	O4'-endo	G3	72 ± 16	29	O4'-endo,C4'-exo
T4	53 ± 22	38	C4'-exo	T4	162 ± 6	46	C2'-endo
T5	137 ± 80	34	--	T5	293 ± 6	32	O4'-exo,C1'-endo
C6	88 ± 10	39	O4'-endo	G6	219 ± 8	43	C3'-exo,C4'-endo
G7	77 ± 12	38	O4'-endo,C4'-exo	C7	40 ± 5	32	C4'-exo,C3'-endo
T8	46 ± 10	21	C4'-exo	T8	36 ± 14	32	C3'-endo,C4'-exo
T9	144 ± 5	44	C2'-endo,C1'-exo	T9	94 ± 23	34	O4'-endo
G10	189 ± 9	33	C3'-exo	C10	170 ± 42	44	C2'-endo
C11	93 ± 5	35	O4'-endo	G11	66 ± 19	34	C4'-exo,O4'-endo
T12	63 ± 8	38	C4'-exo	T12	160 ± 6	42	C2'-endo
T13	125 ± 61	35	--	T13	282 ± 76	39	--
C14	90 ± 12	38	O4'-endo	G14	208 ± 16	39	C3'-exo
G15	79 ± 14	37	O4'-endo,C4'-exo	C15	42 ± 13	34	C4'-exo,C3'-endo
T16	44 ± 17	22	C4'-exo,C3'-endo	T16	50 ± 15	34	C4'-exo

Taula 5.12. Valors d'angles de pseudorotació i amplitud per a la determinació de la conformació dels anells de ribosa de l'estructura de d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT)

Tot i que la conformació del B-DNA es centra al voltant de C2'-endo, es distribueix àmpliament¹¹¹ des de C4'-exo (P=54°) a O4'-endo (P=90°) i C1'-exo (P=126°), fins a C2'-endo (P=162°) i inclús C3'-exo (P=198°) (veure cicle de pseudorotació als fonaments, pàgina 13). Aquesta distribució també l'observem en els angles de pseudorotació dels dímers de d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT) (veure Figura 5.27) però fins i tot s'observen valors menors de 50°, en la zona C3'-endo (N), i valors superiors a 200° (W), que són valors força estranys. Segons la posició dels residus, la conformació varia bastant, però és similar per al mateix tipus de residu en una mateixa estructura. Així, per als residus aparellats en la primera posició (residus 2,6,10 i 14) la conformació és la del B-DNA, centrada al voltant de C2'-endo, però adquirint també altres valors. Per als residus aparellats en a segona posició (3,7,11 i 15), en el cas de d(TGCTTCGT) es troben en la regió O4'-endo i en el cas de d(TCGTTGCT) al voltant de C4'-exo.

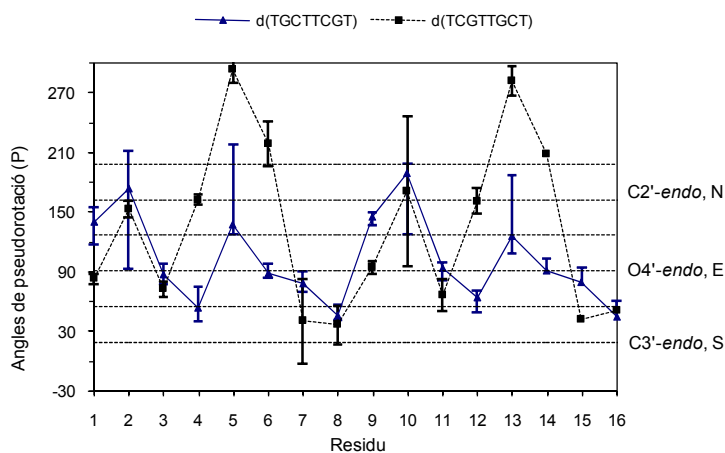


Figura 5.27. Representació de la variació de l'angle de pseudorotació en funció del residu

Els residus en la primera posició del llaç (4,8,12 i 16) es troben en C4'-exo per d(TGCTTCGT) i C2'-endo (4 i 12) o C4'-exo (8 i 16) per d(TCGTTGCT). Els residus en la segona posició del llaç es troben al voltant de C1'-exo-C2'-endo per d(TGCTTCGT), tot i que per als residus 5 i 13 la conformació és molt variable, i al voltant de O4'-endo pels residus 1 i 9 de d(TCGTTGCT) i O4'-exo pels residus 5 i 13. Les majors diferències entre les dues estructures es troben en els residus 4, 5 i 6 i els equivalents 12, 13 i 14, ja que per a d(TCGTTGCT) presenten valors de conformacions similars dos a dos, és a dir, entre els residus realment equivalents en les dues unitats del dímer, mentre que d(TGCTTCGT) presenta valors força uniformes per a cada tipus de residu.

5.4.5.3 Paràmetres helicoidals

Els paràmetres helicoidals locals per als passos centrals de bases apilades es mostren en la Taula 5.13. Per als passos 2-3, 6-7 i equivalents, s'observen valors dels paràmetres similars als obtinguts pels dúplexs de B-DNA, però amb un lleuger esllavissament (*slide*) i un gir (*twist*) que varia en funció de la seqüència: al voltant de 26° per d(TGCTTCGT) i al voltant de 35 ° per d(TCGTTGCT).

	Pas	Shift Dx (Å)	Slide Dy (Å)	Rise Dz (Å)	Tilt τ (°)	Roll ρ (°)	Twist Ω (°)
d(TGCTTCGT)	G2/C3	-0.4 ± 0.2	-1.0 ± 0.2	4.2 ± 0.1	-10.6 ± 1.5	11.6 ± 2.6	28.5 ± 2.2
	C3/T4	-9.5 ± 0.5	-2.5 ± 0.2	4.5 ± 0.6	-33.0 ± 3.7	-21.7 ± 3.4	-36.9 ± 6.5
	C6/G7	-0.2 ± 0.1	-0.8 ± 0.2	3.1 ± 0.2	5.0 ± 2.6	7.4 ± 4.2	24.7 ± 1.6
	G7/T8	-9.2 ± 0.1	-1.7 ± 0.2	5.6 ± 0.2	-35.7 ± 2.5	-18.0 ± 4.9	-29.1 ± 1.5
	T12/C11	9.6 ± 0.4	-2.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4	32.3 ± 3.2	-24.3 ± 3.0	-38.1 ± 5.4
	C11/G10	0.4 ± 0.2	-1.0 ± 0.1	4.1 ± 0.2	9.8 ± 1.8	12.2 ± 3.0	28.0 ± 1.7
	T16/G15	9.3 ± 0.3	-1.7 ± 0.2	5.6 ± 0.3	35.5 ± 2.0	-18.0 ± 6.2	-30.4 ± 2.8
	G15/C14	0.2 ± 0.2	-0.8 ± 0.2	3.1 ± 0.2	-5.2 ± 2.3	9.1 ± 4.9	24.1 ± 1.9
d(TCGTTGCT)	C2/G3	0.1 ± 0.1	-0.8 ± 0.1	3.3 ± 0.1	-1.2 ± 2.5	9.4 ± 5.5	37.5 ± 1.3
	G3/T4	-10.0 ± 0.2	-2.5 ± 0.2	3.8 ± 0.3	-16.0 ± 2.3	-11.6 ± 8.8	-43.0 ± 3.4
	G6/C7	0.2 ± 0.2	-0.6 ± 0.1	3.4 ± 0.1	-1.8 ± 1.3	-9.4 ± 1.5	32.3 ± 1.5
	C7/T8	-9.5 ± 0.2	-3.2 ± 0.3	4.8 ± 0.3	-18.5 ± 3.3	4.8 ± 4.0	-37.3 ± 3.5
	T12/G11	9.9 ± 0.3	-2.6 ± 0.2	4.2 ± 0.4	18.6 ± 3.5	-0.6 ± 10.8	-40.9 ± 4.5
	G11/C10	-0.4 ± 0.2	-0.7 ± 0.2	3.4 ± 0.3	1.5 ± 4.0	4.7 ± 8.2	38.0 ± 1.1
	T16/C15	9.5 ± 0.7	-3.2 ± 0.3	4.6 ± 0.4	15.0 ± 4.5	-1.0 ± 3.0	-40.1 ± 6.4
	C15/G14	-0.1 ± 0.1	-0.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.2 ± 1.4	-10.8 ± 2.3	32.7 ± 1.7
B-DNA estàndard	-1.1 a 1.1	-1.1 a 1.1	3.2 a 4.0	-7.6 a 7.6	-14 a 16	22 a 50	

Taula 5.13. Paràmetres helicoidals locals "inter-base" per als dímers de d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT)

Per als passos 3-4, 7-8 i equivalents s'observen diferències importants respecte al B-DNA, com és normal ja que s'ha de produir el gir de la cadena. Els residus que ocupen la primera posició del *loop* presenten, respecte al residu anterior en la seqüència, valors de *shift* de $\sim -10^\circ$, *slide* de -2 a -3° , *rise* de $\sim 5^\circ$ per d(TGCTTCGT) i $\sim 4^\circ$ per d(TCGTTGCT), *tilt* de 34° de promig per d(TGCTTCGT) i de 17° de promig per d(TCGTTGCT), *roll* de -10 a -20° i *twist* de -33° de promig per d(TGCTTCGT) i -40° per d(TCGTTGCT). El valor de pendent (*tilt*) observat es deu a què les timines en la primera posició del *loop* s'apilen sobre el residu que es troba dues posicions més enllà de la seqüència i que presenta una inclinació d'entre $20-40^\circ$ amb el parell amb qui forma la tètrada, del qual forma part el residu anterior de la T del *loop*. Cal destacar que els valors de balandreig (*roll*) presenten desviacions

estàndard molt grans ja que existien grans variacions entre les diferents estructures resultants i, per tant, són poc significatius.

Aquests paràmetres helicoidals són molt similars als obtinguts anteriorment per a la resta de *bi-loops*, ja que l'estructura d'aquests oligonucleòtids lineals és globalment la mateixa que l'observada pels *bi-loops* formats amb octàmers cíclics.

5.4.5.4 Anàlisi de les estructures promig

A les figures 5.28 i 5.29 podem observar les estructures promig dels oligonucleòtids lineals des de diferents perspectives.

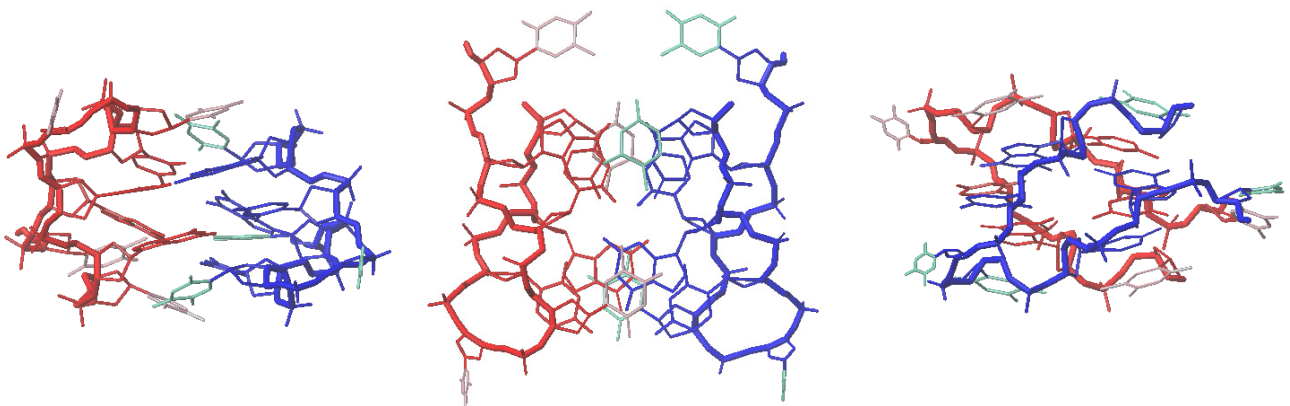


Figura 5.28. Vistes lateral, superior i del creuament dels esquelets per a l'estructura promig del dímer de d(TGCTTCGT). Cada unitat es destaca d'un color diferent, l'esquelet amb traçat més gruixut i les bases del loop amb un color més clar.

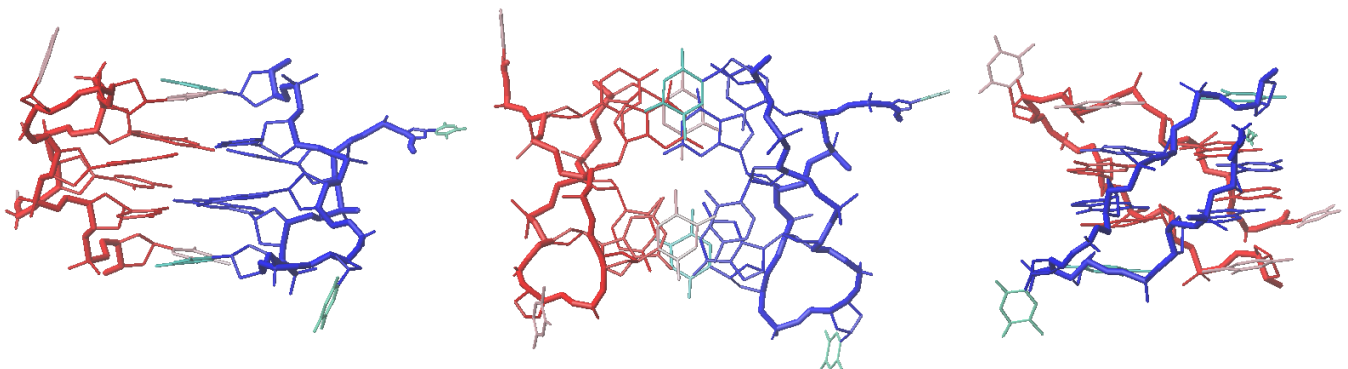


Figura 5.29. Vistes lateral, superior i del creuament dels esquelets per a l'estructura promig del dímer de d(TCGTTGCT). Cada unitat es destaca d'un color diferent, l'esquelet amb traçat més gruixut i les bases del loop amb un color més clar.

Si comparem amb detall les estructures dimèriques formades pels oligonucleòtids lineals, observem que aquestes no són exactament iguals. L'estructura de d(TCGTTGCT) presenta menor inclinació entre els apilaments, $\sim 20^\circ$ enfront de $\sim 40^\circ$ per d(TGCTTCGT), i és menys compacta, més allargada, resultant en una distància entre cadenes de 17-18 Å, mentre que per d(TGCTTCGT) la distància mínima és de 15-16 Å.

La tètrada que estabilitza aquests *bi-loops* és la mateixa que estabilitza el seu anàleg cíclic: la tètrada GCCG, en què els dos parells G-C es disposen en el mateix sentit i formen dos ponts d'hidrogen no

simètrics: H21(Ga)-O2(Cb) i H21(Gb)-N3(Ga) (veure Figura 5.30). Tot i ser la mateixa tètrada, la inclinació entre els parells de bases que la formen és lleugerament diferent en cada cas.

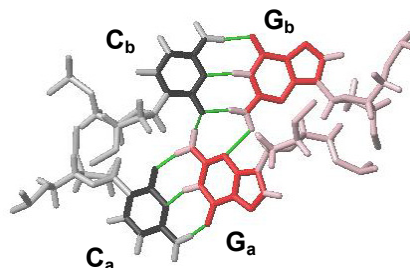


Figura 5.30. Tètrada GCGC observada en les estructures de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$, $d(TGCTTCGT)$ i $d(TCGTTGCT)$

5.4.6 Comparació amb estructures anteriors

Les estructures observades per als octàmers lineals $d(TGCTTCGT)$ i $d(TCGTTGCT)$ formen part del tipus de motiu anomenat *bi-loop*, les característiques del qual s'han detallat en la introducció d'aquest bloc. La gran semblança estructural la podem quantificar a partir del valor de RMSD resultant de comparar aquestes estructures. Com en la introducció, els valors de RMSD presentats en la Taula 5.14 estan calculats sobre els C1' de les diferents estructures. Els valors calculats sobre els C1' dels nucleòtids implicats en les tètredes són molt petits, i es situen dins de l'ordre dels valors obtinguts per al conjunt d'estructures d'RMN per a cada seqüència.

Seqüència	$d(TGCTTCGT)$	$d(TCGTTGCT)$	$d\langle pCGCTCCGT \rangle$	$d\langle pTGCTCGCT \rangle$	$d\langle pCATTCAAT \rangle$	$d\langle pCGCTCAAT \rangle$	$d\langle pCCGTCCGT \rangle$
$d(TGCTTCGT)$	---	2.8	2.6	2.3	2.6	2.3	2.6
$d(TCGTTGCT)$	1.1	---	1.9	1.4	1.4	2.9	1.9
$d\langle pCGCTCCGT \rangle$	0.6	1.3	---	1.2	1.9	1.9	0.9
$d\langle pTGCTCGCT \rangle$	0.6	0.8	0.8	---	1.2	2.4	1.2
$d\langle pCATTCAAT \rangle$	0.8	1.1	0.5	0.8	---	2.6	1.8
$d\langle pCGCTCAAT \rangle$	0.9	1.3	0.7	1.1	0.6	---	1.7
$d\langle pCCGTCCGT \rangle$	0.6	0.9	0.8	0.8	0.9	1.0	---
$d(GCATGCT)$	0.7	0.9	0.8	0.5	0.8	1.0	0.9

Taula 5.14. RMSDs (Å) entre parelles d'estructures dels diferents *bi-loops*. En la part superior de la diagonal els calculats entre tots els C1', i en la part inferior només entre els C1' dels nucleòtids implicats en les tètredes

5.4.6.1 Comparació amb $d\langle pCGCTCCGT \rangle$

L'estructura dels octàmers lineals s'assembla enormement a la del seu anàleg cíclic $d\langle pCGCTCCGT \rangle$, sobre el qual s'havia basat el seu disseny. Tot i així, existeixen lleugeres diferències. L'anàleg lineal que més s'assembla al corresponent cíclic és $d(TGCTTCGT)$, com ho demostra el valor de RMSD si comparem els nucleòtids implicats en les tètredes. Aquest dímer presenta una inclinació entre parells de bases de $\sim 40^\circ$, similar a la del dímer cíclic (42°) i una inclinació entre les dues forquetes de 122° , més similar a la de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$ (125°). Per contra, el dímer de $d(TCGTTGCT)$ presenta una menor inclinació, tant entre els parells de bases que formen les tètredes ($\sim 20^\circ$) com entre les dues forquetes (110°).

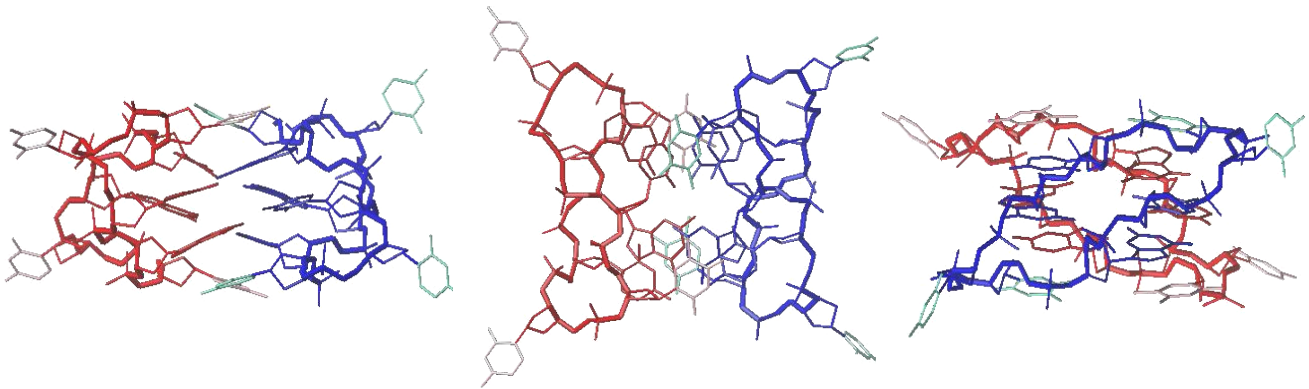


Figura 5.31. Vistes lateral, superior i del creuament dels esquelets per a l'estructura promig del dímer de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$. Cada unitat es destaca d'un color diferent, l'esquelet amb traçat més gruixut i les bases del loop amb un color més clar

5.4.6.2 Comparació amb $d(GCATGCT)$

L'únic oligonucleòtid lineal en què s'havia observat el motiu *bi-loop* fins ara havia estat l'heptàmer $d(GCATGCT)$, però aquesta estructura només havia estat observada en estat sòlid.

Tant en l'heptàmer com en els nostres octàmers lineals, les cadenes es disposen antiparal·lelament una respecte l'altra, però en el cas de l'heptàmer, l'associació de les forquetes té lloc amb una orientació cap-cap, mentre que en el cas dels octàmers s'associen cap-cua. Això es deu a la seqüència i al tipus de tètredes formades: 5'-pur-pyr-3' i tètredes GCGC directes en el cas de $d(GCATGCT)$ i apilaments mixtes i tètredes GCCG en el cas de $d(TGCTTCGT)$ i $d(TCGTTGCT)$.

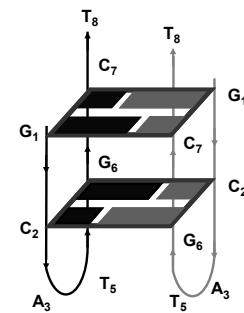


Figura 5.32. Representació esquemàtica de l'estructura de l'heptàmer $d(GCATGCT)$

Si ens fixem en les estructures, sembla que l'orientació de les cadenes sigui contrària a la que esquematitzem en les representacions com la de la Figura 5.32, però això és degut a què cada forqueta del dímer està inclinada uns 120° respecte l'altra.

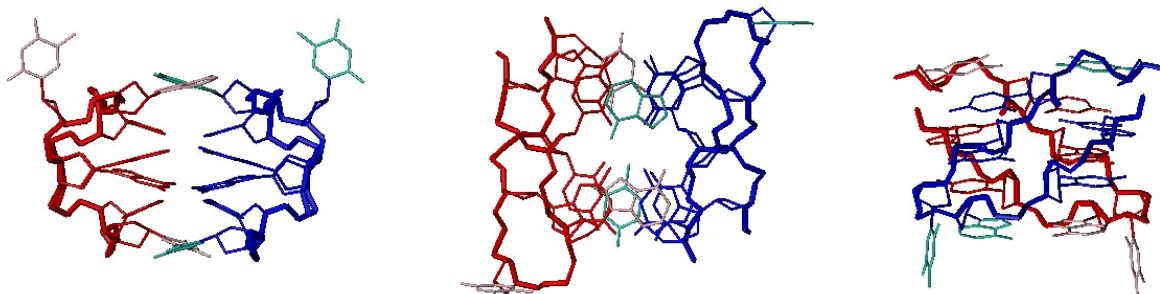


Figura 5.33. Vistes lateral, superior i del creuament dels esquelets per a l'estructura promig del dímer de $d(GCATGCT)$. Cada unitat es destaca d'un color diferent, l'esquelet amb traçat més gruixut i les bases del loop amb un color més clar

5.5 Estudi termodinàmic de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$, $d(TGCTTCGT)$ i $d(TCGTTGCT)$

L'estudi termodinàmic dels àcids nucleics proporciona dades importants tant a nivell fonamental, per entendre les forces que estableixen les diferents conformacions i poder predir l'estructura que adoptarà un oligonucleòtid determinat, com a nivell pràctic, per al disseny de condicions experimentals òptimes per a determinades tècniques (PCR, seqüenciació per hibridació, etc).

Per al cas del *bi-loop*, es disposa de les dades termodinàmiques que s'han comentat en la introducció d'aquest bloc, però no es disposava d'informació per a l'oligonucleòtid cíclic $d\langle pCGCTCCGT \rangle$. Es va decidir, per tant, realitzar un estudi termodinàmic dels dos oligonucleòtids lineals que s'estructuren en forma de *bi-loop* i del seu anàleg cíclic.

5.5.1 Estudi mitjançant corbes de fusió per dicroisme circular

L'estudi de les propietats termodinàmiques dels oligonucleòtids $d\langle pCGCTCCGT \rangle$, $d(TGCTTCGT)$ i $d(TCGTTGCT)$ mitjançant dicroisme circular s'ha dut a terme enregistrant corbes de fusió a diferents concentracions, per poder calcular els paràmetres termodinàmics a partir de la variació de la temperatura de fusió amb la concentració. A més a més, els paràmetres s'han calculat a partir de només una corba de fusió a efectes comparatius. Si les assumpcions fetes són correctes, els paràmetres calculats per les dues metodologies no haurien de diferir més d'un 15%. Si la diferència és major, probablement ens trobem davant d'un equilibri que no és de dos estats o en què l'entalpia no és independent de la temperatura. En aquest cas hauríem d'emprar mesures calorimètriques per a la determinació dels paràmetres termodinàmics. En l'apartat 5.5.2 s'exposaran els resultats obtinguts mitjançant microcalorimetria.

5.5.1.1 Adquisició dels espectres

Com a condicions per realitzar aquests estudis es va triar: solució amortidora de fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM de NaCl i 10 mM de MgCl₂. Les corbes es van registrar emprant cubetes cilíndriques de diferent pas de llum en un aparell Jasco J-810 amb un bany per controlar la temperatura.

L'adquisició dels espectres és important ja que ens hem d'assegurar que ens trobem en una situació d'equilibri. Les corbes de desnaturalització (fusió) i renaturalització han de ser, per tant, superposables. A més a més, cal evitar la condensació de vapor d'aigua a baixes temperatures i l'evaporació de la solució a altes temperatures.

5.5.1.2 Anàlisi de les dades de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$

VARIACIÓ DE LA T_m AMB LA CONCENTRACIÓ:

Per a realitzar el mateix tractament de les dades per als tres oligonucleòtids, calculem la T_m a partir de la primera derivada. En aquest cas disposem de sis dades de T_m a sis concentracions diferents (Figura 5.34.A i C). Si representem $1/T_m$ enfront del logaritme neperià de la concentració obtenim la gràfica de la Figura 5.34.B i les següents dades termodinàmiques: $\Delta H^0 = -184 \pm 13$ kJ/mol, $\Delta S^0 = -487 \pm 34$ J/mol·K i $\Delta G_{298}^0 = -39 \pm 2$ kJ/mol.

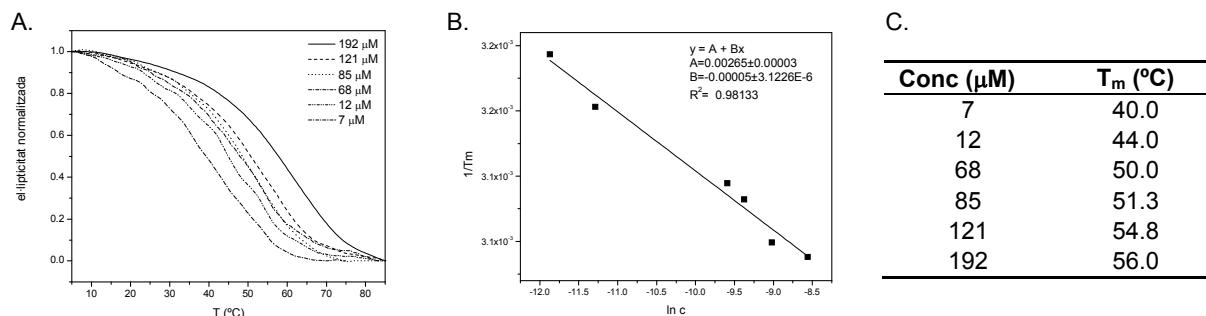


Figura 5.34. A. Corbes de fusió a diferents concentracions de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$. B. Representació de la inversa de la T_m enfront del \ln de la concentració. C. Valors de concentracions i T_m de les diferents corbes de fusió

ANÀLISI D'UNA CORBA DE FUSIÓ:

A partir de la corba de fusió mitjançant DC (Figura 5.35.A), podem obtenir la variació de la fracció estructurada enfront de T (Figura 5.35.B), tal i com s'ha explicat als fonaments. A partir de la fracció molar obtenim el valor de la constant d'equilibri i podem representar $\ln K$ vs $1/T$ (representació per a $0.15 < x < 0.85$, Figura 5.35.C). Els paràmetres que s'obtenen d'aquest ajust són: $\Delta H^0 = -193 \pm 0.4$ kJ/mol, $\Delta S^0 = -514 \pm 1$ J/mol·K i $\Delta G^0_{298} = -40 \pm 0.3$ kJ/mol. Aquests valors s'han contrastat amb l'anàlisi d'altres corbes de fusió del mateix oligonucleòtid a diferents concentracions i han resultat ser consistents.

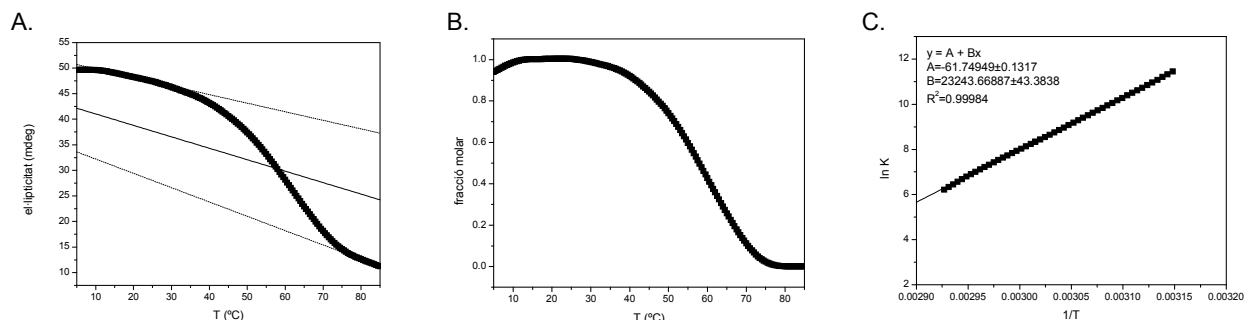


Figura 5.35. A. Corba de dicromisme circular de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$ a concentració 192 μM amb la representació de la variació del senyals per a les formes estructurada i desestructurada. B. Representació de la fracció molar estructurada en funció de la temperatura. C. Representació Van't Hoff

5.5.1.3 Anàlisi de les dades de $d\langle TCGTTGCT \rangle$

VARIACIÓ DE LA T_m AMB LA CONCENTRACIÓ:

En aquest cas, les dades experimentals de L5 eren força dolentes ja que presentaven una oscil·lació gran degut a dificultats tècniques en el control de la temperatura del bany, per això no s'han emprat directament les dades reals sinó els valors de l'ajust sigmoide. En la Figura 5.36 es mostren alguns dels ajustos de les corbes de fusió i els valors de temperatures de fusió que se n'extreuen, que han estat emprats per a la representació de la gràfica $1/T$ enfront de $\ln C$ (Figura 5.42.). La T_m ha estat calculada a partir de la primera derivada de l'ajust sigmoide, ja que en la majoria de corbes no disposem de plafló a baixa temperatura per poder emprar el mètode de la mediana.

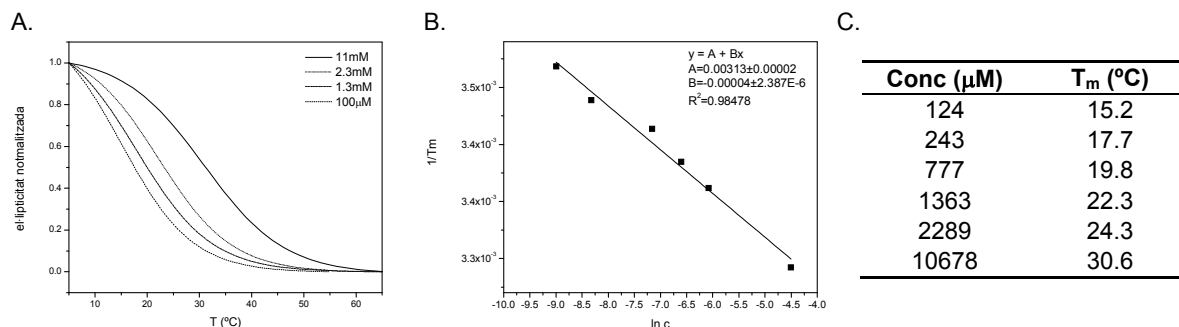


Figura 5.36. A. Corbes de fusió a diferents concentracions de d(TCGTTGCT). B. Representació de la inversa de la T_m enfront el ln de la concentració. C. Valors de T_m per a cada concentració

Els valors dels paràmetres termodinàmics que s'extreuen són: $\Delta H^0 = -217 \pm 13$ kJ/mol, $\Delta S^0 = -677 \pm 42$ J/mol·K i $\Delta G^0_{298} = -15 \pm 1$ kJ/mol.

ANÀLISI D'UNA ÚNICA CORBA:

En aquest cas, com que els oligonucleòtids lineals formen estructures molt menys estables, ens cal arribar a concentracions molt majors per poder tenir una corba sigmoide completa que ens permeti traçar les línies de base de forma fiable i poder realitzar l'anàlisi d'una única corba. Amb aquest oligonucleòtid es va realitzar la fusió d'una mostra de concentració 11 mM, enregistrada en una cubeta de 0.001 cm de pas de llum.

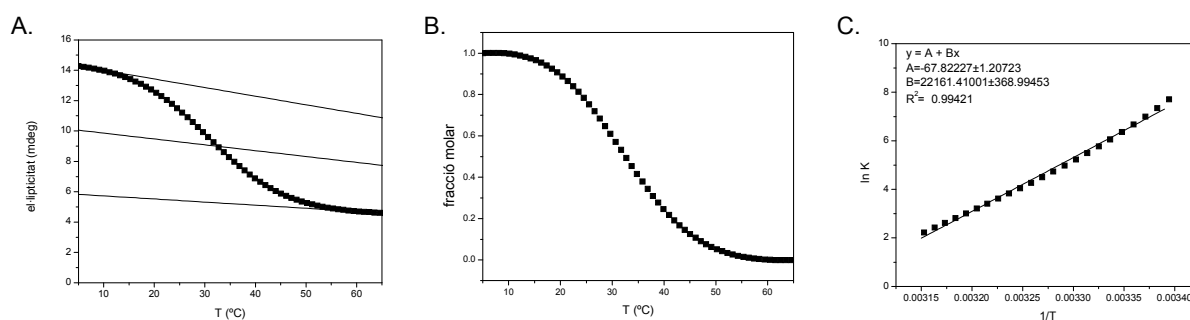


Figura 5.37. A. Corba de dicromisme circular de d(TCGTTGCT) a concentració 11 mM amb la representació de la variació del senyal per a les formes estructurada i desestructurada. B. Representació de la fracció molar estructurada en funció de la temperatura. C. Representació Van't Hoff

Tot i que la representació de $\ln K$ enfront de $1/T$ s'ajusta bé a una recta (Figura 5.37.C, $R^2=0.99421$), s'observa clarament que la representació no és lineal, sinó que presenta una certa curvatura. Generalment aquesta desviació és inapreciable degut al propi soroll de fons de les dades experimentals, però en aquest cas les nostres dades són "perfectes" perquè hem agafat els valors de l'ajust de la corba de fusió. Aquesta curvatura pot ser deguda a: 1) ΔH^0 no és independent de la temperatura (és a dir que el canvi en la capacitat calorífica durant la reacció no es zero, $\Delta C_p^0 \neq 0$); 2) la transició que no és de dos estats; 3) l'existència d'errors en escollir les línies de base. En principi en el nostre cas podem pensar que es pot tractar del primer motiu. Les dades termodinàmiques que s'extreuen de l'ajust lineal són: $\Delta H^0 = -184 \pm 3$ kJ/mol, $\Delta S^0 = -564 \pm 10$ J/mol·K i $\Delta G^0_{298} = -16 \pm 3$ kJ/mol.

Però s'hauria de realitzar un ajust que contemplés que $\Delta C_p^0 \neq 0$. En aquest cas, la relació entre $\ln K$ i $1/T$ ve donada per l'equació¹⁵⁵:

$$\ln K = \frac{-\Delta H_{VH}^{T_m} + \Delta C_p^0 T_m}{R} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta C_p^0}{R} \cdot \ln \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_{VH}^{T_m} - \Delta C_p^0 \ln T_m}{R} - \frac{\Delta C_p^0}{R}$$

Introduint aquesta equació al programa OriginPro 7.5, donant com a variables els paràmetres entalpia, entropia i capacitat calorífica i fixant la T_m en 304 K, obtenim el següent ajust (per $0.15 < x < 0.85$):

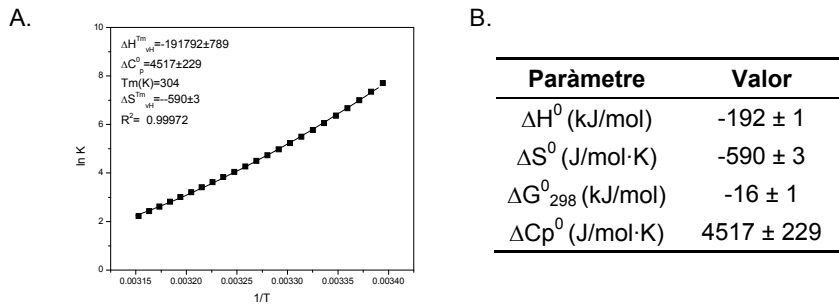


Figura 5.38. A. Ajust no lineal de $1/T$ enfront $\ln K$. B. Paràmetres extrets de l'ajust

Aquest ajust és millor que l'anterior ($R^2=0.99972$), però les dades que se n'extreuen no difereixen gaire de les anteriors.

5.5.1.4 Anàlisi de les dades de d(TGCTTCGT)

VARIACIÓ DE LA T_m AMB LA CONCENTRACIÓ:

En aquest cas disposem també de sis valors fusions a sis concentracions diferents (Figura 5.39.B), a partir de $100 \mu\text{M}$ ja que a menors concentracions les fusions no eren gens cooperatives. La T_m s'ha calculat a partir de la primera derivada ja que en la majoria de casos no disposem de plafó a baixa temperatura. Els paràmetres que s'obtenen són: $\Delta H^0 = -208 \pm 14 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S^0 = -649 \pm 38 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ i $\Delta G^0_{298} = -15 \pm 3 \text{ kJ/mol}$.

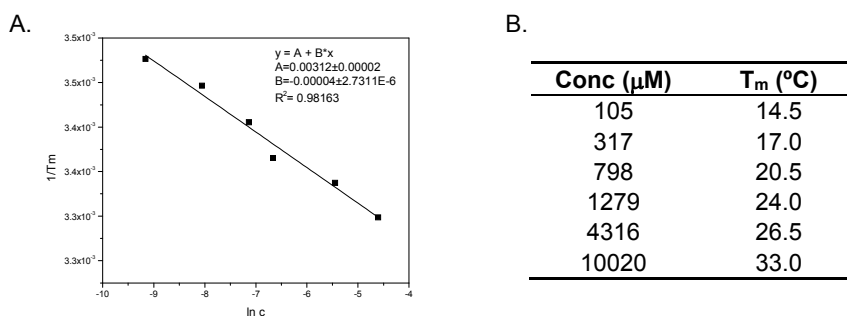


Figura 5.39. A. Representació de l'inversa de la T_m enfront el \ln de la concentració. B. Valors de T_m per a cada concentració estudiada

ANÀLISI D'UNA ÚNICA CORBA:

Per a l'anàlisi d'una única corba, s'ha agafat la corba a major concentració de què disposem: 10 mM i s'han realitzat els tractaments descrits per representar $\ln K$ enfront de la inversa de la temperatura. L'ajust lineal no és dolent ($R^2=0.99024$), però s'observa que les dades presenten una certa curvatura

(Figura 5.40.A) i s'han ajustat també considerant $\Delta C_p^0 \neq 0$, tal i com ja s'ha descrit (valor de T_m fixat a 306 K, Figura 5.40.B). Els valors obtinguts es presenten en la Figura 5.40.C.

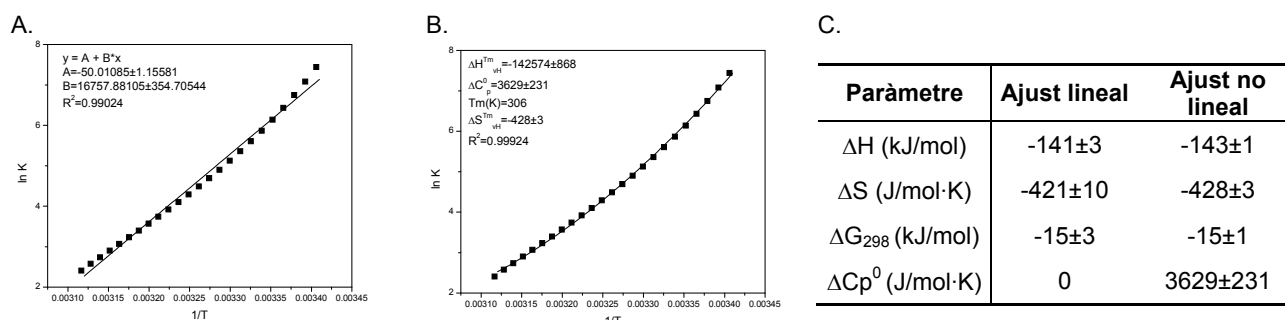


Figura 5.40. Representació de $\ln K$ enfront de $1/T$ ($0.15 < \alpha < 0.85$) per a $d(\text{TGCTTCGT})$ i ajustos A) lineal ($\Delta C_p^0 = 0$) i B) no lineal ($\Delta C_p^0 \neq 0$). C. Paràmetres termodinàmics extrets dels ajustos

5.5.1.5 Anàlisi dels resultats

A la Taula 5.15 es presenten els resultats obtinguts per a les tres seqüències amb les diferents metodologies:

Seqüència	Ajust	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol·K)	ΔG_{298}^0 (kJ/mol)
$d\langle p\text{CGCTCCGT} \rangle$	$1/T_m$ vs $\ln c$	-184 ± 13	-487 ± 34	-39 ± 2
	$\ln K$ vs $1/T$, $\Delta C_p^0 = 0$	-193 ± 1	-514 ± 1	-40 ± 1
$d(\text{TGCTTCGT})$	$1/T_m$ vs $\ln c$	-208 ± 14	-649 ± 38	-15 ± 3
	$\ln K$ vs $1/T$, $\Delta C_p^0 = 0$	-141 ± 3	-421 ± 10	-15 ± 3
	$\ln K$ vs $1/T$, $\Delta C_p^0 \neq 0$	-143 ± 1	-428 ± 3	-15 ± 1
$d(\text{TCGTTGCT})$	$1/T_m$ vs $\ln c$	-217 ± 13	-677 ± 42	-15 ± 1
	$\ln K$ vs $1/T$, $\Delta C_p^0 = 0$	-184 ± 3	-564 ± 10	-16 ± 3
	$\ln K$ vs $1/T$, $\Delta C_p^0 \neq 0$	-192 ± 1	-590 ± 3	-16 ± 1

Taula 5.15. Taula resum dels paràmetres termodinàmics per a $d\langle p\text{CGCTCCGT} \rangle$, $d(\text{TGCTTCGT})$ i $d(\text{TCGTTGCT})$

D'aquests resultats cal destacar:

1) L'energia lliure sempre presenta errors petits, que resulten del fet que l'entalpia i l'entropia estan altament correlacionades, fenomen que es coneix com a compensació entàlpica-entròpica¹⁵⁶ i que reflecteix el fet que les interaccions entàlpiques favorables sempre costen graus de llibertat, de manera que ΔG^0 sempre és petit, donant lloc a associacions reversibles en solució. A vegades aquesta correlació pot ser un artefacte provinent de la pròpia determinació experimental de l'entalpia i l'entropia, que no es realitza de forma independent. Però es pensa que la correlació és deguda a la reorganització del dissolvent en produir-se l'associació, pel fet que aquesta correlació s'observa en sistemes molt diferents i ja que el solvent és present en concentracions molars molt més grans que no pas els soluts.

2) Per a l'oligonucleòtid cíclic $d\langle p\text{CGCTCCGT} \rangle$, existeix una bona concordança entre els paràmetres calculats mitjançant les dues metodologies (error de només el 5% entre les entalpies); per tant, les assumpcions que es tracta d'un equilibri de dos estats i que la capacitat calorífica es manté constant en el procés són correctes.

Per als oligonucleòtids lineals, la concordança és pitjor, tant si considerem que $\Delta C_p^0=0$ (48% de diferència per d(TGCTTCGT) i 18% per d(TCGTTGCT)) com si considerem $\Delta C_p^0 \neq 0$ (45% per d(TGCTTCGT) i 13 % per d(TCGTTGCT)). En el cas de d(TCGTTGCT), considerant que l'entalpia depèn de la temperatura, obtenim una correlació prou bona entre les dues metodologies, indicant que l'assumpció que ens trobem en un equilibri de dos estats és correcta. Per a d(TGCTTCGT), les diferències entre les dues metodologies són molt grans i pensem que és degut a errors experimentals per determinar la línia de base d'absorció de l'espècie estructurada, ja que no disposem de plafó a baixa temperatura (veure Figura 5.41). Creiem, per tant, que aquestes dades no són fiables i ens quedarem amb les obtingudes mitjançant la variació de la T_m amb la concentració.

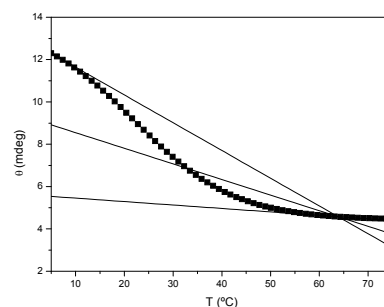


Figura 5.41. Corba de fusió per dicroisme circular de d(TGCTTCGT) a concentració 10 mM

3) Els valors de ΔC_p^0 obtinguts per als oligonucleòtids lineals són força elevats (al voltant de 4000 J/K.mol), i és lògic que donin lloc a una curvatura en la representació de $\ln K$ enfront de $1/T$ perceptible per sobre del soroll dels errors experimentals¹⁵⁷.

4) Si comparem els valors obtinguts per a l'oligonucleòtid cíclic amb els dels seus anàlegs lineals: l'entalpia és del mateix ordre, mentre que l'entropia és menor, en valor absolut, per a l'oligonucleòtid cíclic, com és d'esperar ja que aquest oligonucleòtid ja presenta la conformació adequada per a la interacció dels dos cicles, mentre que els oligonucleòtids lineals s'han de plegar a costa de perdre graus de llibertat per després poder interaccionar. De manera que l'energia lliure a 25 °C és substancialment major (més del doble), en valor absolut, per a la formació del dímer del cicle que no pas per als dímers dels oligonucleòtids lineals.

5.5.2 Estudi mitjançant calorimetria d'escombratge diferencial (DSC)¹⁵⁸

Ja que, com s'ha comentat, les dades termodinàmiques extretes de les corbes de fusió depenen d'un model, es va voler emprar la microcalorimetria per poder comparar els valors de entalpia Van't Hoff (ΔH_{vH}^0) i entalpia determinada calorimètricament (ΔH_{cal}^0). Si aquests valors no són iguals, això ens indicarà que alguna de les assumpcions no és vàlida: l'equilibri no és de dos estats, ΔH^0 no és independent de la temperatura o les corbes de fusió no corresponen a una situació d'equilibri. Si $|\Delta H_{\text{vH}}^0| < |\Delta H_{\text{cal}}^0|$ pot ser degut a l'existència d'estats intermedis en l'equilibri o a que $\Delta C_p > 0$. Per contra, si $|\Delta H_{\text{vH}}^0| > |\Delta H_{\text{cal}}^0|$ pot ser degut a l'existència d'agregació o a que $\Delta C_p < 0$. Els dos grans avantatges dels mètodes calorimètrics enfront dels òptics són, doncs: 1) els valors obtinguts no depenen d'un model, 2) podem obtenir una mesura directa de ΔC_p i avaluar la dependència de l'estabilitat amb la temperatura.

Per a aquest estudi es va emprar la calorimetria d'escombratge diferencial o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), que consisteix en mesurar l'excés de capacitat calorífica que cal donar a una solució d'àcid nucleic respecte a una referència per mantenir la mateixa temperatura en les dues cel·les en funció de la temperatura. Aquesta tècnica serveix per estudiar les transicions entre formes

estructurades i desestructurades en augmentar la temperatura. D'una corba de DSC podem extreure la temperatura de fusió (T_m , temperatura del màxim de la corba), la capacitat calorífica del procés (ΔC_p), l'entalpia i l'entropia del procés i, per tant, també l'energia lliure. A més a més, podem inferir si procedeix en dos estats o en multiestats, la mida de la molècula que fon com una unitat, el paràmetre de cooperativitat (σ) i la funció de partició de la transició (Q). La variació de la capacitat calorífica s'extreu de la diferència entre les línies de base pre i post-transició. L'entalpia s'extreu de la integració de l'àrea sota la corba normalitzada ($\Delta H^0 = \int C_p dT$) i l'entropia de la integració de la corba $\Delta C_p/T$ ($\Delta S^0 = \int (C_p/T) dT$). També podem obtenir l'entalpia Van't Hoff a partir del perfil de la corba d'excés de la capacitat calorífica.

Per a l'estudi mitjançant DSC es van preparar mostres de d<pCGCTCCGT> 200 μ M i de d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT) 1 mM en el mateix medi emprat per l'estudi termodinàmic amb DC (fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$). Aquestes condicions són adequades pel DSC pel que fa a la solució amortidora de pH ($pK_{a2,25^\circ C} = 7.20$, $\Delta pK_{a2}/^\circ C = -0.0028$) i concentració de cations (50-1 mM cations monovalents, 1-15 mM cations divalents), i les concentracions d'oligonucleòtid es troben dins del rang de treball recomanat (0.2 a 2 mM)^{158b}. Les corbes es van enregistrar en un aparell MicroCal VP-DSC de la Unitat de Química Fina dels SCT. Aquest instrument té una sensibilitat prou bona com per mesurar la capacitat calorífica de solucions diluïdes de biopolímers^{158c}.

Inicialment cal enregistrar els escombrats o *scans* de la solució referència sense mostra, per després poder restar-los dels de la nostra mostra. Per unes determinades condicions experimentals existeix un línia de base a la qual s'arriba després de realitzar diversos scans. Quan la línia de base és reproducible d'un scan a un altre, es pot procedir a carregar la mostra en la cel·la en el procés de refredament (*load-on-the-fly method*) per pertorbar al mínim el protocol tèrmic que estem repetint. De la mostra també es realitzen diversos *scans* per després poder promitjar-los. Per al tractament de les dades cal restar a la mitjana de tres *scans* de la mostra, el promig dels tres últims *scans* de la referència, normalitzar-les segons la concentració de la mostra i el volum de la cel·la, traçar les línies de base i restar-les. Aleshores ja es podria integrar l'àrea sota la corba, que ens donaria el valor de l'entalpia ja que $\Delta H^0 = \int C_p dT$ o ajustar la corba a una equació que correspongui a un equilibri determinat.

Les proves realitzades per extreure paràmetres termodinàmics dels estudis de DSC no van ser satisfactòries per diversos motius:

- Es necessiten molts *scans* per estabilitzar la línia de base i, tot i que introduïm la mostra oligonucleotídica quan ja està estable en el procés de refredament de les cel·les (*load-on-the-fly method*), els *scans* de la mostra no són totalment reproduïbles.
- En el cas dels oligonucleòtids lineals, la transició és molt ampla i l'estructuració poc estable, de manera que la transició ja comença des de l'inici de l'escombrat de temperatura i no tenim línia de base a baixa temperatura, de manera que no es poden tractar les dades de forma fiable i no podem extreure'n cap paràmetre (Figura 5.42.B).

- En el cas de $d\langle pCGCTCCGT \rangle$, no es va observar cap transició. Probablement es degui al fet que la mostra no està suficientment concentrada i l'aparell no és prou sensible per detectar variacions tan petites de calor. A partir del valor de ΔH^0 obtingut mitjançant el dicroisme circular, la concentració d'oligonucleòtid i el volum de la cel·la de DSC, podem calcular el valor que hauríem d'observar per ΔH^0 , que seria de 4.6 mcal. Aquest valor és molt inferior als calculats per a $d(TGCTTCGT)$ i $d(TCGTTGCT)$ de 22.2 mcal i 29.1 mcal, respectivament, i probablement massa baix pel nostre instrument de treball.

A la Figura 5.42 es mostren com a exemple els escombrats (*scans*) acumulats de la solució blanc, que serviran com a referència de la línia de base, i els *scans* obtinguts per a la mostra de $d(TCGTTGCT)$.

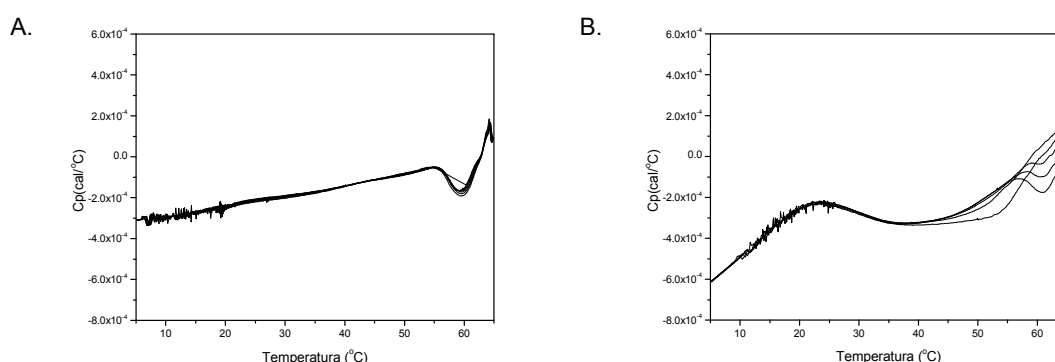


Figura 5.42. Corbes de DSC. A: Scans del blanc (7 darrers quan l'aparell ja estava estabilitzat). B: Scans (5) de $d(TCGTTGCT)$.

Aquests resultats negatius es poden explicar considerant certs problemes que han estat descrit en l'ús de la calorimetria d'escombratge diferencial en el camp dels àcids nucleics^{158,159}.

- Generalment s'ha assumit que la capacitat calorífica dels oligonucleòtids és independent de la temperatura, però en principi no ha de perquè ser així. Mesurar experimentalment aquesta dependència és difícil a causa de les limitacions instrumentals ja que els valors estimats de ΔC_p són petits (400 J/K·mol per parell de bases).

- L'estabilitat de la línia de base en un ampli rang de temperatures dels instruments és un problema quan no s'estudien transicions cooperatives estretes sinó transicions que tenen lloc en un ampli rang de temperatures.

- Les solucions d'àcids nucleics són viscoses i aquesta viscositat canvia en escalfar, de manera que es produeixen canvis en la convecció de la calor en les cel·les cilíndriques que poden donar lloc a gradients de temperatura que provoquin artefactes. Aquests problemes es resolen amb els instruments capil·lars¹⁶⁰.

- Cal pensar que, en molts casos, l'excés de la capacitat calorífica en el pic de la transició és menys d'un 1% de la capacitat calorífica de tota la solució. Això requereix instruments molt sensibles i precisos.

Per tant, no ha estat possible complementar els valors extrets a partir dels tractament de les corbes de fusió mitjançant dicroisme circular amb els provinents de la calorimetria diferencial.

6 GENERALITAT I RELLEVÀNCIA DEL MOTIU BI-LOOP

6.1 Resum

Del treball exposat en aquest bloc de la present tesi doctoral podem concloure que:

- El *bi-loop* es pot formar entre un oligonucleòtid cíclic i un altre lineal, donant lloc a dímers més estables en el cas que l'oligonucleòtid lineal estigui tallat pel motiu. Tot i així, l'extrem 3' d'aquest oligonucleòtid lineal és flexible i un dels 4 parells WC que forma amb el cicle només està parcialment format (Figura 6.1).

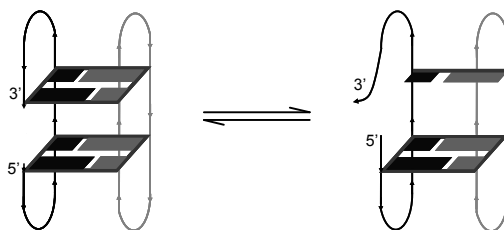


Figura 6.1. *Bi-loop* heterolineal

- El *bi-loop* es pot formar en solució estabilitzat per parells no canònics, com els parells G·T. Aquests parells poden formar tètrades directes, tètrades desplaçades o tètrades mixtes amb parells G·C (Figura 6.2).

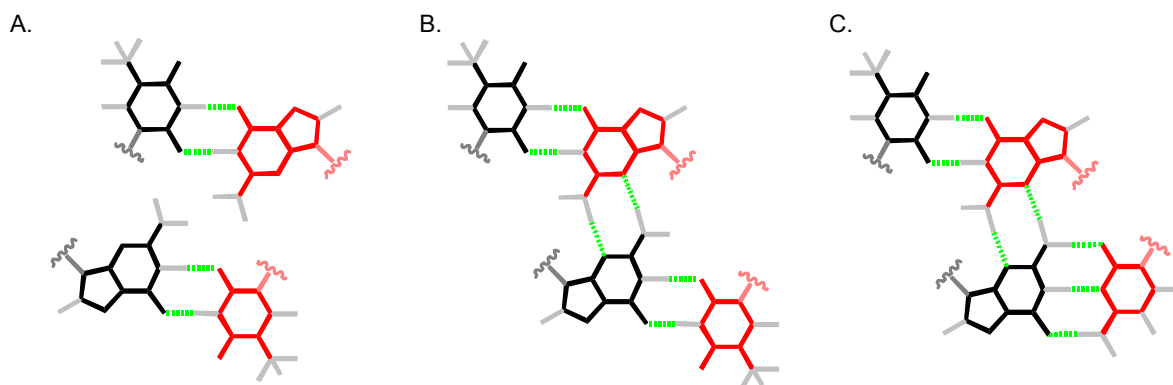


Figura 6.2. Diferents tipus de tètrades observades amb parells GT: A. GTGT directa. B. GTGT desplaçada. C. GTGC desplaçada

- El *bi-loop* també es forma en solució amb oligonucleòtids lineals. La clau per poder observar aquest motiu és evitar la presència d'altres espècies en solució. Hem pogut determinar l'estructura dels dímers de d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT) mitjançant ressonància magnètica nuclear i dinàmica molecular restringida (Figura 6.3.A i B). Aquestes espècies, però, són força menys estables que les formades per oligonucleòtids cíclics degut al cost entròpic que es requereix per què es pleguin i es puguin autoassociar.

- L'octàmer lineal d(TCGTTTCGT) no s'estructura en forma de *bi-loop* com nosaltres esperàvem, però pot dimeritzar per formació de dos parells C-C⁺ i contactes G-G i G-T (Figura 6.3.C).

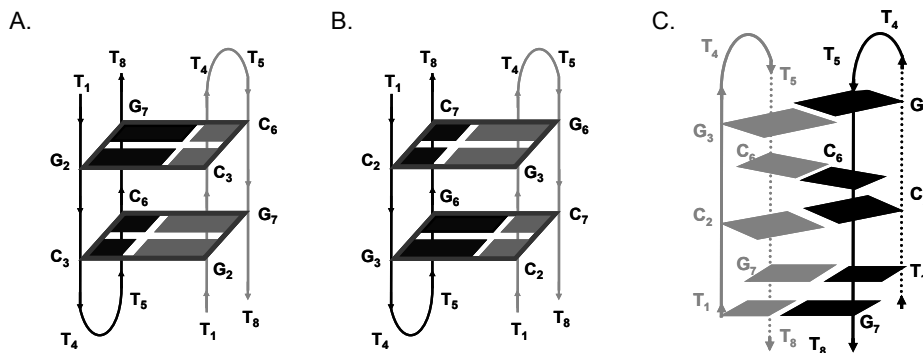


Figura 6.3. Esquemes de les estructures adoptades pels octàmers lineals: A. d(TGCTTCGT), B. d(TCGTTGCT), C. d(TCGTTTCGT)

Respecte a la idoneïtat de les diferents tècniques per estudiar aquest motiu podem dir que:

- L'RMN s'ha mostrat com l'eina essencial per poder caracteritzar amb seguretat la formació del motiu.
- El dicroïsmo circular, si bé dóna perfils força característics per als diferents tipus de dímers en funció de les tètredes formades, no ha demostrat ser prou significatiu per poder inferir o no la formació del motiu en solució, almenys en el cas dels oligonucleòtids lineals.
- Per primera vegada s'ha aplicat la metodologia dels espectres de diferència tèrmica, que és senzilla i només requereix d'un espectrofotòmetre UV-visible, per la detecció del *bi-loop* en solució i els resultats inicials resulten prometedors.

6.2 Un motiu de caràcter general

Amb tota la informació de què disposàvem al moment d'iniciar aquesta tesi doctoral més el que hem descrit en aquest treball podem dir que el *bi-loop* sembla ser un motiu de caràcter força general per diversos motius:

- L'ordre en la seqüència és indiferent per a la seva formació. Inicialment s'havia postulat que havia de ser 5'-pur-pyr-3'⁵⁹, però posteriorment ja es va descobrir que no cal que sigui així. El que sí que sabem és que l'ordre de les bases en la seqüència condiciona el tipus de tètredes que es formaran: pirimidines en l'extrem 3' i purines en 5' donen lloc a tètredes directes, mentre que purines en 3' i pirimidines en 5' donen lloc a tètredes desplaçades. La formació d'un o altre tipus de tètreda es pot

caracteritzar mitjançant dicroisme circular, ja que les primeres presenten un màxim al voltant de 290 nm mentre que les segones presenten un perfil amb el màxim proper a 265 nm.

- El motiu pot estar estabilitzat per dues tètredes iguals o diferents, com s'ha observat en els heterodímers i en l'estudi de l'homodímer de d<pCCTTCGGT>. De l'estudi d'aquestes estructures també s'ha demostrat que el *bi-loop* es pot formar quan el dinucleòtid central que forma el motiu és 5'-pur-pur-3' i 5'-pyr-pyr-3'.

- El *bi-loop* pot estar estabilitzat tant per parells A·T, com G·C, com per parells no canònics. Fins ara només ha estat observat en parells erronis G·T, però és probable que aquesta estructura tridimensional tan compacta pugui acomodar *mismatches* d'altres tipus. Cal preguntar-se també si el motiu podria estar estabilitzat íntegrament per parells no canònics.

- Pot estar format per oligonucleòtids cíclics o lineals, en estat sòlid o en solució, de manera que es descarta que es pugui tractar d'un artefacte degut a les forces d'empaquetament en el cristall o degut a les restriccions que imposa la cadena cíclica. Aquest és probablement el resultat més important d'aquesta tesi¹⁶¹.

Fins ara s'han observat cinc tètredes diferents amb parells canònics (Figura 2.4 de la introducció): la tètreda directa amb parells A·T; tres tipus de tètredes amb parells G·C: directa, desplaçada i "asimètrica", i una tètreda mixta directa. Sobre el paper podem anticipar que se'n podrien formar més, tant amb parells A·T exclusivament, com amb combinació de parells A·T i G·C, donant lloc a tètredes desplaçades o asimètriques, com ja s'ha observat per als parells G·C. En la Taula 6.1 es resumeixen les tètredes que s'han observat amb parells canònics i les que es podrien observar si s'escull la seqüència adequada. En els casos en què la tètreda ja ha estat observada s'hi indica el nom que li hem donat i la seqüència en què s'ha observat; en els casos en què no ha estat observada, es suggereixen seqüències per al seu estudi.

Parell format	Tètreda directa	Tètreda desplaçada	Tètreda asimètrica
AT	ATAT directa d<pCATT C ATT>	no observada seq: d(NTANNTAN)	no observada seq: d(NATNNTAN)
GC	GCGC directa d<pT G CT C GCT>	GCGC desplaçada d<p C CGT C CGT>	GCCG d<p C GCT C CGT>
AT i GC	GCAT directa d<pCATT C GCT>	no observada seq: d(NTANN C GN)	no observada seq: d(NATNN C GN) o d(N G CNNTANN)

Taula 6.1. Resum de les tètredes observades i les que podrien observar-se en les seqüències adequades

A més a més, si considerem la formació de parells no canònics, el nombre de tètredes que es podrien formar augmenta moltíssim, ja que les quatre bases es poden associar de 28 maneres diferents si considerem totes les combinacions possibles amb un mínim de dos enllaços d'hidrogen⁶⁶.

Així doncs, sembla que moltes seqüències podrien formar un motiu tipus *bi-loop*. El que sí és clar és que existeix una restricció en la mida, ja que la interacció mitjançant tètredes de solc menor només es pot donar en dos pisos, si bé els llaços es poden allargar o escurçar en un nucleòtid, com s'ha observat en altres estudis realitzats en el nostre grup de recerca¹⁶².

La gran similitud entre totes les estructures observades indica que les tètredes de solc menor imposen importants restriccions en l'estructura tridimensional del quàdruplex i, per tant, cal esperar que les estructures globals de noves seqüències que es puguin estudiar en un futur siguin altament semblants a les ja estudiades.

El fet que les tètredes de solc menor també hagin estat observades en altres contextos, com en els contactes entre dúplexs en els cristalls¹¹² i també en l'associació de bases dipositades sobre capes de grafit¹⁶³, indica que aquestes interaccions són estables i favorables i suporta la creença que aquest motiu podria ser de caràcter general.

6.3 La seva estabilitat

Respecte a l'estabilitat del *bi-loop*, podem extreure'n algunes conclusions analitzant els paràmetres termodinàmics de què disposem (Taula 6.2). Tot i així, hem d'anar en compte amb les comparacions ja que aquests paràmetres han estat extrets de la formació dels dímers en diferents medis i sabem que la presència de sals modifica l'estabilitat d'aquestes estructures, com es fa palès si comparem els paràmetres obtinguts per a l'oligonucleòtid d<pTGCTCGCT> mitjançant RMN a conc. ~5 mM en H₂O (entrada 4 de la taula) amb els obtinguts mitjançant la variació de la T_m enfront la concentració (de 7 a 160 μM) en medi Na₂PIPES 10 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂ (entrada 5).

	Seqüència	Tètrada	Medi	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol·K)	ΔG^0 (kJ/mol)
1	d<pCGCTCATT>	GCAT mixta	H ₂ O	-104 (±3)	-320 (±11)	-9
2	d<pTGCATGCA>	GCGC directa	H ₂ O	-224 (±12)	-624 (±47)	-38
3	d<pAGCTAGCT>	GCGC directa	H ₂ O	-226 (±13)	-673 (±54)	-25
4	d<pTGCTCGCT>	GCGC directa	H ₂ O	-187	-520	-32
5	d<pTGCTCGCT>	GCGC directa	medi salí 1*	-226	-582	-53
6	d<pCCGTCCGT>	GCGC desplaçada	H ₂ O	-221 (±4)	-625 (±17)	-35
7	d<pCATTCAATT>	ATAT directa	H ₂ O	-183	-570	-13
8	d<pCCTTCGGT>	GCGC despl. i GTGT directa	medi salí 2*	-146 (±1)	-387 (±8)	-24
9	d<pTCGTATGT>	Esp. 1: GCGC i GTGT despl. Esp. 2: GCGT desplaçada	medi salí 2*	-214 (±1)	-585 (±2)	-40
10	d<pCGCTCCGT>	GCCG	medi salí 3*	-184 (±13)	-487 (±34)	-39
11	d(TGCTTCGT)	GCCG	medi salí 3*	-208 (±14)	-649 (±38)	-15
12	d(TCGTTGCT)	GCCG	medi salí 3*	-217 (±13)	-677 (±42)	-15

* medi salí 1: Na₂PIPES 10 mM pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂. Medi salí 2: fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂. Medi salí 3: fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂. Càlcul dels paràmetres: entrades 1-3,6: càlcul poblacions per RMN. Entrades 4,7: càlculs indirectes RMN. Entrades 5,10-12: variació de la T_m amb la concentració. Entrades 8 i 9: anàlisi una única corba de fusió

Taula 6.2. Resum dels paràmetres termodinàmics associats a la formació dels dímers dels oligonucleòtids estudiats anteriorment¹¹⁰ (entrades 1 a 7) i els estudiats en aquesta tesi (entrades 8 a 12)

Si comparem els valors d'entalpia per als diferents *bi-loops*, podem estimar l'estabilitat de les diferents tètades que els formen. Així, de més a menys estables tindriem: GCGC directa \approx GCGC desplaçada \approx GCCG > GTGT desplaçada \approx GCGT desplaçada > GTGT directa \approx ATAT directa \approx GCAT. Aquesta estabilitat es pot explicar si es tenen en compte el nombre de ponts d'hidrogen que estableixen cada tipus de tètada: 8 ponts d'hidrogen per les tètades GCGC directa; GCGC desplaçada i GCCG, 6 i 7 ponts d'hidrogen, respectivament, per les tètades GCGT desplaçada i GTGT desplaçada, i 4 o 5 ponts d'hidrogen per a les tètades GTGT directa, ATAT directa i la tètada mixta GCAT. L'entropia per a la formació dels dímers es troba generalment en valors entre -500 i -600 J/mol·K, excepte per a d<pCGCTCATT>, que val aproximadament la meitat i podria estar relacionat amb el fet que aquest dímer presenta una menor simetria, i per als oligonucleòtids lineals, en què és major, en valor absolut, de 600 J/mol·K. Així, segons l'estabilitat general de les estructures, podem classificar els *bi-loops* en tres grans grups:

- Els més estables, que inclouen els oligonucleòtids cíclics estabilitzats per tètades amb parells G·C i també l'oligonucleòtid d<pTCGTATGT>, estabilitzat per parells G·C i G·T formant tètades desplaçades (d<pTGCATGCA>, d<pTGCTCGCT>. d<pCCGTCCGT>, d<pTCGTATGT> i d<pCGCTCCGT>).
- Els mitjanament estables, que inclouen els oligonucleòtids cíclics d<pAGCTAGCT> i d<pCCTT-CGGT>, el primer estabilitzat per tètades GCGC directes, però amb una adenina en la segona posició del llaç, i el segon estabilitzat per una tètada GCGC desplaçada i una GTGT directa.
- Els menys estables, que inclouen els oligonucleòtids cíclics d<pCGCTCATT> i d<pCATTTCATT>, estabilitzats per tètades que contenen parells A·T, i els oligonucleòtids lineals d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT), que es troben en aquest grup degut al major cost entròpic de formació del dímer.

6.4 Rellevància biològica

El *bi-loop* és un bon exemple d'autoreconeixement entre dúplexs de DNA i podria ser útil per entendre els processos biològics en què estan implicades estructures tetracatenàries, com per exemple la recombinació. Hem de tenir present que l'estructura central del *bi-loop* és bàsicament la d'un B-DNA, de manera que els contactes entre parells de bases via el solc menor es podrien donar en dúplexs de DNA sense gaires distorsions.

Tot i que de moment no tenim cap evidència de la seva existència *in vivo*, el gran nombre d'exemples de formes no canòniques que van aparèixer com a curiositat estructural i que posteriorment s'ha demostrat que tenen implicacions biològiques ens permet ser optimistes. Creiem que és possible que el *bi-loop* es formi *in vivo* i participi en processos de regulació o recombinació. Com ja s'ha dit a la introducció general, el més lògic és que l'evolució hagi aprofitat totes les estructures possibles del DNA per a la regulació de determinats processos biològics. Volem tornar a citar aquí a l'Alexander Rich, descobridor del Z-DNA i que ha dedicat tota la seva carrera a trobar-ne les funcions biològiques: *"Many felt that Z-DNA was a nonfunctional conformational phenomenon. My conviction was very simple. Here was an alternative DNA conformation, which could, in principle, form under in vivo*

conditions, and I felt it likely that it would be used because evolution is opportunistic. The challenge was to find out how it was used¹⁶⁴. Per això ens permetem realitzar algunes especulacions sobre la seva potencial funció biològica.

6.4.1 Interacció entre Loops

Les estructures forqueta (*hairpin loop* o *stem loop*) de l'RNA poden establir interaccions entre *loops* de bases desaparellades, donant lloc al que es coneix com *kissing loop complex*. Aquest tipus d'interacció pot constituir part de l'estructura terciària de l'RNA, pot servir com a element de reconeixement o es pot donar com a un primer contacte abans de la formació de dúplex d'RNAs, participant en diversos processos biològics importants¹⁶⁵. La interacció implica la formació d'enllaços d'hidrogen entre parells de bases complementàries (entre 2 i 7 bp), però no la interacció entre les quatre cadenes.

En el DNA, la presència de *hairpin loops* no és tan freqüent ja que generalment es troba formant una doble cadena. Els estudis *in vitro* sobre la seva estabilitat en funció de la seqüència són força nombrosos i han determinat que els llaços poden ser de només un nucleòtid, però que generalment són de 2-4 nucleòtids¹⁶⁶.

Com ja s'ha dit en la introducció general, seqüències amb repeticions directes o invertides (palindròmiques) poden formar estructures *hairpin* o cruciformes, respectivament. Aquest tipus de seqüències han estat observades en importants regions implicades en el control gènic i cel·lular¹⁶⁷, com regions promotores, d'unió de receptors o d'inici de la replicació. A més a més, algunes d'aquestes seqüències repetitives que poden formar forquetes estan associades a malalties d'expansió de repeticions²⁵.

El *bi-loop* podria ser un element de reconeixement entre *loops* de DNA que poden existir *in vivo*, de manera anàloga als *kissing complexes* d'RNA (Figura 6.4.A). En la Figura 6.4.B es mostra un model d'interacció entre dues forquetes iguals en què els llaços corresponen a l'oligonucleòtid lineal d(TGCTTCGT), L3, i el dúplex, a un fragment de quatre parells de bases.

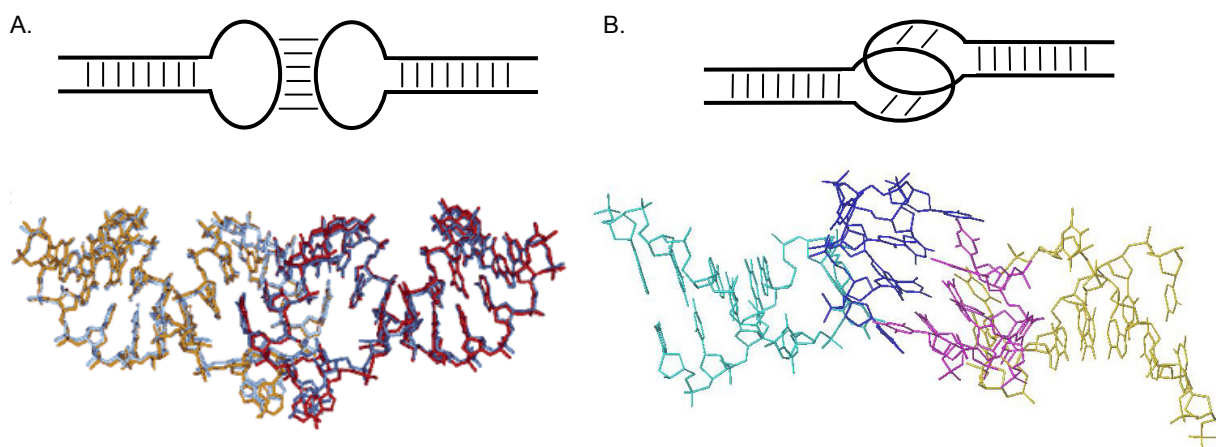


Figura 6.4. A. Esquema i estructura d'un "kissing loop" de l'element de dimerització d'RNA del HIV-1¹⁶⁸. B. Esquema i model d'interacció entre dues forquetes de seqüència 5'-GGATT-TGCTTCGT-TATCC-3' mitjançant formació d'un bi-loop.

6.4.2 Implicació en la recombinació homòloga

La recombinació homòloga és l'intercanvi de segments homòlegs entre dues molècules de DNA bicatenari i constitueix un procés de vital importància ja que té lloc durant la meiosi en les cèl·lules eucariotes per tal de generar diversitat i també és un mecanisme de reparació de dúplex trencats, encreuaments intercadena i forquetes de replicació danyades. La recombinació es produeix per mitjà d'un intermedi d'intercanvi tetracatenari, que és l'anomenat encreuament *Holliday junction*, però cal el reconeixement previ i l'alineació dels dos dúplex que han d'intercanviar els segments (Figura 6.5).

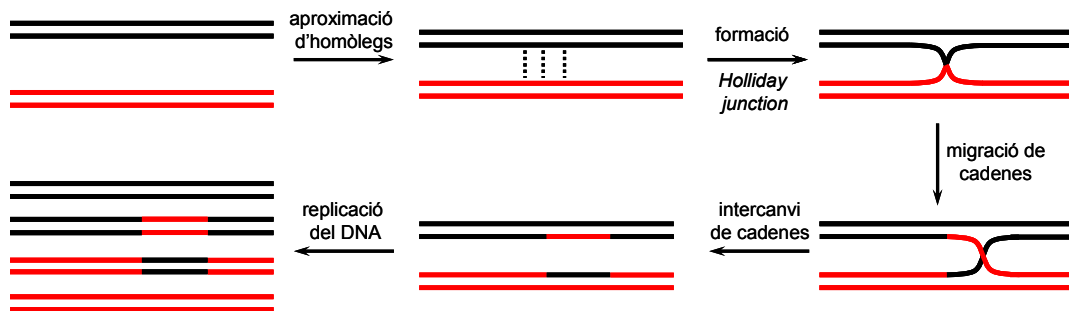


Figura 6.5. Recombinació homòloga a través d'un intermedi *Holliday junction*

Durant molts anys, s'havia pensat que la recombinació homòloga podia estar iniciada per la formació d'estructures quàdruplex estabilitzades per associació de parells WC¹⁶⁹ i s'havia proposat que aquesta associació de dúplex podia ser via el solc menor¹⁷⁰. Per això, la formació d'estructures tipus *bi-loop* podria ser un primer pas en el procés de recombinació, abans de l'intercanvi de cadenes a través de *Holliday junctions*.

En *Escherichia Coli*, la proteïna RecA està implicada en el procés de reconeixement anterior a la recombinació homòloga. Aquesta proteïna promou la unió entre un fragment de DNA de cadena senzilla i un dúplex de seqüència homòloga. La cadena senzilla forma un filament presinàptic amb la proteïna RecA polimeritzada i aquest filament inicia l'intercanvi de cadenes amb el seu homòleg a través d'un intermedi tricatenerari. La propagació de l'heterodúplex en el DNA de doble cadena que flanqueja el punt de sinapsi dona lloc a l'intermedi tetracatenari *Holliday junction* (Figura 6.6).

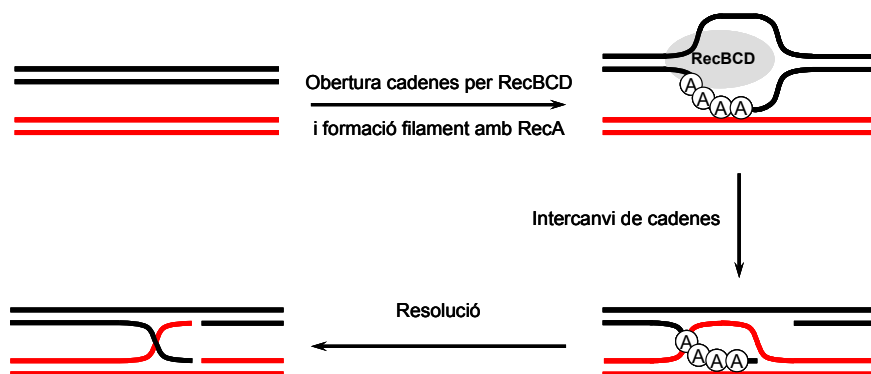


Figura 6.6. Recombinació homòloga mediada per RecA i RecBCD

Tot i que inicialment s'havia proposat una estructura tríplex per a l'intermedi mediat per RecA¹⁷¹, estudis posteriors han demostrat que existeix una interacció parcial entre el dúplex i la cadena senzilla a través del solc menor, seguida de posterior separació de les cadenes del dúplex abans del reconeixement de la cadena homòloga via parells WC¹⁷². Recentment aquest mecanisme s'ha confirmat amb la resolució de les estructures de RX dels complexos RecA amb l'ssDNA i RecA amb l'heterodúplex final¹⁷³.

Aquest tipus de proteïnes que afavoreixen la recombinació homòloga formen part de la família de les ATPases i estan altament conservades des dels bacteris fins als humans. Però el mecanisme d'acció no està del tot clar, ja que sembla ser que RecA també pot promoure la unió i l'intercanvi de cadenes entre dos dúplexs en condicions d'elevada concentració de magnesi¹⁷⁴. Es desconeix si aquest intercanvi té lloc a través dels dúplexs deshibridats i per interacció entre cadenes senzilles o si existeix un reconeixement dels dos dúplexs, que podria tenir lloc de manera puntual a través del solc menor via tètredes com les que nosaltres observem en els *bi-loops*. A més a més, la recombinació homòloga també pot tenir lloc en absència de RecA.

Els processos de recombinació independents de RecA semblen estar afavorits per la formació de certes estructures no canòniques que poden apropar els segments homòlegs que s'han d'intercanviar. Com ja s'ha comentat en la introducció, la formació d' H-DNA estimula la recombinació homòloga entre repeticions que es trobin a banda i banda de l'estructura²⁴. En aquesta línia s'ha descobert una estructura de tipus quàdruplex que estimula la recombinació homòloga i que podria tractar-se d'un quàdruplex estabilitzat via interaccions pel solc menor. Es va observar que la seqüència d(AATTC(GGATCC)₅G) forma un quàdruplex de guanina unimolecular paral·lel en condicions normals en solució. Però quan aquesta seqüència s'insereix en un plasmidi en condicions d'estrès superhelicoidal, dóna lloc a un altre tipus de quàdruplex¹⁷⁵, que els autors creuen que està estabilitzat per tètredes ATAT i GCGC. Si tenim en compte que els N7 de les guanines estan lliures, ja que són susceptibles a la modificació amb sulfat de dimetil, cal pensar que les tètredes formades no poden ser tètredes de guanina ni tètredes GCGC pel solc major, sinó que han de ser pel solc menor, deixant els N7 lliures i accessibles. Els mateixos autors van demostrar posteriorment que aquest quàdruplex unimolecular format per replegament de la seqüència estudiada indueix recombinació homòloga entre repeticions directes situades a banda i banda de l'estructura¹⁷⁶. Aquest quàdruplex desconegut podria ser una estructura tipus *bi-loop*, amb formació de tètredes de solc menor.

6.4.3 Implicació en la regulació de la transcripció

La regulació de la transcripció té lloc a diversos nivells. Per exemple, dos mecanismes reguladors molt estudiats són la remodelació de la cromatina per modificació de les histones o la metilació de seqüències reguladores. Un tercer nivell de regulació té lloc mitjançant la formació d'estructures no canòniques afavorides per un superenrotllament negatiu o positiu. L'expressió de múltiples gens està afectada per la formació d'estructures de quàdruplex de G en les regions promotores, incloent el

protooncogèn *c-myc*¹⁷⁷, altres protooncogèns¹⁷⁸ i diversos gens relacionats amb el desenvolupament muscular¹⁷⁹. Aquestes estructures poden activar o inhibir la transcripció (Figura 6.7).

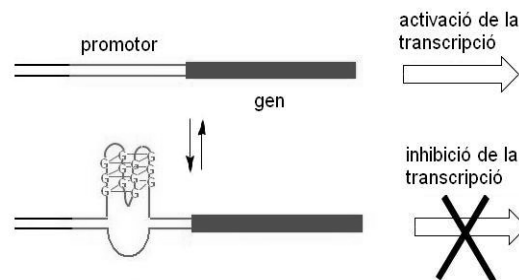


Figura 6.7. Model d'inhibició de la transcripció per formació d'un quàdruplex de guanina en la regió promotora

Existeix un grup de factors de transcripció que pertanyen a la família de proteïnes *basic (b) helix-loop-helix* (HLH) *leucine zipper* (Z) que s'uneixen a DNA. Les proteïnes d'aquest grup poden formar homodímers o heterodímers i s'uneixen a la mateixa capsula de transcripció: la E-box, de seqüència palindròmica consens d(CANNTG), inhibint o activant la transcripció i regulant el creixement cel·lular i la diferenciació en diversos teixits. Algunes d'aquestes proteïnes són generals a tots els teixits (s'anomenen per la lletra E i un número) i d'altres són específiques, generant un complex sistema de regulació de la transcripció basat en la formació d'aquests homodímers i heterodímers i la seva diferent afinitat per la diana E-box.

La diferenciació muscular i l'expressió de certes proteïnes específiques dels músculs és iniciada per la unió d'heterodímers de factors miogènics reguladors (MyoD, Myf-5, MRF4, que pertanyen a la família de factors de transcripció bHLH) amb proteïnes E a la capsula de reconeixement E-box. Els homodímers del MyoD i MRF4 s'uneixen a E-box amb menys afinitat i activen la transcripció menys eficientment que els heterodímers; però, en canvi, formen complexos més forts amb quàdruplexs bimoleculars de seqüències riques en guanines de regions promotores d'alguns gens musculars¹⁸⁰. El lloc d'unió tant per a la capsula E-box com per al quàdruplex de DNA és la regió bàsica de la proteïna MyoD¹⁸¹, que s'insereix en el solc major del DNA.

Així doncs, l'homodímer de MyoD pot formar complexos tant amb la capsula de reconeixement E-box, d(CANNTG), com amb quàdruplexs de guanina bimoleculars de seqüències reguladores, però no amb quàdruplexs unimoleculars ni amb les formes dúplex o forqueta d'aquestes regions riques en guanines¹⁸². Tot i que existeix una estructura resolta mitjançant cristal·lografia de Raigs X d'un complex de l'homodímer de MyoD amb un dúplex que conté la seqüència E-Box¹⁸³, nosaltres pensem que és molt curiós que el mateix homodímer s'uneixi a un dúplex de DNA i també a una estructura quàdruplex de guanina, i pensem que la seqüència E-box podria formar una estructura tipus *bi-loop* (veure Figura 6.8). Tot i que el quàdruplex de G i el *bi-loop* són estructures marcadament diferents, si la regió bàsica dels dímers dels factors de transcripció pot acomodar un quàdruplex bimolecular¹⁸¹, probablement també podrà acomodar un *bi-loop*, ja que és més compacte. El tipus de *bi-loop* que es formaria en principi estaria estabilitzat per dues tètredes desplaçades, una GCGC desplaçada, que ja

ha estat observada, i una potencial ATAT desplaçada, ja que l'ordre en la seqüència és 3'-pyr-pur-5'. És probable que l'estabilitat d'aquest *bi-loop* sigui relativament elevada, tot i que no sabem la contribució de la tètrada ATAT desplaçada. El problema per a la seva formació i observació *in vitro* és la competència amb el dúplex autocomplementari.

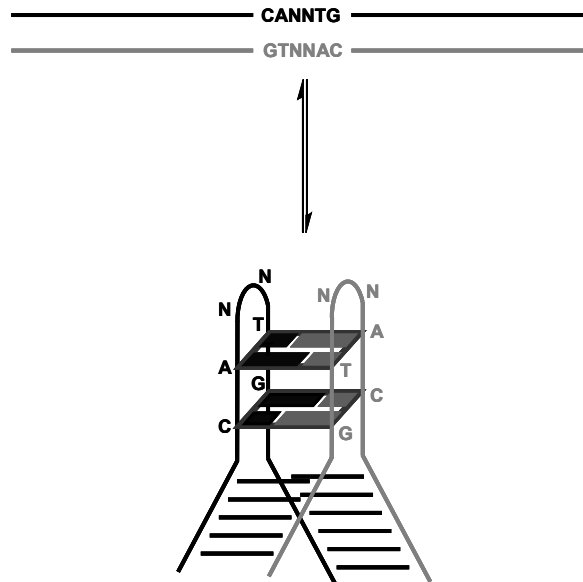


Figura 6.8. Possible formació d'un *bi-loop* en la capsa de reconeixement E-box

Cal comentar que existeixen altres estructures¹⁸⁴ resoltes d'altres membres d'aquesta família de proteïnes bHLH (o bHLHZ) unides a un dúplex de DNA amb la seqüència consens E-box en què s'observa que el DNA forma un dúplex pràcticament canònic, però aquests resultats no concorden amb estudis en què s'ha demostrat que alguns d'aquests dímers dobleguen el DNA cap al solc menor¹⁸⁵. El nostre model amb el *bi-loop* podria explicar aquesta curvatura. A més a més, cal tenir present que els estudis *in vitro* amb fragments de DNA relaxat poden no reflectir el que ocorre *in vivo* ja que probablement les regions promotores estan superenrotllades i afectades per aquest estrès superhelicoidal¹⁸⁶.

També existeixen altres seqüències en regions promotores altament conservades que, sobre el paper, podrien formar un *bi-loop*. Un primer exemple és la seqüència consens CC(AT)₆GG, amb l'hexanucleòtid de la regió central variable, que és l'element de la capsa CArG, reconeguda per moltes proteïnes entre les que destaca el factor de resposta del sèrum (SRF)¹⁸⁷. És interessant destacar que la capsa CArG s'uneix tant a la proteïna reguladora de la transcripció CBF-A com a una altra proteïna, qTBP42, que és homòloga a l'anterior i també reconeix quàdruplexs de G¹⁸⁸. Un segon exemple és la seqüència palindròmica TGACGTCA, reconeguda per la proteïna CREB (*cAMP responsive element-binding protein*), del grup de factors de transcripció bZ (*basic region leucine zipper*), que és clau per la transcripció regulada per missatgers secundaris¹⁸⁹.

En conclusió, la unió dels factors de transcripció a seqüències de DNA específiques és una etapa clau en l'activació de la transcripció. Aquesta especificitat sembla que pot venir donada per la

formació de diverses estructures no canòniques, com els quàdruplex de guanina. Davant de la gran complexitat de la regulació de la transcripció, com es demostra per exemple amb tot el grup de proteïnes que reconeixen la seqüència E-box d(CANNTG), però que poden discriminar entre nucleòtids diferents en les posicions centrals i activar o inhibir la transcripció, podria ser que el *bi-loop* es formés *in vivo* i fos responsable de l'activitat d'alguna d'aquestes proteïnes.

L'interès en desxifrar les interaccions dels factors de transcripció amb les seqüències promotores va més enllà de satisfer la curiositat per conèixer els complexos mecanismes de control de la transcripció donat que la seva alteració pot ser la causa de malalties¹⁹⁰.

6.5 Perspectives de futur

Per tal de poder avaluar la rellevància del *bi-loop* caldrà continuar treballant tant en l'aspecte estructural com en assajos per determinar-ne la seva existència *in vivo*.

Els estudis estructurals hauran d'anar encaminats a acabar d'explorar tota la versatilitat del motiu, però centrant-se tot el possible en seqüències amb potencial interès biològic. Crec que caldria acabar de caracteritzar totes les tètades possibles amb parells WC: la ATAT desplaçada, la ATTA, la mixta desplaçada (GCAT) i la mixta asimètrica (ATCG). També queda per estudiar la formació del motiu amb seqüències tipus d(NNRRNNYYNN), ja que en general ha estat estudiat en seqüències on els passos apilats eren RY o YR. Aquests estudis s'haurien de realitzar amb models cíclics ja que amb oligonucleòtids lineals el *bi-loop* és difícil d'observar degut a la seva baixa estabilitat i a la competència amb altres estructures. També cal establir fins a quin punt es poden allargar els llaços mantenint l'estructura del *bi-loop* i determinar quina conformació adopten i quina és la seva estabilitat. Es podrien utilitzar oligonucleòtids cíclics model o les seqüències lineals estudiades en aquesta tesi augmentant el nombre de timines en el llaç o en els extrems, amb seqüències del tipus $(T)_n$ TTGCT $(T)_n$ TCGT $(T)_n$ o $(T)_n$ TTCGT $(T)_n$ TGCT $(T)_n$. Roman també per observar la formació d'un *bi-loop* unimolecular per replegament d'una única cadena senzilla de DNA, anàlogament al que succeeix amb els quàdruplex de guanina.

També seria interessant des del punt de vista estructural, però orientat cap a la rellevància biològica, l'estudi d'alguna seqüència que contingui el *bi-loop* com a element d'autoreconeixement entre dos dúplex amb bases desaparellades. Per exemple, es podria estudiar la seqüència d(GGATT-TGCTTCGT-TATCC), mostrada en la Figura 6.4.B, que conté un fragment de dúplex i un llaç que es pot estructurar en forma de *bi-loop*. Una altra possibilitat seria veure si el motiu es podria formar com una interacció entre protuberàncies d'un dúplex.

Pel que respecta a la seva rellevància biològica, l'estudi d'interacció entre *loops* es podria prosseguir en funció de l'èxit o no dels estudis estructurals anteriorment mencionats. La implicació en la recombinació es podria avaluar amb experiments com els descrits per Kohwi i Panchenko²⁴, en què s'hauria d'inserir una seqüència formadora de *bi-loop* en un plasmidi i veure si afavoreix la recombinació entre seqüències homòlogues situades a banda i banda. Per últim, per poder inferir la implicació del *bi-loop* en la regulació de la transcripció, caldria demostrar que es pot formar en

seqüències naturals reguladores i, encara més important, caldria observar-ne la interacció amb factors de transcripció. Crec que s'hauria de començar aprofundint en l'extensa bibliografia sobre la regulació de la transcripció i s'haurien de realitzar cerques bioinformàtiques sobre potencials seqüències formadores de *bi-loop*. En segon lloc, se'n podrien modelar les interaccions amb factors de transcripció d'estructura coneguda o emprar tècniques experimentals per determinar la unió d'oligonucleòtids cíclics model amb les proteïnes escollides. Per últim, es podria intentar resoldre l'estructura d'un complex *bi-loop* - factor de transcripció.