

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

## RESULTATS I DISCUSSIÓ



**BLOC 2:**

**P**REPARACIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS  
PER CICLACIÓ ASSISTIDA PER MOTLLE



<b>1</b>	<b>Introducció i objectius</b>	<b>135</b>
1.1	Síntesi d'oligonucleòtids cíclics	135
1.1.1	Ciclació química en solució diluïda	135
1.1.2	Síntesis en fase sòlida	136
1.1.3	Ciclació assistida per motlle	137
1.2	Aplicacions dels oligonucleòtids cíclics	140
1.2.1	Aplicació terapèutica	140
1.2.2	Mecanisme cercle rodant	141
1.3	Objectius	142
<b>2</b>	<b>Síntesi dels oligonucleòtids lineals fosforilats</b>	<b>143</b>
2.1	Fosforilació en 5'	144
2.2	Fosforilació en 3'	145
2.3	Síntesi dels precursors lineals d(CGTACGeg <sub>6</sub> CGTACGeg <sub>6</sub> p) i d(ACGeg <sub>6</sub> CGTACGeg <sub>6</sub> CGTp)	146
2.4	Síntesi de d(GTCCCTCAp), d(CCCTCAGTp), d(pGTCCCTCA) i d(pCCCTCAGT)	146
2.5	Síntesi de d(TCGTTCGp), d(TGCTTCGp) i d(TCGTTGCTp)	148
2.6	El problema de la desfosforilació	148
<b>3</b>	<b>Assajos de ciclació amb models de dúplex</b>	<b>151</b>
<b>4</b>	<b>El <i>bi-loop</i> com a motlle per a la ciclació assistida</b>	<b>155</b>
4.1	<i>Bi-loop</i> heterolíneal	156
4.1.1	Estudi per DC de l'estructuració en les condicions de reacció	156
4.1.2	Proves de separació	157
4.1.3	Ciclació amb EDC	158
4.1.4	Ciclació amb CNBr i imidazole	159
4.1.5	Ciclació amb CNBr i MES	160
4.1.6	Anàlisi dels resultats	161
4.2	<i>Bi-loop</i> homolíneal	161
4.2.1	Anàlisi de les reaccions	162
4.2.2	Ciclació amb EDC	163
4.2.3	Ciclació amb CNBr i imidazole	166
4.2.4	Ciclació amb CNBr i MES	167
4.2.5	Anàlisi dels resultats	168
<b>5</b>	<b>Intent d'aplicació de la ciclació assistida per motlle a la fase sòlida</b>	<b>171</b>
5.1	Elecció del motlle i de les seqüències	172
5.2	Assaig en solució	173
5.3	Intents de ciclació d'un oligonucleòtid 3'-fosfat dièster	174
5.3.1	Intent de ciclació en fase sòlida	174
5.3.2	Intents de ciclació d'un model en solució	175
5.4	Exploració de nous suports per a la síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida	179

# 1 INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

## 1.1 Síntesi d'oligonucleòtids cíclics

Els primers oligonucleòtids cíclics d'origen sintètic van ser aïllats el 1958 per Khorana<sup>191</sup>, com a productes secundaris de reaccions d'homopolimerització de la timidina 5'-fosfat, quan treballava en la síntesi d'àcids oligotimidílics utilitzant el mètode del fosfat diester. A partir d'aleshores, s'han desenvolupat diverses aproximacions per a la seva preparació.

### 1.1.1 Cicllació química en solució diluïda

Les primeres síntesis dirigides cap a l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics es van produir als anys vuitanta i es van dur a terme en solució emprant el mètode del fosfat triester, tant per a l'elongació de la cadena com per a la ciclació<sup>192</sup>. Aquest mètode fa reaccionar derivats fosfat diester dels nucleòsids amb el grup hidroxil en 5' de la cadena en creixement. La reacció de ciclació intramolecular es realitza en solució en condicions molt diluïdes, amb l'oligonucleòtid totalment protegit, excepte en els extrems que han de reaccionar, i utilitzant com a agent de condensació l'1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT)<sup>192a,c</sup> o l'agent difosforilant fosfat de bis-(1-benzotriazolil) i 2-clorofenil (diOBt)<sup>192d</sup> (Figura 1.1). Amb aquesta metodologia s'han descrit síntesis tant d'oligodesoxiribonucleòtids com d'oligoribonucleòtids d'entre 2 i 8 residus.

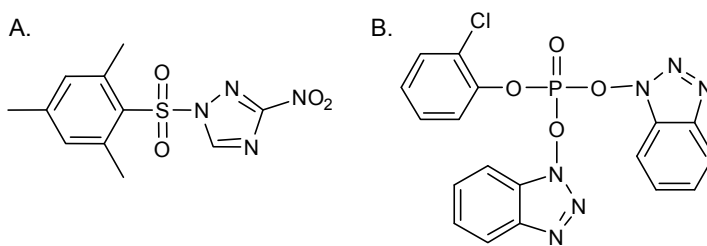


Figura 1.1. Agents condensants: A. MSNT. B. diOBt

Aquestes metodologies per formar enllaços fosfodiester tenen lloc en dissolvents orgànics anhidres, però la ciclació química també és possible en solució aquosa, amb el precursor lineal totalment desprotegit, si es realitzen reaccions específiques formant enllaços tipus fosforotioat<sup>193</sup>, pont disulfur<sup>194</sup>, amida<sup>195</sup>, oxima<sup>196</sup> o triazole<sup>197</sup> (usant les addicions Huisgen 1,3-dipolars, més conegudes com *click chemistry*).

### 1.1.2 Síntesi en fase sòlida

Un avenç molt important fou l'aplicació de mètodes en fase sòlida, que permeten l'ús de grans excessos de reactius per optimitzar els rendiments. Santacroce i col.<sup>198</sup> van ser els primers en descriure la síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids cíclics, emprant el mètode del fosfat triester. Aquest mètode tenia l'avantatge de treballar amb derivats molt estables, però les síntesis eren lentes i els rendiments no quantitius.

Sens dubte, la gran millora en la síntesi d'oligonucleòtids es va produir amb el desenvolupament de la metodologia del fosfit triester<sup>199</sup>, i més concretament amb l'ús de fosforamidits com a sintons<sup>73a</sup> i la seva aplicació a la fase sòlida<sup>73b</sup>. Santacroce va incorporar aquesta metodologia al seu esquema de síntesi d'oligonucleòtids cíclics<sup>200</sup>, mantenint el mateix sistema d'ancoratge a la fase sòlida que havia desenvolupat i la ciclació segons el mètode del fosfat triester. Aquest esquema es basa en ancorar l'oligonucleòtid al suport polimèric a través del grup amino exocíclic de la citosina, de forma que l'elongació de la cadena es pot realitzar en els dos sentits, en funció de si es desprotegeix el fosfat en 3' o l'hidroxil en 5' (Figura 1.2). La major limitació d'aquest mètode rau en el sistema d'ancoratge, que obliga a contenir en la seqüència almenys una citosina, única base amb el grup amino exocíclic prou nucleòfil, i no discrimina entre les seqüències lineals i les ciclades, que presenten la mateixa unió a resina i es desancoren conjuntament. Per tal d'aplicar la química del fosforamidit per a l'elongació de la cadena, fou necessari trobar un suport polimèric compatible tant amb aquesta química com amb l'etapa de ciclació amb MSNT<sup>200b,c</sup>: el copolímer de polietilenglicol-poliestirè (PEG-PS), conegut comercialment amb el nom de TentaGel.

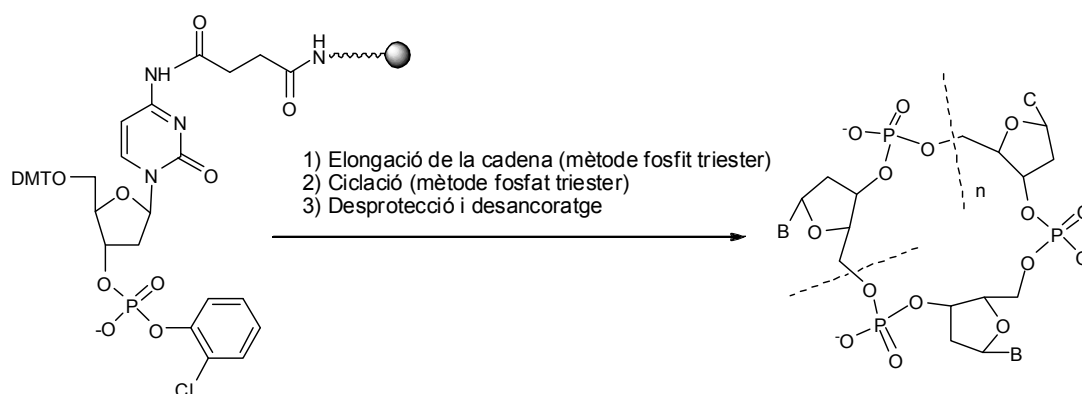


Figura 1.2. Esquema de síntesi d'oligonucleòtids cíclics en fase sòlida de Santacroce i col.

Al nostre grup de treball s'ha desenvolupat un mètode de síntesi d'oligonucleòtids cíclics en fase sòlida<sup>57</sup> que permet sintetitzar oligonucleòtids cíclics de petita i mitjana grandària (de 2 fins a 30 mer amb rendiments moderats) sense restricció de seqüència. La unió a la fase sòlida es realitza a través del grup fosfat en 3', l'elongació de la cadena utilitza el mètode del fosfit triester i la ciclació té lloc en fase sòlida en unes condicions de pseudodilució (veure esquema de síntesi a la pàgina 19). El gran avantatge del mètode rau en el desancoratge selectiu dels oligonucleòtids ciclats envers els productes lineals o possibles productes de reacció intercadena, ja que s'escindeixen selectivament

els enllaços fosfat triester (unió dels cicles a la resina) envers els diester (unió de les cadenes no ciclades a la resina). Aquesta metodologia, que s'ha aplicat per a la síntesi dels oligonucleòtids cíclics descrits en el primer bloc i ja s'ha explicat amb detall en el capítol 3 del bloc 1, es resumeix breument en la Figura 1.3. Metodologies similars s'han aplicat també per a la síntesi d'RNAs cíclics<sup>201</sup> i d'anàlegs cíclics de PNAS o quimeres DNA-PNA<sup>202</sup>.

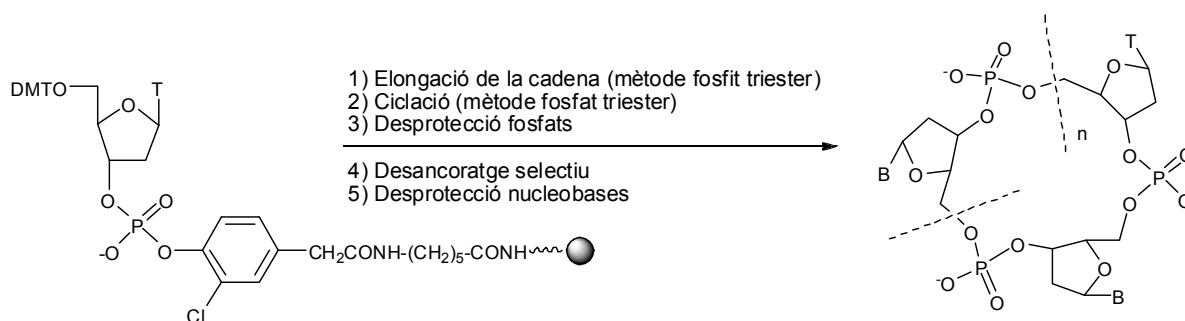


Figura 1.3. Esquema de síntesi d'oligonucleòtids cíclics en fase sòlida desenvolupat en el nostre grup

### 1.1.3 Ciclació assistida per motlle

Els esquemes sintètics descrits, tant en solució com en fase sòlida, només permeten l'obtenció de cicles de grandària petita i mitjana, ja que a mesura que la cadena oligonucleotídica es fa més llarga, més alt és el cost entròpic perquè es trobin els extrems. Per a l'obtenció de cicles més grans s'han desenvolupat metodologies que es basen en la utilització d'un motlle que preorganitza la cadena del precursor lineal de forma que els extrems a unir queden propers en l'espai. Aquesta aproximació es coneix amb el nom de *template assisted ligation* (condensació assistida per motlle) i permet la ciclació en solució aquosa d'oligonucleòtids totalment desprotegits, que es pot realitzar tant per mètodes químics com per mètodes enzimàtics. Com a agents acoblants s'han emprat carbodiimides solubles (com la *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida, EDC)<sup>203</sup>, CNBr<sup>204</sup> o *N*-cianoimidazole<sup>205</sup>, per a la ciclació d'oligonucleòtids tant 3'-fosfat com 5'-fosfat. Alternativament també s'han emprat fosfats diester preactivats en forma d'ester de *N*-hidroxibenzotriazole<sup>206</sup> o fosforoimidazolidat<sup>207</sup>. Els mètodes enzimàtics empen DNA lligases<sup>51,53b</sup> que requereixen d'oligonucleòtids fosforilats en 5' i presenten la limitació d'una alta especificitat envers el substrat, que es tradueix en la impossibilitat d'introduir modificacions químiques i en restriccions en la mida i les seqüències.

La ciclació assistida per motlle permet la formació d'enllaços fosfodiester en medi aquós, superant la competència de l'H<sub>2</sub>O com a nucleòfil pel fosfat activat gràcies a l'aproximació dels extrems que han de reaccionar, de manera que l'hidroxil pot capturar el fosfat activat abans que s'hidrolitzi.

Per a la formació d'una estructura que aproximi els extrems a unir ens podem valdre d'una hibridació amb una altra cadena (motlle extern) per formació de dúplex o tríplex, o podem aprofitar l'autoestructuració del precursor lineal (motlles interns de diversos tipus) (veure Figures 1.4 i 1.5). Basant-se en les reaccions de polimerització sobre motlles, Shabarova i col. van descriure<sup>208</sup> ciclacions químiques assistides per motlle extern per formació de dúplex entre el motlle i els extrems de l'oligonucleòtid a ciclar, aproximació que ha estat molt emprada per a la preparació d'oligonucleòtids cíclics per a diversos usos (Figura 1.4.A). Posteriorment Kool va descriure la

utilització de motlles externs purínics per ciclar químicament oligonucleòtids amb dos segments polipirimidínics<sup>209</sup>, aproximant els extrems per formació d'una triple hèlix de motiu paral·lel (pirimidina-purina-pirimidina) (Figura 1.4.B). Aquest tipus d'estructuració també s'ha emprat per a la condensació de dos fragments lineals<sup>210</sup> i posteriorment s'ha proposat l'ús d'una triple hèlix de motiu antiparal·lel (pirimidina-purina-purina), de manera que un fragment lineal polipirimidínic serveix de motlle per ciclar un oligonucleòtid amb dos fragments polipurínics<sup>211</sup>.

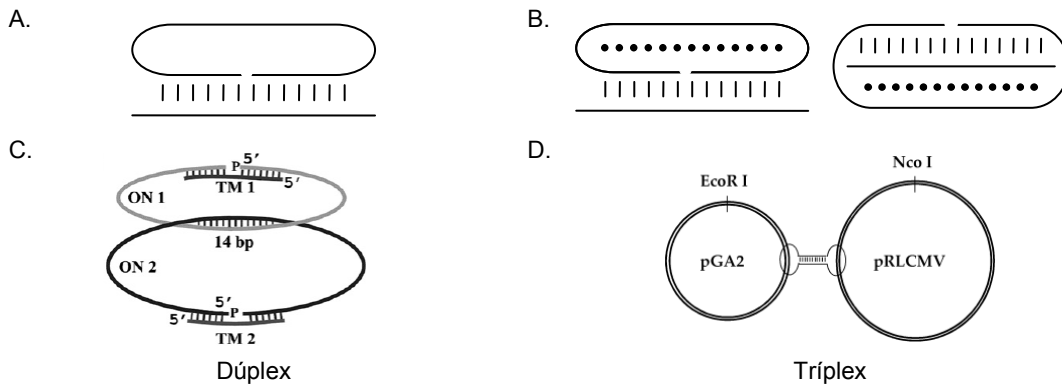


Figura 1.4. Estratègies de ciclació dirigides per motlles externs

Per altra banda, s'han descrit ciclacions gràcies a l'autoestructuració en forma de dúplex (motlle intern), ja sigui partint d'un únic precursor lineal estructurat en forma de *nicked dumbbell*<sup>53b,54,212</sup> (Figura 1.5.A) com per unió en dos punts de dues seqüències lineals convenientment estructurades<sup>51</sup> (Figura 1.5.B), que s'ajusten perfectament com dues peces d'un trencaclosques i els extrems de les quals reben el nom d'extrems cohesius (*sticky ends*). Aquesta estructura *dumbbell* pot contenir llaços no nucleotídics, derivats d'etilenglicol<sup>213</sup> o estilbèdicarboxamida<sup>214</sup>, o fins i tot ponts disulfur que uneixen les dues cadenes amb la mínima longitud, de manera que no formen un llaç sinó un pont (*sausage DNA*)<sup>215</sup> (Figura 1.5.C).

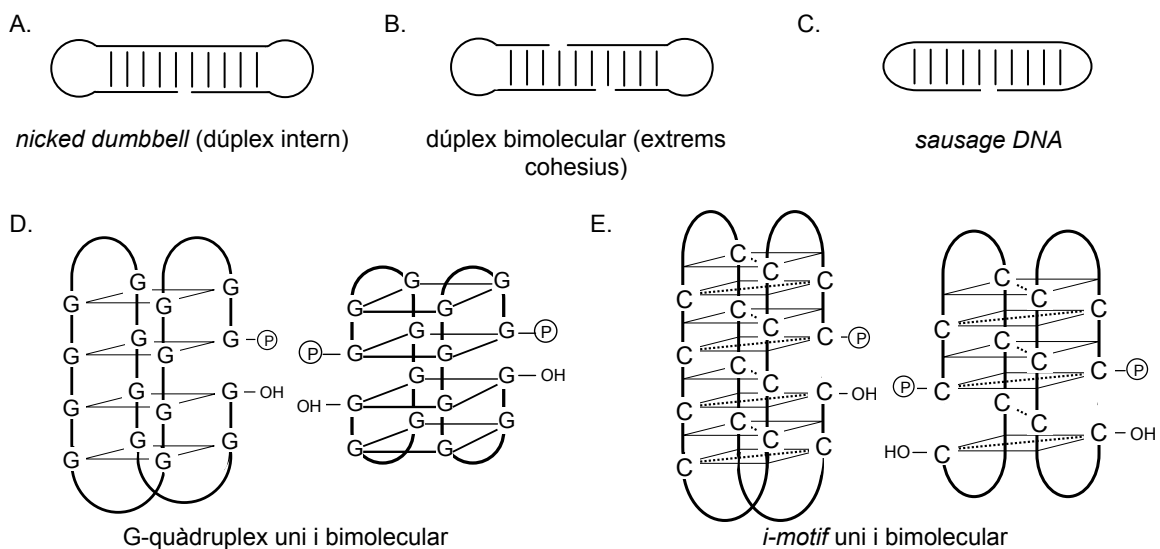


Figura 1.5. Estratègies de ciclació dirigides per autoestructuració (motlles interns)



Amb les aproximacions sintètiques anteriorment citades no es poden obtenir cicles <20 mer, ja que és necessària una forta hibridació entre la seqüència i el motlle. Nogensmenys, posteriorment han aparegut mètodes de ciclació assistits per motlles més petits com són el quàdruplex de guanina<sup>216</sup> (Figura 1.5.D) o l'*i-motif*<sup>217</sup> (Figura 1.5.E), en què s'ha arribat a ciclar fins a un 9 mer<sup>217b</sup>. En aquests casos es tracta de motlles interns i inclouen tant l'estructuració d'una única seqüència que es lliga per aproximació dels seus extrems<sup>216b,217b</sup>, com de dues seqüències lineals que s'autoestructuren de forma que es cicleu les dues a la vegada<sup>216a,217a</sup>.

Més recentment, l'autoestructuració en forma de G-quàdruplex unimolecular s'ha aprofitat per realitzar la lligació química dels *loops* de la seqüència telomèrica humana en solució en medi K<sup>+</sup>, per tal de deduir quina és l'estructura que adopta a partir del producte cíclic format<sup>218</sup> (Figura 1.6). En aquest cas ha funcionat millor la formació d'un enllaç pirofosfat entre dos fosfats terminals, atesa la separació dels extrems a ciclar (~7Å).

Així mateix, la ciclació assistida per motlle també s'ha emprat amb èxit per a la preparació d'estructures més complexes, com poden ser estructures ramificades<sup>219</sup>, un cicle unit a una doble cadena<sup>220</sup>, dos cicles de cadena senzilla entrellaçats<sup>221</sup> (Figura 1.4.C) o la unió de dos plasmidis a través d'un oligonucleòtid cíclic<sup>222</sup> (Figura 1.4.D).

Per a la preparació d'RNA circular s'han emprat també aproximacions de ciclació assistida per motlle (autoestructuració<sup>223</sup>, formació de dúplex externs<sup>224</sup> o de tríplex<sup>225</sup>, mitjançant lligació química o enzimàtica) o bé la transcripció enzimàtica d'oligodesoxiribonucleòtids circulars<sup>226</sup>. Però la síntesi d'RNA circular presenta dificultats addicionals respecte a la de DNA a causa de la pròpia inestabilitat enzimàtica i a la facilitat amb què es poden produir migracions del fosfat de 3' a 2'; per aquest motiu en alguns casos la lligació s'ha dut a terme en un punt en què s'ha introduït un 2'-desoxinucleòtid<sup>225</sup>.

Tot i que existeixen certes restriccions de seqüència, les estratègies de ciclació assistida per motlle són les més adequades per a la preparació d'oligonucleòtids grans, a partir de 30 i fins a 150 nucleòtids de grandària; aquests últims obtinguts amb una estratègia convergent partint de dos precursors lineals. La lligació assistida per motlle també es pot aplicar per a la ciclació d'oligonucleòtids, convenientment funcionalitzats, mitjançant un enllaç que no sigui fosfat dièster i que pot ser fosforotioat dièster<sup>227</sup>, fosforoselenoat dièster<sup>228</sup>, pirofosfat<sup>229</sup>, fosforamidat<sup>206</sup>, pont disulfur<sup>230</sup> o triazole<sup>231</sup>.

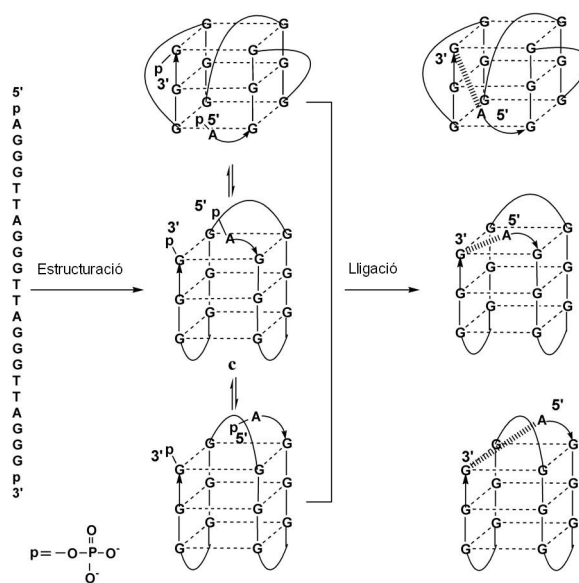


Figura 1.6. Representació esquemàtica dels quàdruplexs que es podrien formar i dels productes de lligació als que donarien lloc

### 1.1.3.1 Altres aplicacions de la lligació assistida per motlle

La lligació assistida per motlle s'ha emprat àmpliament com a mètode de detecció de determinades seqüències de DNA o RNA. Aquests tipus de sondes es basen en un reconeixement específic de la diana i posterior lligació produïda gràcies a la hibridació<sup>232</sup>. Aquesta lligació pot ser tant enzimàtica com química, especialment emprant reaccions d'autolligació<sup>233</sup>, i pot conduir a la formació de cicles si es lliguen els extrems d'una única cadena que han quedat propers en l'espai en hibridar-se amb la diana. Són les anomenades sondes circularitzables (*C-probes*)<sup>234</sup>, que queden unides topològicament a la seva diana, ja sigui per ciclació al voltant d'una cadena simple o doble de DNA (sondes candau o *padlock probes*) o per ciclació al voltant d'una de les cadenes d'un dúplex (formant el que es coneix com arracada o *earring*). L'avantatge d'aquestes sondes és que es poden amplificar mitjançant el mecanisme del cercle rodant<sup>235</sup> (veure apartat 1.2.2).

A més a més, la condensació del DNA assistida per motlle és un procés clau en camps tan diversos com la biologia molecular, en què s'empra per a la preparació del DNA recombinant<sup>236</sup>, o la nanotecnologia, per a la preparació i l'encaix de diverses formes i disposicions amb estructures determinades<sup>237</sup>.

Per últim, comentar que la capacitat del DNA d'hibridar-se específicament amb la seva seqüència complementària també ha estat explotada per dur a terme reaccions orgàniques específiques entre grups disposats en els extrems de dues cadenes complementàries, aproximació coneguda com a síntesi assistida per DNA (*DNA-templated organic synthesis*, Figura 1.7)<sup>238</sup>. Aquesta aproximació utilitza l'estratègia de la natura d'augmentar la molaritat efectiva dels reactius mitjançant l'ús de motlles macromoleculars i permet traduir seqüències de DNA en molècules orgàniques complexes.

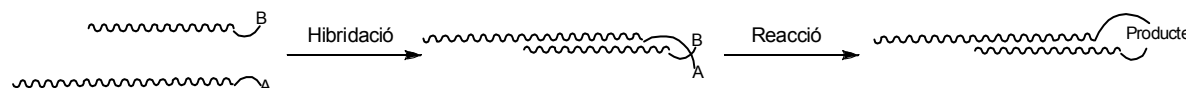


Figura 1.7. Reacció entre molècules conjugades a oligonucleòtids (DTS)

## 1.2 Aplicacions dels oligonucleòtids cíclics

A part de l'aplicació dels oligonucleòtids cíclics sintètics com a models estructurals, que ja s'ha comentat a la introducció general, aquests també presenten propietats interessants per a la seva aplicació terapèutica i com a motlles per a la replicació i transcripció del cercle rodant.

### 1.2.1 Aplicació terapèutica

L'ús d'oligonucleòtids com a agents terapèutics constitueix una atractiva alternativa als tractaments tradicionals, des que l'any 1978 Zamecnik i Stephenson van demostrar la viabilitat d'aquesta estratègia en inhibir la replicació del virus del sarcoma de Rous mitjançant un oligodesoxiribonucleòtid de 13 bases<sup>239</sup>. Els oligonucleòtids poden establir interaccions específiques amb altres cadenes d'àcids nucleics, donant lloc a la formació de complexos que poden interferir en els processos d'expressió gènica. En funció de la diana a la qual es dirigeixen, existeixen diverses estratègies terapèutiques:

- En la **teràpia antigen**<sup>240</sup>, un oligonucleòtid s'uneix al DNA bicatenari dels cromosomes i, formant una triple hèlix, bloqueja la transcripció de la informació gènica a RNA missatger.
- En la **teràpia antisentit**<sup>241</sup> els oligonucleòtids es dirigeixen a l'mRNA. La formació del complex oligonucleòtid-mRNA inhibeix la traducció a proteïnes, ja sigui per activació de l'enzim RNAsa H, que degrada la molècula de mRNA, o per bloqueig estèric.
- Els oligonucleòtids anomenats **aptàmers**<sup>242</sup> s'uneixen de manera específica a proteïnes o a altres molècules, modificant-ne la seva activitat. Un cas concret d'aquesta estratègia és dirigir-se als factors de transcripció que controlen la formació del mRNA, estratègia que s'ha anomenat **sentit**. En el cas que els oligonucleòtids puguin segrestar totalment les proteïnes i privar-les de la seva funció, s'anomenen oligonucleòtids esquer (decoys).

En aquest camp, els oligonucleòtids cíclics representen una aposta interessant ja que presenten millors propietats que els seus anàlegs lineals. En primer lloc, són resistents a les exonucleases, que són les nucleases més actives<sup>243</sup>, de forma que la seva vida mitjana és molt més llarga que la dels seus anàlegs lineals no modificats<sup>244</sup>, i en tenir enllaços fosfodiester naturals eviten possibles problemes de toxicitat i mutagenicitat que es poden donar en emprar oligonucleòtids modificats. A més a més, també presenten una major resistència a les endonucleases que els seus anàlegs lineals<sup>245</sup>. Però el més important per a l'aplicació dels oligonucleòtids cíclics és que presenten major afinitat<sup>209b,210</sup> i selectivitat<sup>209a,246</sup> per a la seva diana formant estructures triple hèlix, gràcies a la preorganització en forma de cicle. A més a més, també presenten una millor absorció cel·lular<sup>247</sup>. Així, aconsegueixen superar les majors dificultats per a l'aplicació terapèutica dels oligonucleòtids: baixa estabilitat en el medi cel·lular, baixa permeabilitat i afinitat insuficient per la diana. Gràcies a aquestes propietats, els oligonucleòtids cíclics han estat aplicats en la teràpia antigen<sup>248</sup>, antisentit<sup>249</sup>, com a aptàmers<sup>250</sup> i, més concretament, com a esquers de factors de transcripció<sup>251</sup>.

### 1.2.2 Mecanisme del cercle rodant

Les DNA polimerases copien cadenes partint d'una petita seqüència que fa d'iniciador (*primer*) i utilitzant com a motlle una cadena complementària. En el cas que el motlle sigui un cercle, el normal seria que la polimerasa s'aturés després de la primera volta perquè la presència de la cadena que acaba de sintetitzar no la deixa continuar. Però en cercles de mida relativament petita<sup>252</sup> (des de 13 a 150 nucleòtids), la polimerasa pot avançar realitzant múltiples còpies del cercle unides una rere l'altra<sup>253</sup> (Figura 1.8). Aquesta propietat es coneix amb el nom de mecanisme del cercle rodant (*Rolling Circle Mechanism*) i la presenten tant les DNA polimerases (replicació del cercle rodant)<sup>253a,c</sup> com les RNA polimerases (transcripció del cercle rodant)<sup>253b</sup>.

D'aquesta propietat, se'n poden extreure múltiples aplicacions, entre les quals l'obtenció de quantitats amplificades de DNA i RNA multimèrics<sup>254</sup>, que poden codificar seqüències peptídiques repetitives<sup>255</sup>

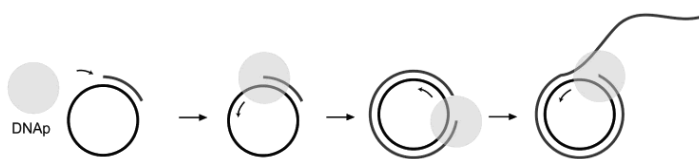


Figura 1.8. Mecanisme del cercle rodant

o ser digerides adequadament per obtenir oligodesoxi- o oligoribonucleòtids de seqüència curta i definida<sup>256</sup>. El mecanisme del cercle rodant també ha estat extensament aplicat a l'amplificació de senyals (*Rolling Circle Amplification*, RCA), com una alternativa a temperatura constant de la PCR: senyals provinents de la detecció de mutacions<sup>257</sup>, detecció d'antígens (immuno RCA)<sup>258</sup> o de seqüències específiques de DNA mitjançant sondes circularitzables (*padlock probes*)<sup>259</sup> o mitjançant balises moleculars (*molecular beacons*)<sup>260</sup>.

### 1.3 Objectius

Els dos grans objectius plantejats en aquest bloc de la tesi doctoral són:

1- Emprar el motiu *bi-loop* com a motlle per a la ciclació assistida. Aquest objectiu s'ha abordat des de dues perspectives: el *bi-loop* com a motlle extern per ciclificar un oligonucleòtid lineal que s'estructuri gràcies a la presència d'un cicle (*bi-loop* heterolíneal), i el *bi-loop* com a motlle intern per ciclificar dues unitats d'oligonucleòtid lineal que s'autoestructuren en forma de dímer (*bi-loop* homolíneal).

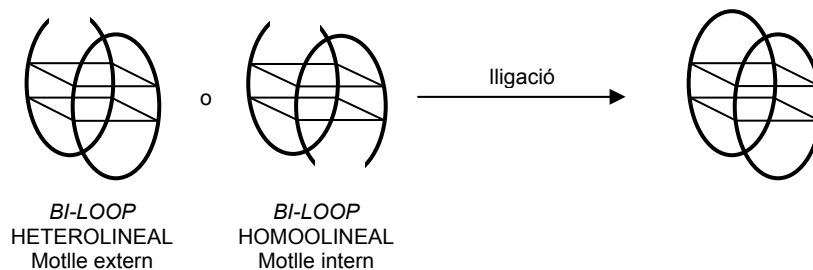


Figura 1.9. El *bi-loop* com a motlle per a la ciclació assistida

Per dur a terme aquest objectiu, primer es van realitzar uns assajos amb uns petits dúplexs model per posar a punt la metodologia i les condicions de reacció, que s'explicaran en el capítol 3. Els intents de ciclació amb el *bi-loop* com a motiu estructurador s'explicaran en el capítol 4. Abans es dedicarà un capítol, el proper, a explicar la preparació dels oligonucleòtids lineals fosforilats en un dels seus extrems, precursors necessaris per als estudis de ciclació.

2- Aplicar la ciclació assistida per motlle a la fase sòlida, de manera que el precursor lineal romangui unit al suport sòlid, mentre els seus extrems són apropats en l'espai mitjançant l'estructuració amb la seqüència motlle. D'aquesta manera s'intenta superar les limitacions de mida del cicle del mètode de síntesi en fase sòlida desenvolupat al nostre grup gràcies a l'ajuda del motlle i aprofitar els avantatges de treball i purificació que comporta aquesta. Aquest segon objectiu s'explicarà en el capítol 5.

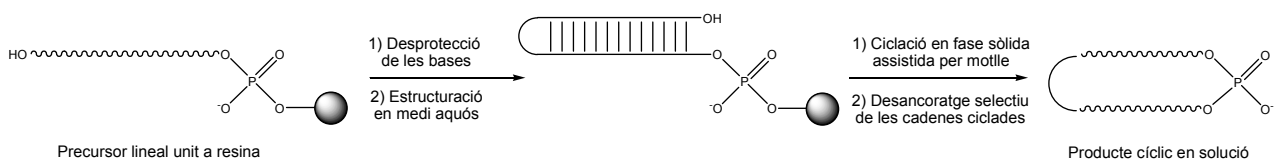


Figura 1.10. Representació esquemàtica de la metodologia de ciclació assistida per motlle en fase sòlida

## 2 SÍNTESI DELS OLIGONUCLEÒTIDS LINEALS FOSFORILATS

---

Per dur a terme reaccions de ciclació d'oligonucleòtids mitjançant un enllaç natural fosfat dièster, cal partir dels precursors lineals fosforilats en un dels seus extrems: ja sigui en 3' o en 5'. Per a la seva preparació existeixen metodologies estàndard que són compatibles amb les síntesis automàtiques en un sintetitzador, com s'explicarà a continuació. Respecte a quina reacció de ciclació és més favorable, si l'extrem fosforilat és el 3' i l'hidroxil primari en 5' realitza l'atac nucleòfil o si és l'hidroxil secundari en 3' que reacciona sobre un grup fosfat primari, no existeixen conclusions definitives. A la literatura trobem nombrosos exemples de totes dues aproximacions. Kool explica<sup>209c</sup> que per a la ciclació assistida per formació de triple hèlix totes dues orientacions són possibles, ja que les ha emprat amb èxit en els dos casos. Però altres autors<sup>54,219a,261</sup> asseguren que funciona millor la ciclació amb la fosforilació en l'extrem 3'. En principi aquest fet és fàcilment explicable per la major nucleofília de l'hidroxil primari en 5' enfront de l'hidroxil secundari de l'extrem 3', però, a més a més, Shabarova<sup>261</sup> ho atribueix a què el fosfat en 5' té més llibertat conformacional i, consegüentment, està més exposat per a la hidròlisi, una vegada activat. Kushlan<sup>54</sup> també remarca el fet que els fosfats activats en 5' pateixen desfosforilació, com ho demostra la pèrdua del senyal del fosfat monoèster en l'espectre de <sup>31</sup>P-RMN.

Per altra banda, existeixen nombrosos exemples<sup>204,216,217</sup> de ciclacions químiques en què l'extrem fosforilat és en 5', especialment en els casos en què es formen motlles interns petits, tipus G-quàdruplex o *i-motif*, i s'empra *N*-cianoimidazole com a reactiu<sup>216,217</sup>. A més a més, recentment s'ha descrit la ciclació d'un precursor lineal estructurat en forma de tríplex que només té lloc si l'extrem fosforilat és en 5', mentre que pràcticament no s'observa producte cíclic partint del precursor lineal fosforilat en 3' (<5%)<sup>211d</sup>. En el cas d'emprar mètodes enzimàtics, cal que l'extrem fosforilat sigui el 5' ja que és el substrat que necessita l'enzim per realitzar la lligació.

Probablement aquestes diferències es relacionin amb les diferents estructures emprades com a motlle i la orientació i proximitat dels extrems que han de reaccionar, ja que la disposició afecta enormement el rendiment de l'acoblament. La disminució d'aquest rendiment a causa de la pertorbació de l'estructura al voltant de la posició de lligació varia segons el reactiu d'acoblament (més acusat per CNBr que per EDC<sup>261</sup>) i és probable que també canviï segons quin és l'extrem que es

troba fosforilat. Per aquests motius, nosaltres ens vam plantejar, en un primer moment, de preparar els precursors lineals fosforilats tant en 3' com en 5' i d'assajar totes dues aproximacions per a la ciclació amb el motiu *bi-loop*.

## 2.1 Fosforilació en 5'

Per a la fosforilació en 5' s'ha emprat el reactiu desenvolupat per Horn i Urdea<sup>262</sup>: 2-[2'-O-(4,4'-dimetoxitritiloxi)etil-sulfonil]etil-2-cianoetil-*N,N*-diisopropil-fosforamidit (*Chemical Phosphorylation Reagent I*, Figura 2.1.A), ja que és totalment compatible amb la química del fosforamidit i és possible utilitzar-lo en el sintetitzador automàtic en les mateixes condicions que un fosforamidit d'un nucleòsid estàndard. A més a més, permet la monitorització del rendiment d'acoblament a partir de la quantificació del catió DMT alliberat i incorpora un grup protector que s'elimina en el tractament final amb NH<sub>3</sub> aquós per β-eliminació (Figura 2.2).

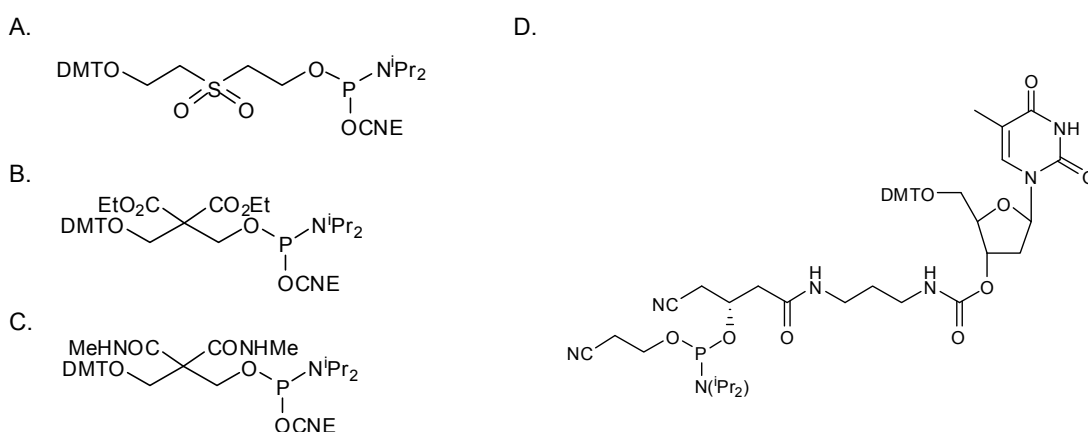


Figura 2.1. Reactius fosforilants en 5': A. CPG I. B: CPG II. C. CPG II sòlid. D. Derivat nucleosídic

Precisament el problema és que el protector en 5' s'elimina amb el tractament d'amonòlisi i no permet sintetitzar oligonucleòtids amb l'extrem 5' protegit amb el DMT (*DMT on*), aproximació molt utilitzada quan es sintetitzen oligonucleòtids llargs per tal de facilitar-ne la purificació mitjançant cromatografia en fase inversa.

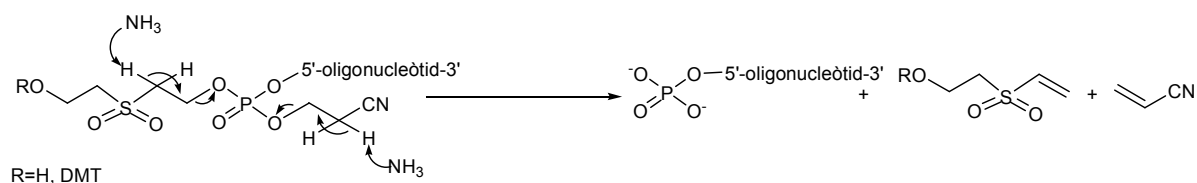


Figura 2.2. Mecanisme de β-eliminació per a la desprotecció del fosfat en 5' (CPR I) amb NH<sub>3</sub>aq

Per solucionar-ho, existeix un reactiu fosforilant de segona generació<sup>263</sup>: el 3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)-(2,2-dicarboxietil)propil-2-cianoetil-*N,N*-diisopropil-fosforamidit (*CPR II*; Figura 2.1.B). Aquest reactiu permet l'eliminació del grup DMT al sintetitzador i posterior eliminació del grup protector de l'hidroxil en 5' durant l'amonòlisi o bé la conservació del grup DMT per a la posterior purificació. L'eliminació del protector en 5' només es pot dur a terme quan l'hidroxil en 5' està lliure, després d'haver eliminat

el grup DMT, amb un tractament amb amoníac aquós 0.1 M mitjançant una reacció retroaldòlica eliminant formaldehid i un posterior  $\beta$ -eliminació (Figura 2.3).

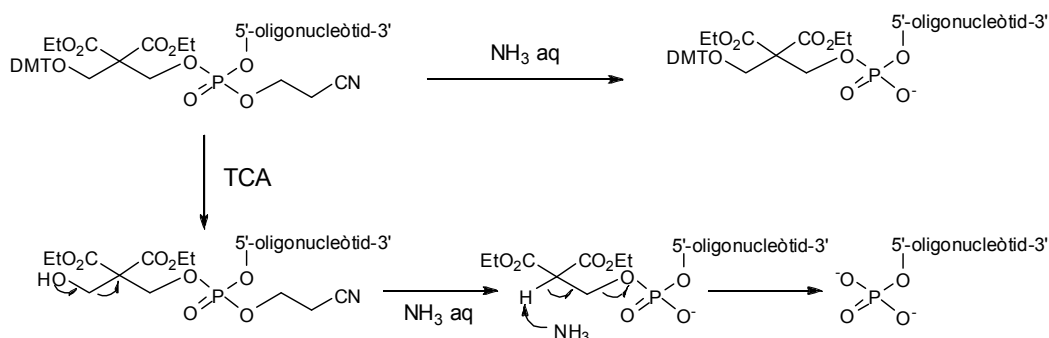


Figura 2.3. Mecanisme per a la desprotecció del fosfat en 5' (CPR II)

Aquests dos reactius, però, presenten la limitació experimental de ser olis densos difícils de manipular. Existeix un tercer reactiu<sup>264</sup>, molt similar al segon però que presenta dos grups metilamida en lloc d'etilester (Figura 2.1.C). Aquest reactiu és sòlid i, a més a més, més estable a les condicions de síntesi d'oligonucleòtids. Tot i que s'ha comercialitzat recentment, es segeixen realitzant esforços per a l'obtenció d'agents fosforilants en 5' que puguin ser emprats en el sintetitzador en condicions estàndard i siguin sòlids, com el desenvolupat per Leuck. *et al.*<sup>265</sup>, que conté un nucleòsid de timidina ancorat en  $\alpha$  en un dels dos cianoetils que protegeixen el fosforamidit (Figura 2.1.D).

## 2.2 Fosforilació en 3'

Els mateixos reactius emprats per fosforilar en 5' es podrien utilitzar per a la fosforilació en 3', acoblant-los com a primer fosforamidit sobre un suport polimèric derivatitzat amb qualsevol nucleòsid (Figura 2.4).

Després de l'etapa de destitilació, s'acoblaria el primer nucleòtid de la

seqüència i s'elongaria la cadena de forma normal. En el tractament final amb  $\text{NH}_3$  aquós s'alliberaria l'oligonucleòtid fosforilat per  $\beta$ -eliminació de l'etilsulfona en 3' (veure mecanisme de  $\beta$ -eliminació a la Figura 2.2). Partint d'aquesta idea es va desenvolupar un suport polimèric, ara comercial, que és el que s'ha emprat en aquest treball per a la síntesi d'oligonucleòtids lineals fosforilats en 3': 2-[2'-O-(4,4'-dimetoxitritiloxi)etilsulfonil]etil-2-succinil-*lcaa*-CPG (Figura 2.5).

El desancoratge de l'oligonucleòtid d'aquesta resina requereix un tractament amb  $\text{NH}_3$  aquós de 2 h a temperatura ambient, i l'elimi-

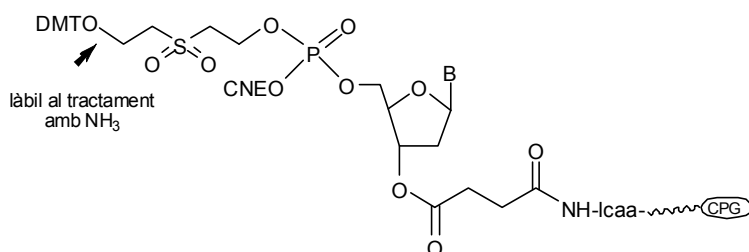


Figura 2.4. Ús de l'agent fosforilant CPR I per a la fosforilació en 3'

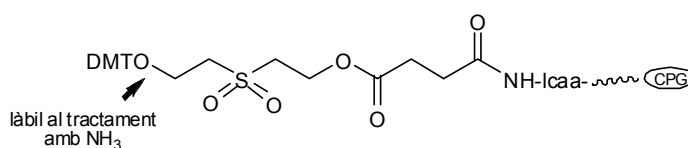


Figura 2.5. Resina per a la síntesi d'oligonucleòtids fosforilats en 3'

nació del CNE del fosfat en 3', de 17 h a  $T_{amb}$  o 4 h a 55 °C. Però en els casos en què s'ha emprat aquesta resina, s'ha realitzat un únic tractament de 12 h a 55 °C per desancorar i alhora desprotegir els fosfats i les nucleobases.

Cal tenir en compte que, en introduir la seqüència desitjada al sintetitzador, s'ha d'incorporar un nucleòtid més en l'extrem 3' perquè en la síntesi automàtica no s'incorpora mai el primer residu de la seqüència, ja que en les condicions estàndard el primer nucleòsid ja està ancorat a la resina.

### **2.3 Síntesi dels precursors lineals fosforilats en 3' d(CGTACGeg<sub>6</sub>CGTACGeg<sub>6</sub>p) i d(ACGeg<sub>6</sub>CGTACGeg<sub>6</sub>CGTp)**

Aquests precursors lineals es van emprar per a unes reaccions de ciclació model i es va decidir preparar-los fosforilats en 3' ja que, com s'ha explicat, s'ha descrit que dóna millor rendiments de ciclació.

Les síntesis es van realitzar seguint la metodologia estàndard i emprant un fosforamidit especial per a la introducció de l'hexaetilenglicol<sup>266</sup>, que és comercial, i la resina especial per a fosforilar en 3'. El fosforamidit d'hexaetilenglicol es va preparar més concentrat (0.075 M enfront de 0.05 M pels amidits estàndard), i a més a més es va tenir en compte quin percentatge aproximat estava hidrolitzat segons l'espectre de <sup>31</sup>P-RMN. Aquestes síntesis es van dur a terme al sintetitzador Expedite deixant el darrer hidroxil en 5' protegit (*DMT on*) per a la posterior purificació mitjançant HPLC de fase inversa. Després de la purificació i eliminació del DMT, les fraccions més pures obtingudes (>90%) es van utilitzar directament per als intents de ciclació. De d(ACGeg<sub>6</sub>CGTACGeg<sub>6</sub>CGTp) es van obtenir 32.6 OD pures de dues síntesis a escala 1 μmol (14 % rend. global). De d(CGTACGeg<sub>6</sub>CGTACGeg<sub>6</sub>p) es van obtenir 15.1 OD pures de dues síntesis a escala 1 μmol (7 % rend. global).

### **2.4 Síntesi de d(GTCCCTCAp), d(CCCTCAGTp), d(pGTCCCTCA) i d(pCCCTCAGT)**

Les síntesis d'aquests precursors lineals es van dur a terme al sintetitzador ABI380B emprant els cicles de síntesi estàndard i les metodologies explicades per a la fosforilació en 3' o en 5' (*CPG I*). Aquestes seqüències es designaran amb la mateixa nomenclatura que en el primer bloc: AI3P per d(GTCCCTCAp), AI13P per d(CCCTCAGTp), AI5P per d(pGTCCCTCA) i AI15P per d(pCCCTCAGT).

Les síntesis inicials a escala 2 μmol dels oligonucleòtids fosforilats en 3', d(GTCCCTCAp) i d(CCCTCAGTp), van tenir lloc amb força bons rendiments d'acoblament (rend. promig per etapa del 94.0 i 96.6 %, respectivament), però les síntesis dels oligonucleòtids fosforilats en 5' no van tenir lloc satisfactòriament, sobretot l'última etapa d'acoblament del fosforamidit especial per fosforilar (rend. ~ 10 %). L'anàlisi dels crús dels productes fosforilats en 3' i en 5' mitjançant HPLC i MS-MALDI-TOF va mostrar la presència d'una impuresa majoritària. Els crús de d(GTCCCTCAp) i d(pGTCCCTCA), mateixa seqüència fosforilada en 3' i 5' respectivament, presentaven una impuresa amb una m/z = 1631 uma i els crús de d(CCCTCAGTp) i d(pCCCTCAGT), oligonucleòtids fosforilats en 3' i 5' de l'altra seqüència, una altra impuresa de m/z = 2233 uma. A més a més, en el cas dels oligonucleòtids



fosforilats en 5' també s'observava, com era d'esperar, la presència de l'oligonucleòtid no fosforilat ( $m/z = 2344$  uma) com a producte força majoritari. Els crus dels oligonucleòtids fosforilats en 3' es van purificar per HPLC a escala semipreparativa i es van obtenir 4.4 OD de d(GTCCCTCAp) (3.1 % de rendiment) i 2.0 OD de d(CCCTCAGTp) (1.4 % de rendiment). Els crus dels oligonucleòtids fosforilats en 5' es van purificar per MPLC aïllant en molt petita quantitat l'oligonucleòtid fosforilat, en gran quantitat el no fosforilat i aïllant també les impureses: la impuresa de  $m/z = 1631$  uma del cru de d(pGTCCCTCA) i la impuresa de  $m/z = 2233$  uma del cru de d(CCCTCAGT). L'anàlisi de les impureses per diferents tècniques ens va permetre deduir que s'havia produït una escissió de l'oligonucleòtid en 3' d'una timidina amb una modificació que aporta una massa de 114 unitats<sup>267</sup>. Aquests resultats no es van atribuir a cap problema concret amb els agents fosforilants, sinó a un tractament d'amonòlisi massa enèrgic.

Les síntesis dels quatre oligonucleòtids es van repetir assajant dues condicions per al desancoratge i la desprotecció: 24 h a  $T_{amb}$  i 12 h a 60 °C en solució aquosa d'amoníac al 33%. Ambdues van donar crus nets sense gaire impureses i vam optar per la segona donat el millor rendiment de desancoratge. Els oligonucleòtids fosforilats en 3' van ser purificats per HPLC de fase inversa amb la columna PRP-I i obtinguts amb bons rendiments (veure Taula 2.1). En aquestes síntesis no vam poder obtenir els oligonucleòtids fosforilats en 5' perquè l'agent fosforilant no es va acoblar bé (només un 6-7 %), ja que estava parcialment hidrolitzat a hidrogenfosfonat, com es va comprovar posteriorment al realitzar-ne un espectre de <sup>31</sup>P-RMN.

Posteriorment, les síntesis dels oligonucleòtids fosforilats en 5' es van repetir (terceres síntesis) amb un nou lot de reactiu 2-[2'-O-(4,4'-dimetoxitritiloxi)etilsulfonil]etil-2-cianoetil-*N,N*-diisopropil-fosforamidit (*CPR I*) i repetint el darrer acoblament. En aquest cas es van obtenir bons rendiments del producte fosforilat: 67 % (95 OD) pel cru de d(pGTCCCTCA) i 85 % (117 OD) pel cru de d(pCCCTCAGT), que corresponen a rendiments per etapa del 95 i 98 %, respectivament. Els productes es van dessalar mitjançant Sephadex G-10.

Seqüència	Rend. etapa (%)	Rend. cru DMTs (%)	Tract. desancoratge	Rend. desancoratge	Rend. prod. pur
d(GTCCCTCAp)	97.5	82 %	24 h T amb	57 % (29.3 OD)	24.7 OD (35%)
			12 h 60 °C	93 % (57.5 OD)	33.2 OD (47 %)
d(CCCTCAGTp)	96.5	75 %	24 h T amb	66 % (30.7 OD)	21.3 OD (31 %)
			12 h 60 °C	97 % (51.3 OD)	27.6 OD (40 %)
d(pGTCCCTCA)	99.6 (7 % última)	97 % (AI)*	24 h T amb	55 % (AI)*	--*
	95.1 <sup>+</sup>	67% (95 OD)	12 h 60 °C	-- <sup>♦</sup>	64 % (91 OD)**
d(pCCCTCAGT)	98.6 (6 % última)	92 % (All)*	24 h T amb	37 % (All)*	--*
	98.0 <sup>+</sup>	85 % (117 OD)	12 h 60 °C	-- <sup>♦</sup>	80 % (110 OD)**

\*es va obtenir el producte sense fosforilar \*\* productes no purificats, només dessalats <sup>♦</sup> no es disposa d'aquesta informació

Taula 2.1. Resum de les segones i terceres<sup>+</sup> síntesis realitzades

## 2.5 Síntesi de *d*(TCGTTTCGTP), *d*(TGCTTCGTP) i *d*(TCGTTGCTP)

Les síntesis d'aquests precursors lineals es van dur a terme en una altra etapa d'aquesta tesi, en el sintetitzador ABI3400, sobre la resina per fosforilar en 3' i emprant el cicle de síntesi estàndard a escala 1  $\mu\text{mol}$ . L'anàlisi dels cations DMT alliberats que realitza el propi sintetitzador va mostrar que les síntesis havien tingut lloc satisfactòriament. Els crus de *d*(TCGTTTCGTP) i *d*(TGCTTCGTP) es van purificar mitjançant MPLC; el cru de *d*(TCGTTGCTP) era prou pur i només es va dessalar mitjançant filtració molecular.

Seqüència	Síntesi	Rend. total cru (%)	Rend. prod. pur (%)
<i>d</i> (TCGTTTCGTP)	2x1 $\mu\text{mol}$	104.3 OD (75 %)	34.3 OD (25 %)
<i>d</i> (TGCTTCGTP)	3x1 $\mu\text{mol}$	166.3 OD (82 %)	69.2 OD (34 %)
<i>d</i> (TCGTTGCTP)	3x1 $\mu\text{mol}$	165.8 OD (82 %)*	

\* producte no purificat

Taula 2.2. Resum de les síntesis dels precursors lineals

## 2.6 EL problema de La desfosforilació

El problema de la desfosforilació ja l'observarem en les síntesis dels precursors lineals per a les reaccions models: *d*(CGTACGeg<sub>6</sub>CGTACGeg<sub>6</sub>p) i *d*(ACGeg<sub>6</sub>CGTACGeg<sub>6</sub>CGTP). En eliminar el grup protector DMT de l'extrem 5' i realitzar l'anàlisi dels oligonucleòtids mitjançant HPLC de fase inversa, havíem observat la presència de dos pics, de proporció aproximada 1:3 (prod. desfosforilat / prod. fosforilat). Però la presència de producte desfosforilat no va dificultar l'anàlisi dels crus de reacció de ciclació mitjançant HPLC i no ens va preocupar.

Fou en les síntesis dels oligonucleòtids *d*(GTCCCTCAp), *d*(CCCTCAGTP), *d*(pGTCCCTCA) i *d*(pCCCTCAGT), en què tornarem a observar el fenomen, que decidírem estudiar-lo. En analitzar per HPLC de fase inversa els productes ja purificats, es va observar la presència de dos pics, que es van col·lectar i es van analitzar per MS-MALDI-TOF, confirmant que el pic de menor  $t_R$  corresponia al producte fosforilat i el de major  $t_R$ , al producte desfosforilat. En purificar altra vegada el producte fosforilat desitjat i tornar-lo a analitzar es va observar el mateix efecte. A més a més, la proporció de producte desfosforilat no era constant. Vam estudiar aquest fenomen mitjançant diverses tècniques analítiques: HPLC fase inversa, HPLC bescanvi aniònic, MS-MALDI-TOF i electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE). El resultat d'aquests estudis (Figura 2.6) ens va permetre arribar a la conclusió que la desfosforilació dels oligonucleòtids fosforilats en 3' es produeix en el propi procés d'anàlisi per HPLC de fase inversa C<sub>18</sub>. S'ha comprovat que no es tracta d'un problema d'estabilitat en la fase mòbil, doncs l'oligonucleòtid és estable durant una setmana en solució d'acetat d'amoni 0.01M, i, per tant, deu ser degut a algun tipus d'interacció amb la fase estacionària, probablement amb grups silanol no capats. Es va assajar l'estabilitat dels oligonucleòtids fosforilats en 3' sobre un suport de fase inversa C<sub>18</sub> (cartutxos Sep-Pack de Waters) i van resultar ser estables, però el rebliment no és exactament el mateix i pot ser que el tractament de "coating" dels grups silanol hagi estat diferent. Per últim, es va assajar l'anàlisi per HPLC de fase inversa sobre un altre tipus de suport, com és el poli(estirè-divinilbenzè) de les columnes Hamilton PRP-I. Aquestes columnes són íntegrament de fase

inversa, sense un nucli de sílice, de manera que no cal capar el rebliment interior. En aquest cas, els oligonucleòtids fosforilats en 3' es van mostrar estables.

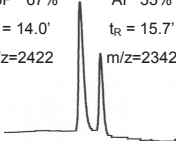
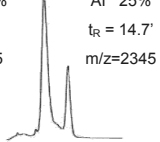
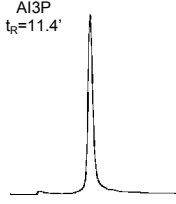
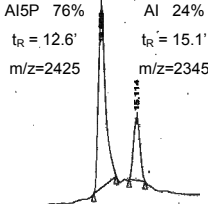
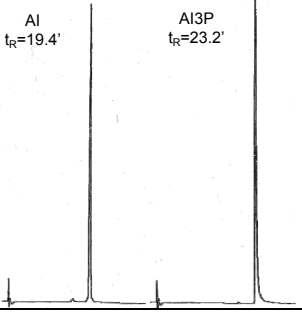
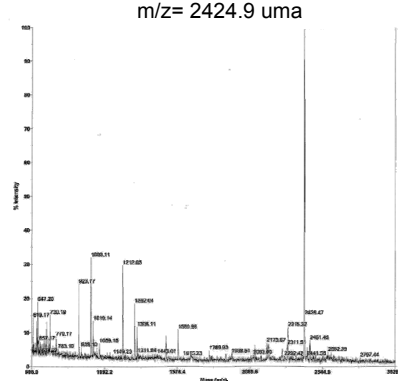
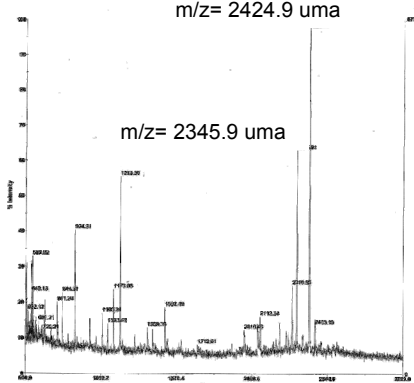


Tècnica	Condicions	Observació de la desfosforilació	
		Oligonucleòtids fosforilats en 3'	Oligonucleòtids fosforilats en 5'
HPLC fase inversa C <sub>18</sub>	Kromasil 100 C <sub>18</sub> de Teknokroma A: NH <sub>4</sub> OAc 0.05 M; B: H <sub>2</sub> O/ACN (1:1). Flux=1 ml/min	Sí AI3P 67% t <sub>R</sub> = 14.0' m/z=2422 AI 33% t <sub>R</sub> = 15.7' m/z=2342  5 a 35 % B en 30'	Sí AI5P 75% t <sub>R</sub> = 11.5' m/z=2425 AI 25% t <sub>R</sub> = 14.7' m/z=2345  8 a 23 % B en 30'
HPLC fase inversa PRP-I	Hamilton PRP-I A: NH <sub>4</sub> OAc 0.05 M; B: H <sub>2</sub> O/ACN (1:1); gradient 5 a 25% B en 20 min. Flux=2 ml/min	No  AI3P t <sub>R</sub> =11.4'	Sí  AI5P 76% t <sub>R</sub> = 12.6' m/z=2425 AI 24% t <sub>R</sub> = 15.1' m/z=2345
HPLC bescanvi aniónic	Dionex NucleoPac PA-100 de 25 × 0,4 cm. A: NaCl 1M, NH <sub>4</sub> OAc 0,025M en 10% ACN; B: NH <sub>4</sub> OAc 0.025M en 10% ACN; gradient 90 a 60% B en 30 min. Flux=1 ml/min	No  AI t <sub>R</sub> =19.4' AI3P t <sub>R</sub> =23.2'	(no realitzat)
MS-MALDI-TOF	mode reflector negatiu. matriu THAP (2,4,6-trihidroxiacetofenona)	No  m/z= 2424.9 uma	Sí  m/z= 2424.9 uma m/z= 2345.9 uma
PAGE	gel al 20% de poliacrilamida V = 750 V	No  AI AI3P	Sí  AI5P producte desfosforilat producte fosforilat

Figura 2.6. Estudi de la desfosforilació dels oligonucleòtids fosforilats en 3' i en 5'

En el cas dels oligonucleòtids fosforilats en 5' el problema és més greu ja que en analitzar els productes purificats observem mitjançant diverses tècniques analítiques que la desfosforilació es produeix espontàniament. En la bibliografia només s'han trobat dues referències que citin aquest fenomen<sup>54,261</sup>, però l'observen en realitzar les reaccions de ciclació, quan tenen el fosfat activat. Cal dir que en la majoria de casos en què es fosforila en 5', aquesta fosforilació es duu a terme enzimàticament amb ATP marcat radioactivament amb <sup>32</sup>P i tots els controls de les reaccions es duen a terme mitjançant PAGE i detecció del <sup>32</sup>P, de manera que si l'oligonucleòtid es desfosforila, perd la marca i se'n perd el rastre. És a dir, que en molts casos no poden observar el fenomen de la desfosforilació. A més a més, és probable que els productes fosforilat i desfosforilat no siguin fàcilment separables mitjançant HPLC ni PAGE si no són de mida petita, com en el nostre cas. Per aquests motius creiem que no existeixen més referències en l'extensa literatura acumulada sobre ciclacions assistides per motlle que citin aquest fenomen.

Però sí que existeixen articles<sup>268</sup> que tracten sobre els mecanismes de desfosforilació de fosfats monoester, ja sigui enzimàticament o químicament. Aquesta reacció, que a primer cop d'ull pot semblar senzilla, no ho és tant ja que existeixen diferents espècies en equilibri i la hidròlisi pot ser per trencament de l'enllaç P-O o de l'enllaç C-O, mitjançant un mecanisme associatiu o dissociatiu. En alguns articles es compara l'efectivitat de la reacció catalitzada per enzims amb la no catalitzada i, mitjançant extrapolació de la hidròlisi a altes temperatures, es dedueix que la constant cinètica d'hydròlisi en aigua a 25 °C dels fosfats monoester dianions és de  $2 \times 10^{-20} \text{ s}^{-1}$  (vida mitjana de  $1.1 \times 10^{12}$  anys) i dels fosfats monoester monocarregats és de  $2 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$  (vida mitjana de  $1.4 \times 10^5$  anys)<sup>268d</sup>. Tot i que existeix controvèrsia sobre el mecanisme, sembla clar que en un rang de pH d'1 a 8 és l'espècie monocarregada la que pateix la desfosforilació. Per aquest motiu, la hidròlisi és molt més ràpida a pH baix, on predomina aquesta espècie, i s'alenteix en augmentar el pH.

Aquest fet coincideix amb les nostres observacions, ja que la desfosforilació, tant en el cas dels oligonucleòtids fosforilats en 3' com els fosforilats en 5', s'ha observat en menor grau en l'anàlisi dels crus que en la posterior anàlisi dels productes purificats. Aquest fet l'atribuïm al diferent pH en què es troben els oligonucleòtids. En els crus, després del tractament amb amoníac, el pH és major que quan després redissolem els productes purs en H<sub>2</sub>O milliQ, que presenta un pH lleugerament àcid, al voltant de 5.5. Tot i això, en principi la velocitat de desfosforilació espontània hauria de ser molt més lenta del que observem i no podem descartar totalment la possibilitat que es tracti d'una desfosforilació assistida enzimàticament.

### 3 ASSAJOS DE CICLACIÓ AMB MODELS DE DÚPLEX

Abans de procedir a assajar la ciclació assistida per motlle amb els nostres *bi-loops*, vam voler assajar la metodologia amb models de dúplexs petits, de només 6 parells de bases. Aquesta és la mida dels dúplexs més petits amb llaços nucleotídics que s'ha descrit que es poden ciclar<sup>212b</sup>, tot i que la ciclació s'havia realitzat amb un dúplex amb 6 parells G-C. Cal dir que també s'han preparat *dumbbells* amb només un<sup>214</sup> o dos<sup>269</sup> parells de bases, però amb llaços no nucleotídics. Tot i que el *bi-loop* té menys parells de bases que aquests models, conté ponts d'hidrogen addicionals en les tètrades i l'estabilitat és aproximadament del mateix ordre (estabilitat calculada<sup>270</sup> del precursor tallat pel dúplex  $\Delta G^0_{298} = -9$  kJ/mol i del precursor tallat pel llaç  $\Delta G^0_{298} = -22$  kJ/mol, estabilitat mesurada *bi-loop* lineal  $\Delta G^0_{298} = -15$  kJ/mol).

Per obtenir el *dumbbell* vam decidir provar dues aproximacions (Figura 3.1): a partir de la molècula tallada pel dúplex (*nicked dumbbell*) i a partir de la molècula tallada pel llaç (forqueta o *hairpin*) per tal d'estudiar quina de les dues era més favorable. Per evitar interaccions no desitjades, els llaços no es van construir amb nucleòtids sinó amb cadenes d'hexaetilenglicol. Aquest tipus de *linker* ha estat àmpliament emprat en els casos en què els llaços senzillament fan d'unió entre les dues cadenes ja que escurça la síntesi, millorant-ne per tant els resultats i reduint-ne els costos, i augmenta la resistència a la degradació per endonucleases<sup>213b,244,271</sup>. A més a més, estudis d'estabilitat i estructurals indiquen que rigidifica l'estructura i l'estabilitza<sup>271,272</sup>. Es va triar una cadena d'hexaetilenglicol, que conté 18 àtoms i equival a un llaç de cinc nucleòtids. Es va decidir preparar-los fosforilats en 3' perquè és l'aproximació que segons la literatura funciona millor per a la lligació química.

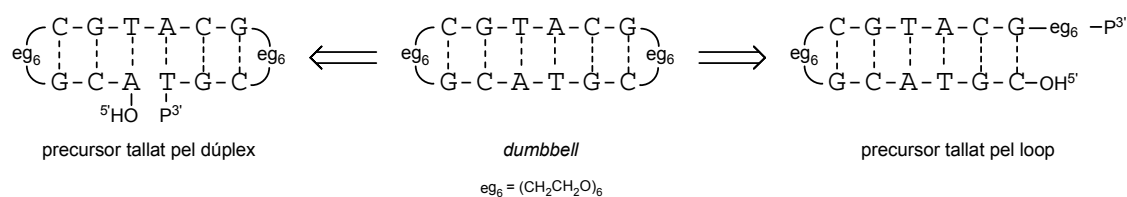


Figura 3.1. Oligonucleòtid cíclic objectiu i precursors lineals assajats

La ciclació es va dur a terme amb bromur de cianogen amb imidazole en el medi, segons les condicions descrites a la bibliografia<sup>209</sup>. La presència d'imidazole en el medi comporta la formació de *N*-cianoimidazole (1), *N,N'*-iminodiimidazole (2) i *N*-carboxamidoimidazole (3), tenint els dos primers una activitat condensant<sup>204a,b</sup> (Figura 3.2). S'han plantejat dos possibles intermedis de reacció<sup>205a</sup>: el que resulta de l'addició directa dels agents condensants sobre el grup fosfat (Ruta 1) i el fosforoimidazolidat format per atac de l'imidazole sobre el fosfat activat (Ruta 2). Segons els autors de l'estudi mecanístic, la presència d'imidazole i cations divalents és necessària perquè es dugui a terme la condensació.

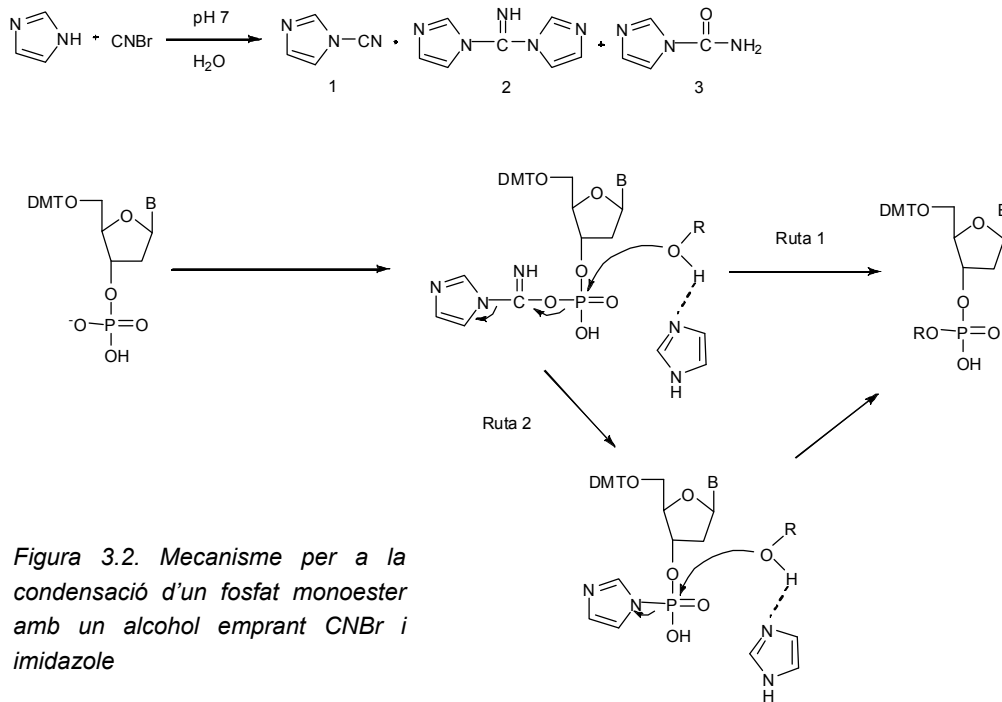


Figura 3.2. Mecanisme per a la condensació d'un fosfat monoester amb un alcohol emprant CNBr i imidazole

Els precursors lineals es van liofilitzar i es van dissoldre a una concentració 50  $\mu$ M en una solució 200 mM imidazole-HCl pH 7, 100 mM NiCl<sub>2</sub>. Les mostres es van escalfar a 80 °C, es van deixar renaturalitzar fins a 10 °C i s'hi va afegir el CNBr, a una concentració final de 100 mM, partint d'una solució 5 M en ACN. Després de 12h de reacció, les anàlisis per HPLC de fase inversa i PAGE van revelar que s'havia produït ciclació en el cas del precursor tallat pel dúplex (amb un rendiment pròxim al 50%) (Figura 3.3), però no pas en el cas de l'altre precursor lineal.

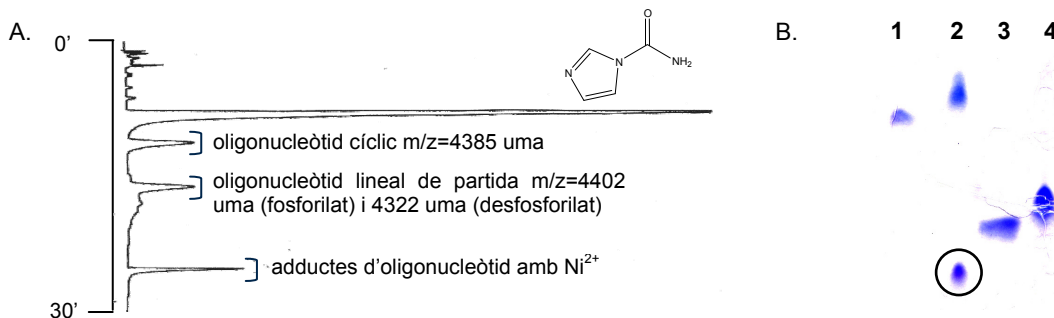


Figura 3.3. A. Anàlisi per HPLC de fase inversa del cru de reacció del dímer tallat pel dúplex. B. Anàlisi mitjançant PAGE: 1. precursor lineal tallat pel dúplex, 2. cru reacció de 1, 3. precursor lineal tallat pel llaç, 4. cru de reacció de 3

Cal remarcar que, en aquest cas, l'oligonucleòtid cíclic format presenta una major migració que l'oligonucleòtid lineal en l'anàlisi per electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE) desnaturalitzant. Aquest fet és distintiu dels oligonucleòtids cíclics de mida petita (aproximadament fins a un 26 mer), mentre que els oligonucleòtids cíclics més llargs (>26 mer) presenten una mobilitat electroforètica menor que la dels seus anàlegs lineals. Aquest comportament es troba àmpliament referenciat a la bibliografia ja que la majoria de ciclacions assistides per motlle s'analitzen mitjançant PAGE desnaturalitzant. Si l'oligonucleòtid presenta llaços no nucleotídics, tipus etilenglicol, com és el nostre cas, la retenció augmenta ja que augmentem la massa sense augmentar la càrrega, i la mida límit en què es produeix la inversió del comportament és més petita (al voltant de 18 nt) i depèn del nombre i tipus d'unitats no nucleotídiques<sup>195</sup>. En el cas de realitzar anàlisis mitjançant electroforesi no desnaturalitzant (*native gels*), els oligonucleòtids cíclics sempre migren més lentament.

També cal remarcar que el producte cíclic presenta una coloració lleugerament diferent a la dels oligonucleòtids lineals, una mica més violeta i menys blava, fet que no és estrany ja que el tint emprat, el compost 4,5,4',5'-dibenzo-3,3'-diethyl-9-metiltiocarbocianat, conegut com "Stains-All" (Figura 3.4) presenta aquesta propietat de tenyir amb diferent coloració segons el compost. Així, el DNA es tenyeix de color blau, mentre que l'RNA dona una coloració blau-lilosa i les proteïnes es tenyeixen de vermell. Aquesta diferent coloració prové de la diferent acidesa dels compostos a tenyir: els compostos més àcids es tenyeixen de blau, els mitjans de lila i els poc àcids de rosa<sup>273</sup>. En el nostre cas, l'oligonucleòtid cíclic ja no presenta el fosfat monoèster terminal, doblement àcid, i per això dona lloc a una coloració més lila.

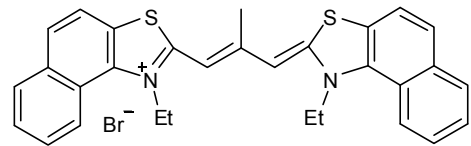


Figura 3.4. Estructura del compost conegut com Stains-All

L'anàlisi d'aquestes reaccions resulta complicada a causa de la presència dels ions  $\text{Ni}^{2+}$ , que es coordinen amb l'oligonucleòtid i dificulten enormement l'anàlisi del cru mitjançant MS-MALDI-TOF, així com l'anàlisi per HPLC, ja que donen lloc a un pic d'adductes, més retingut que no pas el precursor lineal o el producte ciclat, del qual no és possible identificar-ne clarament la massa. Per això vam decidir intentar eliminar els ions  $\text{Ni}^{2+}$  realitzant un tractament amb EDTA del cru (solució 20 mM pH 7.5). Després d'aquest tractament ja és possible l'anàlisi directa del cru mitjançant MS-MALDI-TOF i els perfils cromatogràfics d'HPLC canvien força. Ara sí que s'observa la presència de producte cíclic per a la reacció de ciclació amb el precursor lineal tallat pel llaç, tot i que amb menor rendiment (~ 30%) que en el cas del precursor lineal tallat pel dúplex (~ 60%) (Figura 3.5). Aquest resultat indica que l'estratègia de tallar pel *loop* és menys encertada i ens demostra com és d'important que els extrems a lligar estiguin realment propers en l'espai.

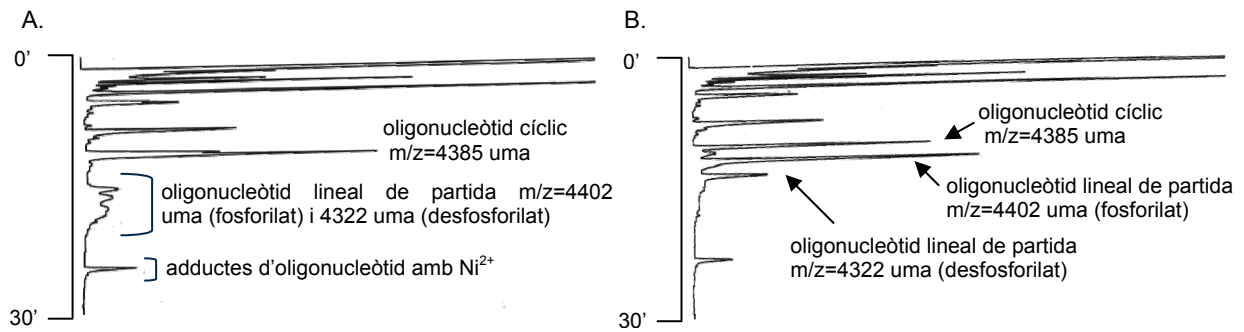


Figura 3.5. Anàlisi per HPLC de fase inversa del crús de reacció una vegada tractats amb EDTA: A. precursor lineal tallat pel dúplex, B. precursor lineal tallat pel llaç

Per últim, cal destacar que aquestes reaccions de prova s'han dut a terme a una temperatura força baixa (10 °C). En el nostre cas, la limitació en la temperatura de reacció ve donada per l'estabilitat de l'estructura (motlle) que volem emprar per afavorir la ciclació, de manera que hem d'escollir una temperatura en què la major part de l'oligonucleòtid es trobi estructurat. Com que tant els nostres *bi-loops* com aquests petits dúplex model són poc estables, hem d'escollir temperatures entre 2 i 10 °C. Aquestes condicions contrasten amb les descrites a la literatura per Kool emprant CNBr i imidazole<sup>209</sup>, que generalment realitza les ciclacions a temperatura ambient (23-25 °C). Nosaltres hem aconseguit aplicar-les a la ciclació a 10 °C de dos petits dúplex model.



## 4 EL BI-LOOP COM A MOTLLE PER A LA CICLACIÓ ASSISTIDA

---

La idea d'utilitzar el *bi-loop* com a motlle perseguia dos objectius. Per una banda, aprofitar una nova estructura per a la ciclació assistida, que donaria lloc als cicles més petits mai aconseguits amb aquesta metodologia, tot i que ja s'havia arribat a cicles de nou nucleòtids amb la ciclació d'un *i-motif* bimolecular<sup>217b</sup>. Per altra banda, seria una evidència de la formació del *bi-loop* en solució amb oligonucleòtids lineals. La lligació o ciclació química ha estat emprada amb èxit per corroborar la formació d'estructures en solució en casos com els tríplexs<sup>274</sup> o el quàdruplex de guanina<sup>218</sup>, com ja s'ha comentat en la introducció.

Per tal de poder inferir a partir de la lligació del precursor lineal que es forma un motiu *bi-loop*, ens calen controls negatius de la ciclació, com són l'absència de motlle (pel cas de motlles externs) i/o l'absència de medi estructurador (tant per a motlles externs com interns). Com que el *bi-loop* és poc estable, la seva formació en aigua és menyspreable i, per tant, no s'hauria de produir lligació.

Com a dímer per iniciar l'estudi i per facilitar la interpretació dels resultats, es va escollir un heterodímer, de manera que cap de les dues seqüències no es pogués autoestructurar en forma de *dumbbell* ni de *bi-loop* homodimèric. Així, si es produís la ciclació, donaria lloc a la formació d'un cicle diferent al que fa de motlle. Aquests intents es van realitzar abans d'haver dut a terme els estudis mitjançant RMN que s'han explicat en el capítol 3 del primer bloc (apartat 3.5). Només disposàvem de la informació obtinguda amb les fusions per UV i els espectres de DC (apartat 3.4, cap. 3, bloc 1)

Posteriorment, després d'haver estudiat per DC i RMN la formació de *bi-loops* homolineals (capítol 6 del bloc 1) vam decidir plantejar també la ciclació d'oligonucleòtids lineals autoestructurats (motlle intern).

### 4.1 Bi-loop heterolineal

En aquest cas intentarem ciclar un oligonucleòtid lineal fosforilat en un dels seus extrems, que s'aproximen en l'espai mitjançant la formació d'un *bi-loop* heterodimèric amb un cycle que fa la funció de motlle extern (Figura 4.1).

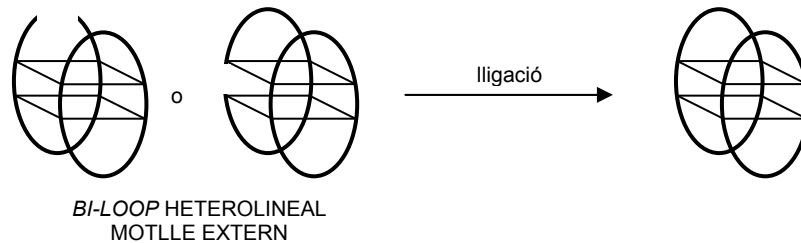


Figura 4.1. Esquema de la ciclació assistida per formació d'un *bi-loop* heterolineal

Per realitzar aquest estudi es van escollir les mateixes seqüències que en el primer bloc, derivades de d<pCAGTCCCT> (cycle A) + d<pCCTTCGGT> (cycle B), que es poden estructurar com a heterodímer per formació d'una tètrada GCGC desplaçada i una mixta GCAT.

En iniciar aquest treball havíem observat per DC i UV que de les combinacions cycle-lineal estudiades, la més prometedora era la formada pel cycle B, d<pCCTTCGGT>, i el lineal AI, d(GTCCCTCA), i vam decidir preparar els oligonucleòtids d(GTCCCTCA) (AI, tallat pel motiu) i d(CCCTCAGT) (AII, tallat en el llaç) fosforilats tant en 3' com en 5'. Però els problemes de desfosforilació observats amb els oligonucleòtids 5'-fosforilats ens van fer desistir d'intentar-ne la seva ciclació i vam prosseguir els estudis només amb els anàlegs 3'-fosforilats. La nomenclatura que emprarem per a aquests oligonucleòtids serà: AI3P d(GTCCCTCAp) i AII3P d(CCCTCAGTp) (veure Figura 4.2).

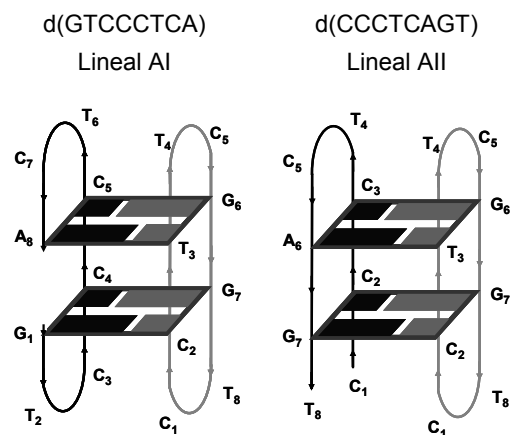


Figura 4.2. Oligonucleòtids lineals escollits i la possible formació del motiu *bi-loop* amb el cycle B

#### 4.1.1 Estudi per DC de l'estructuració en les condicions de reacció

Abans de procedir a realitzar les ciclacions, vam voler assegurar-nos que en les condicions de reacció descrites es formaria el motiu *bi-loop*, i per això vam realitzar un estudi per dicromisme circular en els diferents medis de reacció. En tots els casos es va treballar a una concentració d'oligonucleòtid 50 μM en cada espècie, la que utilitzarem posteriorment per a la ciclació, i les mesures es van realitzar en cel·les rectangulars d'1 mm de pas de llum en un aparell Jasco J-810.

Si comparem l'estructuració de les dues mesclures cíclic+lineal en els diferents medis (Figura 4.3) observem que existeix una estabilització en els medis salins, ja que s'observa un augment de

l'el·lipticitat i un desplaçament hipsocròmic del màxim d'absorció respecte a les mescles controls en aigua. A més a més, queda clar que el nivell d'estructuració en els medis de reacció, tant amb EDC (50 mM MES-NaOH pH 6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) com amb CNBr (200 mM imidazole-HCl pH 7, 100 mM NiCl<sub>2</sub>), és, com a mínim, comparable a l'estructuració en el medi salí habitual (10 mM Na<sub>2</sub>PIPES, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>).

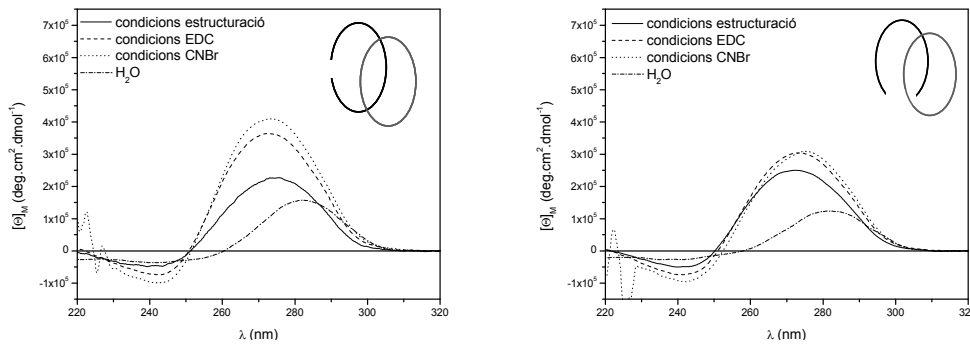


Figura 4.3. Comparació de l'estructuració a 10 °C en diferents medis de les mescles  $d(\text{GTCCCTCAp})+d\langle\text{pCCTTCGGT}\rangle$  (AI3P+B) i  $d(\text{CCCTCAGTp})+d\langle\text{pCCTTCGGT}\rangle$  (AII3P+B)

#### 4.1.2 Proves de separació

Un dels problemes d'aquesta aproximació és que tant el producte fosforilat de partida, com el motlle i el producte cíclic desitjat són octanucleòtids força similars, que es preveu seran difícils de separar per les diferents tècniques analítiques, tot i que la seva massa sí que és diferent i es podran diferenciar i caracteritzar. A més a més, en les anàlisis mitjançant HPLC hi trobarem també la presència del producte desfosforilat, que encara complica més la interpretació dels resultats. Per aquests motius, preveient les futures dificultats, es va realitzar un estudi preliminar de les condicions de separació a emprar posteriorment.

Per a l'anàlisi mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant (PAGE) es va observar que un voltatge menor (al voltant de 500 V) afavoria una major separació i que el cicle desitjat  $d\langle\text{pCAGTCCCT}\rangle$  (cicle A) presenta una migració lleugerament superior a la del motlle  $d\langle\text{pCCTTCGGT}\rangle$  (cicle B). Els precursors lineals fosforilats migren més lentament i queden més retinguts.

Per a les anàlisis mitjançant HPLC de fase inversa, després de diversos assajos, es va comprovar que per als crús de reacció de  $d(\text{GTCCCTCAp})$ , la separació era millor emprant acetat de trietilamoni ( $t_R$ : cicle A < cicle B < lineal AI3P < lineal AI), mentre que pel cas de  $d(\text{CCCTCAGTp})$  s'aconseguia una millor separació emprant acetat d'amoni ( $t_R$ : lineal AII3P < lineal AII < cicle A < cicle B). Això és degut a què el tampó d'acetat de trietilamoni crea parells iònics de major mida, que queden més retinguts en la columna, i aquest efecte és major amb els precursors lineals que amb els oligonucleòtids cíclics, de manera que s'arriba a invertir l'ordre d'elució. A més a més, vam observar que les anàlisis resultaven més senzilles si s'emprava la columna PRP-I, ja que no es produïa desfosforilació i es simplificava el cromatograma.

Per a les anàlisis mitjançant MS-MALDI-TOF, es va comprovar, emprant mescles equimolars de producte cíclic i lineal, que els oligonucleòtids cíclics costen més de vaporitzar que els oligonucleòtids lineals, els quals s'observen amb major intensitat. Però ambdós s'observen clarament i és conegut que les intensitats relatives en les anàlisis d'MS-MALDI-TOF no donen informació quantitativa.

#### 4.1.3 Cicllació amb EDC

El primer intent de ciclació es va realitzar amb l'hidroclorur de la *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), que és una carbodiimida soluble en aigua. Es va intentar la ciclació dels oligonucleòtids lineals fosforilats en 3' en presència del cicle B i per a cada mescla es van preparar dos controls: sense motlle i sense tampó. Les condicions de reacció foren: 50  $\mu$ M del precursor lineal, 55  $\mu$ M del motlle (1.1 eq), 50 mM MES-NaOH pH 6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Aquestes mescles es van escalfar a 90 °C per desnaturalitzar-les i es van refredar lentament fins a 6 °C, temperatura a la qual es va afegir l'EDC (250 mM). L'anàlisi dels crus de reacció es va dur a terme mitjançant HPLC de fase inversa, MS-MALDI-TOF i PAGE. La primera anàlisi es va realitzar a les 21h de reacció i la segona, als 5 dies de reacció.

L'anàlisi per HPLC va resultar força complicada i poc informativa a causa de la presència d'un gran nombre de pics, sovint solapats. Aquests es van col·lectar i es van analitzar per MS-MALDI-TOF. Els pics que es van poder caracteritzar corresponien al precursor lineal de partida, producte desfosforilat, oligonucleòtid motlle i productes d'addició de la carbodiimida sobre alguna base<sup>275</sup>; altres pics donaven lloc a masses que no s'han pogut associar a cap producte concret o a espectres de masses amb diversos pics, sovint corresponents als productes coneguts anteriorment citats. L'addició de l'EDC es produeix per reacció d'una amina o imina d'una base sobre el centre electròfil de la carbodiimida i es dona especialment en guanines i timines no aparellades. En el nostre cas, tenim timines en els llaços susceptibles de patir aquesta modificació. Com a exemple de les anàlisis mitjançant HPLC, es mostra el cru de reacció de d(CCCTCAGTp) + d<pCCTTCGGT> als 5 dies (Figura 4.4) i s'hi indiquen els pics que van poder ser caracteritzats per MS-MALDI-TOF.

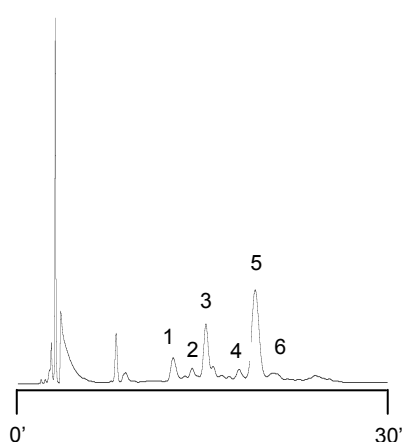


Figura 4.4. Anàlisi per HPLC de fase inversa del cru AII3P+B amb EDC als 5 dies de reacció. Composició dels pics segons la seva massa: 1: AII3P, 2: AII3P i A, 3: AII3P i AII, 4: cicle A, 5: cicle B, 6: AII3P+EDC

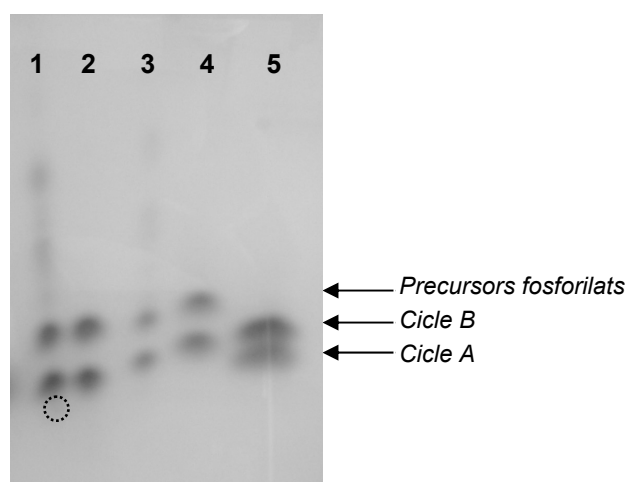


Figura 4.5. Anàlisi per PAGE dels crus al cap de 5 dies de reacció. Carril 1: ciclació AII3P. Carril 2: AII3P+B. Carril 3: ciclació AII3P. Carril 4: AII3P+B. Carril 5: cicle B + cicle A.

L'anàlisi per PAGE no va mostrar l'existència de ciclació al les 21h, però l'anàlisi als 5 dies de reacció de la mescla AI3P+B va mostrar la presència d'una banda molt tènue, que migra més ràpidament que el producte lineal i que podria correspondre al cicle desitjat  $d<pCAGTCCCT>$  (Figura 4.5, carril 1).

Les anàlisis directes dels crús de reacció mitjançant MS-MALDI-TOF mostraren un pic petit corresponent a la massa del producte de ciclació (cicle A,  $m/z=2405.7$  uma,  $M_{teòrica}=2407.4$  uma), però apareixia tant en la mescla de reacció com en els controls sense motlle i en medi aquós, o sigui que correspondria a una ciclació "espontània" i no pas induïda per una estructuració concreta deguda a la presència del motlle. Aquest suposat producte cíclic no es va poder aïllar ni per HPLC ni per PAGE ja que era molt minoritari.

#### 4.1.4 Ciclació amb CNBr i imidazole

Atesos els resultats negatius amb l'EDC, vam decidir assajar un agent condensant més enèrgic, com és el bromur de cianogen. En primer lloc es van fer servir les condicions descrites per Kool<sup>209</sup> i emprades en els assajos amb els dúplex model: 200 mM imidazole-HCl pH 7, 100 mM NiCl<sub>2</sub>, 100 mM CNBr. Es va assajar la ciclació dels oligonucleòtids lineals fosforilats en 3': AI3P i AII3P (50 μM) en presència del cicle B (55 μM, 1.1 eq). Les mostres es van desnaturalitzar i renaturalitzar fins a 10 °C, temperatura a la qual es va afegir el bromur de cianogen (solució 5 M en ACN) i es va deixar reaccionar durant 12h.

L'anàlisi mitjançant HPLC mostrà crús molt bruts, amb presència de molts més pics que no pas en el cas de les reaccions amb els dúplex model, un pic majoritari corresponent al *N*-carboxamidimidazole, els productes de partida col·lapsats en un únic pic i un altre pic molt intens a  $t_R \sim 25'$ , que deu correspondre a adductes d'oligonucleòtid amb Ni<sup>2+</sup>. Els cromatogrames es van poder simplificar amb un tractament amb EDTA per capturar els cations Ni<sup>2+</sup>, com ja havíem realitzat amb les reaccions model, i posterior dessalat per exclusió molecular amb Sephadex G-10. Però la desfosforilació va augmentar i tampoc es va observar producte de ciclació.

L'anàlisi mitjançant PAGE va mostrar l'aparició de dos productes de reacció (productes encerclats, Figura 4.6), un dels quals podia correspondre, per comparació amb el patró, al cicle A, però en repetir el gel a escala preparativa, aïllar-ne les bandes i analitzar-les per MS-MALDI-TOF, no es va observar la massa esperada.

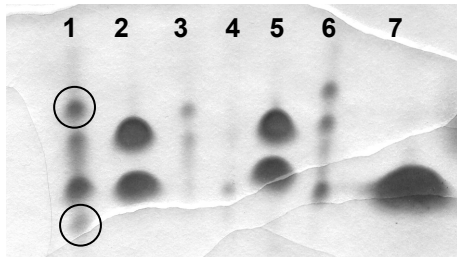


Figura 4.6. Anàlisi mitjançant PAGE dels crús de reacció amb CNBr i imidazole. Carril 1: ciclació AI3P. Carril 2: AI3P+B. Carril 3: AI3P, reac. control sense motlle. Carril 4: ciclació AII3P. Carril 5: AII3P+B. Carril 6: AII3P, reac. control sense motlle. Carril 7: cicle A.

#### 4.1.5 Cicllació amb CNBr i MES

Les reaccions es van repetir emprant unes altres condicions típiques de reacció amb CNBr, sense imidazole en el medi i amb una concentració molt més elevada de reactiu, que donen lloc a lligacions molt més ràpides (1-3 min) i que típicament es realitzen a baixa temperatura (0-5 °C). Aquestes condicions van ser descrites per Shabarova i col.<sup>204,208</sup>: 250 mM MES-Et<sub>3</sub>N pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM CNBr. Posteriorment, els mateixos autors van realitzar estudis mecanístics per entendre l'activació del fosfat monoester i la seva posterior condensació i van observar que es requeria la presència del tampó d'àcid morfolinoetansulfònic o d'una altra morfolina *N*-substituïda perquè es produís l'activació del fosfat<sup>276</sup> (Figura 4.7). Així doncs, l'àcid morfolinoetansulfònic no actua només com a agent amortidor del pH, sinó també com a transportador del grup CN.

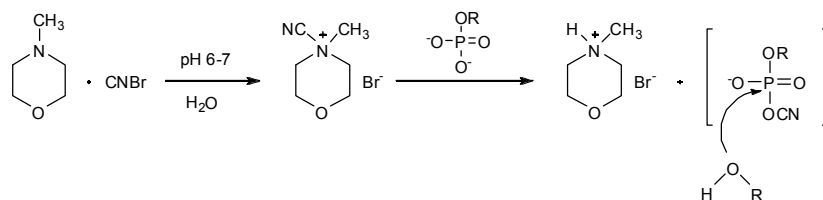


Figura 4.7. Mecanisme d'activació d'un fosfat monoester emprant CNBr i un *N*-morfolino derivat

Abans de dur a terme les ciclacions, les mostres AI3P+B i AII3P+B es van escalfar a 90 °C i renaturalitzar fins a 5 °C, temperatura a la qual s'afegí el CNBr. Vam analitzar les reaccions als 10 i als 30 minuts. Tant els cromatogrames com els espectres de masses són molt més nets que en les condicions anteriors i no és necessari cap tractament (*work-up*), tot i que per HPLC segueixen existint problemes de solapament, que milloren emprant tampó d'acetat de trietilamoni pels crús d'AI3P i d'acetat d'amoni pels crús d'AII3P, tal i com havíem determinat en els estudis previs de separació.

Les anàlisis mitjançant MS-MALDI-TOF van mostrar la massa del cicle A desitjat, però el pic era molt petit, i, a més a més, també s'observava en la reacció control sense motlle. Les anàlisis per HPLC només van mostrar l'aparició d'algun pic petit, però cap d'ells es va poder associar al producte desitjat. Finalment, l'anàlisi mitjançant PAGE als 30' de reacció sí que va mostrar, per al cru de AI3P amb el motlle, una banda molt tènue que migrava més ràpid que el precursor lineal i que el cicle B (Figura 4.8). Però el conjunt de dades globals no permet concloure que la ciclació hagi tingut lloc de manera significativa.

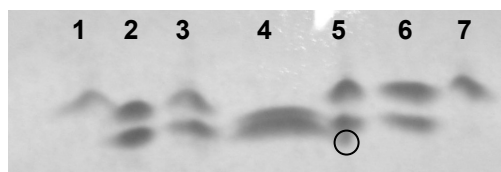


Figura 4.8. Anàlisi per PAGE dels crús als 30' de reacció. Carrils 1, 2 i 3: crús de AII3P: control sense motlle, sense tampó i reacció, respectivament. Carril 4: mescla de cicles A i B. Carrils 5, 6 i 7: crús de AI3P: reacció, control sense tampó i sense motlle, respectivament

En aquest punt vam concloure que el motiu estructural format per l'oligonucleòtid cíclic d<pCCTTCGGT> (cicle B) i els oligonucleòtids lineals d(GTCCCTCAp) (AI3P) o d(CCCTCAGTp) (AII3P) no era prou estable en solució i es va decidir estudiar-lo mitjançant RMN.

#### 4.1.6 Anàlisi dels resultats

Posteriorment als resultats negatius de la ciclació, es va dur a terme l'estudi mitjançant RMN de la combinació de d<pCCTTCGGT> (cicle B) + d(GTCCCTCA) (lineal AI) per veure si podíem explicar-los. A la vista dels resultats d'aquest estudi (bloc 1, capítol 3) sí que podem entendre perquè no van funcionar les ciclacions. En primer lloc, cal tenir en compte que treballàvem a les concentracions estàndard descrites (50  $\mu$ M del precursor lineal), que per al cas del *bi-loop* són massa baixes ja que només tindrem el dímer parcialment format. A més a més, l'extrem 3' és flexible i probablement no es trobi suficientment proper en l'espai per a la seva lligació amb l'hidroxil en 5'. Aquests dos fets són suficients per explicar que la ciclació no tingués lloc. Probablement si es repetissin els assajos a major concentració (a partir d'1 mM) i s'intentés, per exemple, la formació d'un enllaç pirofosfat, que permet salvar una distància més gran, s'aconseguiria l'obtenció de producte cíclic.

Tot i que no s'ha pogut aïllar el producte de ciclació, sí que s'han observat indicis de la seva formació, encara que poc selectiva, i s'ha vist que la ciclació de d(GTCCCTCA) (AI3P, tallat pel motiu) resulta més favorable que no pas la de d(CCCTCAGT) (AII3P, tallat pel llaç). Així doncs, en vista d'aquests resultats, sembla que la formació del *bi-loop* entre un oligonucleòtid cíclic i un altre de lineal és més favorable en el cas en què l'oligonucleòtid lineal es trobi tallat pel motiu, i no pas pel llaç. Aquests resultats són consistents amb els obtinguts mitjançant els estudis d'RMN del *bi-loop* heterolineal. Tot i que no es va estudiar mitjançant RMN la combinació de cicle B+ lineal AII que hem intentat ciclar, sí que es van estudiar les combinacions cicle A + lineal BI (d<pCAGTCCCT> + d(CGGTCCTT), lineal tallat pel llaç) i cicle A + lineal BII (d<pCAGTCCCT> + d(GTCCTTCG), lineal tallat pel motiu) i es va comprovar que la mescla A+BII presentava una major estructuració que la mescla A+BI.

A més a més, amb la informació obtinguda dels estudis d'RMN, podem dir que l'heterodímer que vam escollir per als estudis de ciclació no era l'òptim, ja que el cicle que ha de fer de motlle pot autoestructurar-se en solució formant dímers amb parells G·T, estructura que competeix amb la desitjada que ha d'afavorir la ciclació.

## 4.2 Bi-Loop homolíneal

Una vegada disposàvem de les estructures en solució dels oligonucleòtids lineals que s'autoestructuren en forma de *bi-loop* (capítol 5 del primer bloc), vam decidir intentar-ne la seva ciclació. Com que es tracta d'autoestructuració d'un oligonucleòtid amb una altra unitat d'ell mateix, en aquest cas el motlle que ens afavorirà la ciclació és intern (Figura 4.9). Es va decidir assajar la ciclació dels oligonucleòtids lineals d(TGCTTCGTP) (L3-3'P) i d(TCGTTGCTP) (L5-3'P), que formen el *bi-loop*, i de l'oligonucleòtid d(TCGTTCGTP) (L1-3'P), que forma un mini *i-motif* l'estructura del qual no hem resolt, però que suposadament, segons el nostre model, aproparà els extrems de l'oligonucleòtid lineal en l'espai.

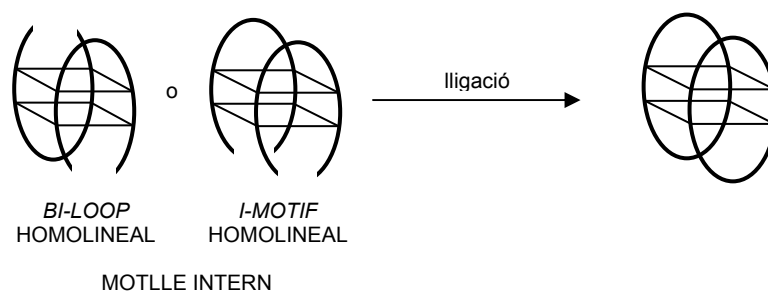


Figura 4.9. Esquema de la ciclació assistida per formació d'un bi-loop o i-motif homolineal

Com que en aquesta ocasió disposem de les estructures dels *bi-loops*, podem conèixer la distància i disposició dels grups que han de reaccionar. En l'estructura d'un dúplex tallat (*nicked duplex*) obtinguda per difracció de Raigs X, la distància entre l'hidroxil en 3' i l'hidroxil en 5' dels nucleòsids adjacents és de  $\sim 3.0 \text{ \AA}^{277}$ ; en canvi, en l'estructura d'un *nicked dumbbell* amb llaços d'hexaetilenglicol obtinguda mitjançant RMN aquesta distància és de  $7.70 \pm 0.25 \text{ \AA}^{272}$ . D'altra banda, cal dir que en general es considera que existeix una distància de  $\sim 3.5 \text{ \AA}$  entre els grups hidroxil i fosfat que han de reaccionar en un *nicked dumbbell* i que per una distància de  $\sim 7.0 \text{ \AA}$  en el llaç d'un quàdruplex de G, s'ha emprat amb èxit l'enllaç pirofosfat<sup>218</sup>, mentre que l'intent de formar un enllaç natural fosfodiester gairebé no va furnir producte de ciclació. En les nostres *bi-loops*, la distància promig entre els dos hidroxils dels extrems és de  $7.29 \pm 1.9 \text{ \AA}$  per a d(TGCTTCGT) (L3, rang de 3.73 a 11.12  $\text{ \AA}$ ) i de  $10.34 \pm 2.6 \text{ \AA}$  per a d(TCGTTGCT) (L5, rang de 4.19 a 12.94  $\text{ \AA}$ ). Aquestes són les distàncies promig del conjunt de 10 estructures obtingudes per a cada oligonucleòtid. Nosaltres estàvem interessats en produir un enllaç natural fosfodiester i, a la vista de la distància existent en l'estructura del *nicked dumbbell* obtinguda mitjançant RMN, que és de  $7.70 \text{ \AA}$ , no gaire diferent de la distància existent en les nostres estructures, creiem que podríem tenir èxit.

Es va decidir treballar a concentració 1 mM d'oligonucleòtid i a 5-10 °C per assegurar la formació del motiu. Segons els estudis d'estabilitat, en aquestes condicions tindrem la major part de l'oligonucleòtid estructurat.

#### 4.2.1 Anàlisi de les reaccions

En aquest cas no vam poder realitzar un estudi previ de les condicions de separació, ja que no disposàvem del producte cíclic que s'obtidria de les reaccions, ni d<pTGCTTCGT> ni d<pTCGTTGCT>, però es preveu que la separació serà més senzilla ja que no tenim la presència d'un motlle extern, i en principi només haurem d'observar el producte de partida (i producte desfosforilat en les anàlisis mitjançant HPLC) i el producte final. A més a més, en realitzar aquests estudis, es disposava d'un instrument HPLC-MS, que ens permetrà caracteritzar els diferents pics que s'obtinguin de l'anàlisi per HPLC sense necessitat de col·lectar-los i posteriorment analitzar-los per MS-MALDI-TOF. Així doncs, totes les reaccions s'analitzaren per MS-MALDI-TOF directe dels crús, PAGE, HPLC i HPLC-MS.



#### 4.2.2 Ciclació amb EDC

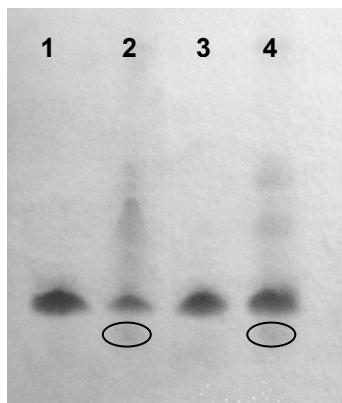
Inicialment es van assajar les condicions descrites a la literatura (200 mM MES-NaOH pH 6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 24h, 10 °C), però afegint l'EDC a concentració 1 M (1000 equivalents respecte l'oligonucleòtid), mentre que generalment s'empra a concentració 250 mM (5000 eq. respecte a la concentració estàndard d'oligonucleòtid 50 μM). L'intent de ciclació es va realitzar amb tots tres precursors lineals: d(TGCTTCGTP) (L3-3'P), d(TCGTTGCTP) (L5-3'P) i d(TCGTTCGTP) (L1-3'P). El resultat de les diverses anàlisis es troba resumit a la Taula 4.1 i sembla indicar la formació de producte cíclic, que correspondria a la banda del gel de poliacrilamida que migra més que el precursor lineal (Figura 4.10.A). Aquesta major migració electroforètica del producte ciclat és l'esperada per oligonucleòtids de tant petita mida. El més curiós, però, era la presència de producte cíclic en dos pics en l'anàlisi per HPLC-MS: un primer pràcticament al mateix temps de retenció que el precursor lineal de partida i un segon més retingut i també més intens (veure Figura 4.10.B, en què es mostren els cromatogrames corresponents al seguiment de la massa del producte de partida i del producte cíclic, *SIR: selected ion recording*). L'única explicació que li podem donar és que part del producte cíclic es trobi unit al precursor lineal formant un dímer i per això surti al seu temps de retenció.

	PAGE	MS-MALDI-TOF	HPLC rp	HPLC-MS
L1-3'P	una banda menys retinguda i diverses més retingudes	✓ cíclic (m-18)	t <sub>R</sub> =12,5' 26 % p. partida t <sub>R</sub> =14,2' 53 % p. desfosf.	✓ (p. cíclic en 2 pics)
L3-3'P	una banda menys retinguda i diverses més retingudes	✓ cíclic i m/z=2530 (+60)	Producte nou: t <sub>R</sub> =13,7' 28 %	✓ (p. cíclic en 2 pics)
L5-3'P	una banda molt tènue menys retinguda i diverses més retingudes	✓ cíclic i m/z=2633 (+155)	Producte nou: t <sub>R</sub> =14,0' 40 % pic doble	✓ (p. cíclic en 2 pics)

✓ s'observa la massa del producte cíclic

Taula 4.1. Resultat de les anàlisis dels crús de reacció amb EDC a les 24 h

A.



B.

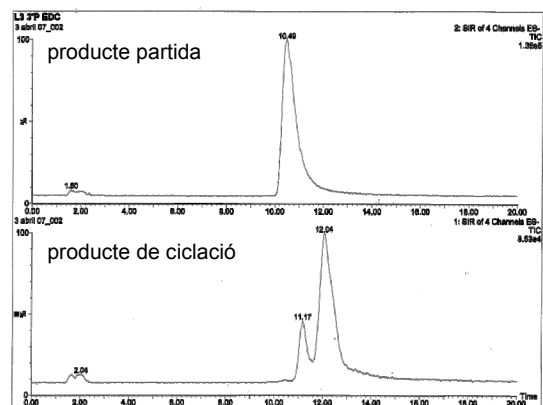


Figura 4.10. A: Anàlisi mitjançant PAGE. Carril 1: L3-3'P, carril 2: cru de L3-3'P, carril 3: L1-3'P, carril 4: cru de L1-3'P. B: Anàlisi mitjançant HPLC-MS del cru de reacció de L3-3'P: cromatogrames del SIR de la massa del producte de partida i la massa del producte de ciclació

Sembla que en aquestes condicions ja es forma producte cíclic, però amb un rendiment molt baix. Per això vam decidir intentar forçar una mica més les condicions de reacció, augmentant la quantitat de reactiu fins a 2 M (2000 eq., encara inferiors al descrit) i deixant reaccionar fins a 4 dies (96 h), mentre seguïem la reacció principalment per MS-MALDI-TOF, però realitzant també anàlisis mitjançant PAGE o HPLC-MS. Aquest assaig només es va realitzar amb el precursor lineal L5-3'P.

Per MS-MALDI-TOF vam poder observar com el pic corresponent al producte cíclic ( $m/z = 2452$  uma;  $M_{teòrica} = 2452.4$  uma) augmentava amb el temps de reacció. Però també apareixia i es feia major el pic corresponent a la modificació amb EDC ( $m/z = 2626$  uma,  $M_{teòrica} = 2470.4 + 155.2$ ) (veure Figura 4.11). L'anàlisi mitjançant HPLC-MS a les 67 h de reacció va mostrar, quan seguïem la massa dels productes cíclic i de partida, la presència d'ambdós en una proporció pròxima a l'1:1. L'anàlisi per PAGE a les 85 h de reacció va mostrar la presència d'una banda força tènue que migra més ràpid que el precursor lineal fosforilat (possible producte cíclic), però també de productes que migren més lents (probablement oligonucleòtids modificats amb EDC). L'anàlisi directe per HPLC és poc informatiu, tot i que apareix un pic a 14.3 min (40 %) que podria correspondre al producte cíclic, mentre que el pic de producte de partida ha disminuït considerablement (8 %,  $t_R = 12.6'$ ). Aquestes anàlisis no acaben de ser concloents, ja que per MS-MALDI-TOF observem la massa del producte cíclic amb gran intensitat (similar a la del precursor lineal, tot i que en principi els oligonucleòtids cíclics es vaporitzen pitjor), mentre que per PAGE la banda més intensa continua corresponent al producte lineal de partida.

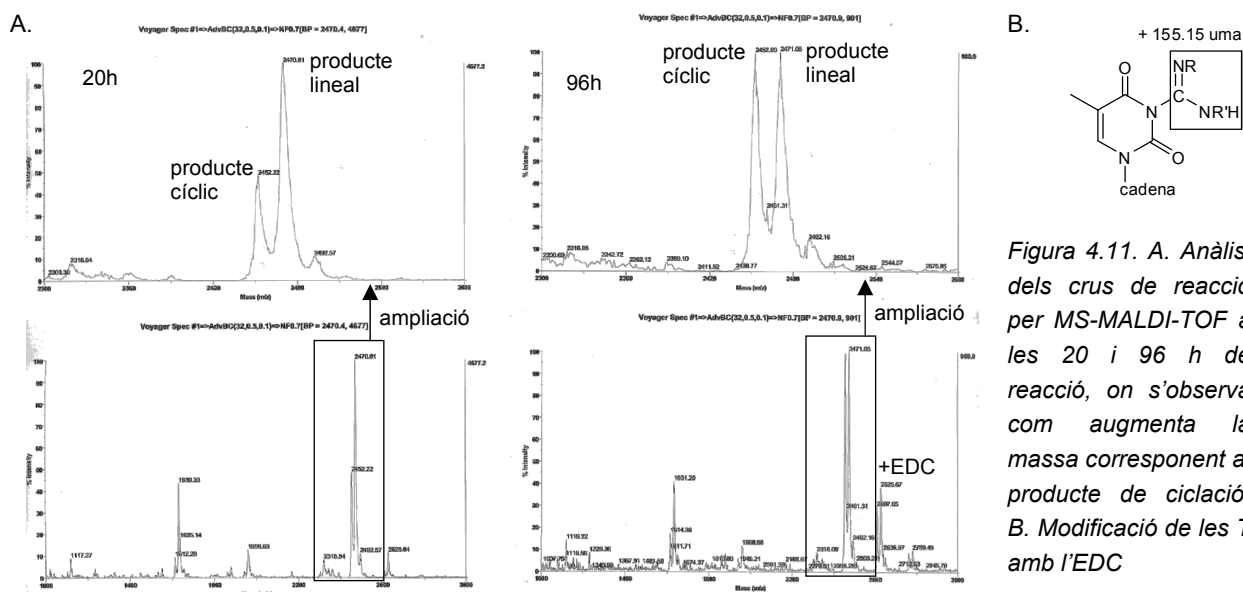


Figura 4.11. A. Anàlisi dels crús de reacció per MS-MALDI-TOF a les 20 i 96 h de reacció, on s'observa com augmenta la massa corresponent al producte de ciclació. B. Modificació de les T amb l'EDC

Per aquest motiu vam decidir realitzar un PAGE preparatiu, en retallàrem les bandes i després d'extreure els productes, se'n van analitzar les masses per MS-MALDI-TOF (Figura 4.12). Vam comprovar que la banda que migrava més ràpid que el producte de partida correspon a producte cíclic i que les bandes que migren més lentament corresponen a una modificació amb EDC. En aquestes, es va observar la massa del producte lineal modificat amb una unitat de carbodiimida, i també les

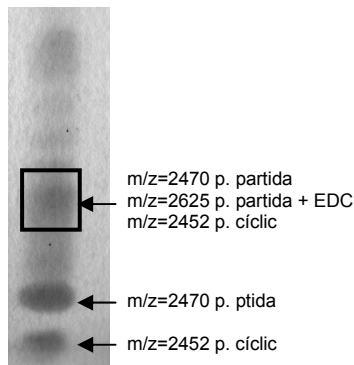


Figura 4.12. Anàlisi mitjançant PAGE on s'indiquen les bandes que es van retallar i les masses que s'observaren.

masses del producte lineal de partida i el producte de ciclació, que segurament corresponen als productes modificats per EDC en què s'ha revertit la modificació.

Finalment, vam realitzar un últim assaig amb major concentració d'EDC, fins als 5000 equivalents que s'empren normalment (5 M d'EDC). També vam dur a terme una reacció control en H<sub>2</sub>O. Aquest assaig només es va realitzar amb L5-3'P. Per poder analitzar els crús de reacció directament per MS-MALDI-TOF va ser necessari dessalar les mostres mitjançant Zip-Tips. Del seguiment de les reaccions per MS-MALDI-TOF s'observa la presència de

producte cíclic, tant en el cas del control en aigua com en el cas de la reacció, però la intensitat és menor en el cas del control en aigua. També s'observa la modificació de les bases amb EDC, tant del producte lineal com del cíclic, arribant fins a 2 unitats d'EDC addicionada en el cas de la reacció en medi salí i fins a 4 unitats d'EDC per al control en aigua, a les 48 h de reacció.

La reacció també es segueix per PAGE a les 24 i 48 h de reacció i per HPLC-MS a les 24h de reacció. L'anàlisi mitjançant HPLC-MS mostra producte cíclic en els dos casos, tot i que el cru de reacció en aigua és molt més brut que no pas el cru de reacció en medi salí. L'anàlisi per PAGE a les 48 h de reacció es mostra en la Figura 4.13.A. S'hi observa una banda tènue amb major mobilitat electroforètica que el precursor lineal. Com a patró de producte cíclic, s'ha emprat l'octàmer d<pCGCTCCGT>, que no és exactament igual al producte que es vol obtenir ja que té citosines en lloc de timines en la segona posició del llaç. Finalment es deixa reaccionar fins a 6 dies i s'observa, tant per MS-MALDI-TOF com per PAGE, que la quantitat de producte cíclic ha augmentat (Figura 4.13.B). En aquest cas la intensitat de la banda del producte cíclic és de l'ordre de la intensitat de la del producte de partida, de manera que podríem dir que la ciclació ha tingut lloc aproximadament en un 50 %. També observem bandes molt intenses de producte modificat amb EDC, que segurament corresponen tant a producte de partida com producte ciclat.

Així doncs, podem dir que vam obtenir producte de ciclació de L5-3'P, però el que ens va dur més problemes va ser l'aïllament del producte. L'única manera fou la realització d'un gel d'electroforesi preparatiu. En vam retallar la banda corresponent al producte cíclic, vam dessalar-la mitjançant Sep-Pak i es va analitzar per MS-MALDI-TOF i PAGE, confirmant-se la massa desitjada ( $m/z = 2449.8$  uma,  $M_{teòrica} = 2452.4$  uma) i la puresa mitjançant PAGE.

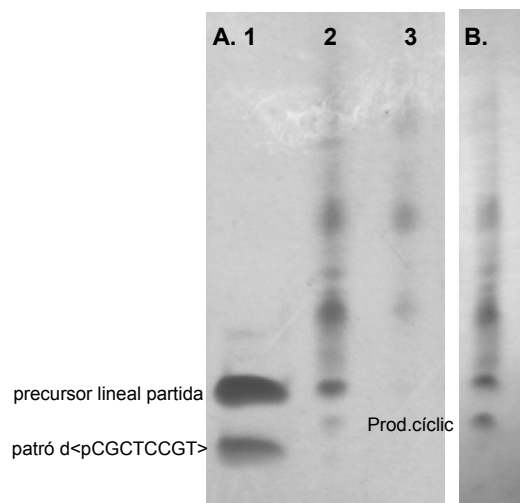


Figura 4.13. A. Anàlisi per PAGE dels crús de reacció a les 48 h. Carril 1: patrons. Carril 2: cru de reacció en medi salí. Carril 3: Cru de reacció en aigua. B. Anàlisi del cru en medi salí als 6 dies de reacció.

Atesa la poca quantitat de producte que vam aïllar del gel preparatiu, no va ser possible realitzar cap altre anàlisi. Caldria repetir aquesta reacció a gran escala per poder aïllar prou producte per realitzar estudis d'estabilitat enzimàtica enfront d'exonucleases, per tal de corroborar la natura cíclica del producte, i d'anàlisi de nucleòsids per determinar-ne la composició.

Paral·lelament al darrer intent de ciclació, es van voler dur a terme una sèrie d'assajos variant la concentració de precursor lineal i d'EDC per intentar trobar les condicions òptimes (Taula 4.2). Les reaccions es van dur a terme a 3 °C, en el medi amortidor estàndard i es van deixar reaccionar durant 3 dies. El posterior anàlisi mitjançant MS-MALDI-TOF va mostrar diferents relacions de producte cíclic i lineal i modificació de les bases mitjançant EDC. Les millors condicions sembla que són una concentració 1 o 2 mM d'oligonucleòtid i 5 M d'EDC (màxima concentració a la qual es pot dissoldre), ja que és quan obtenim la millor combinació entre major relació producte cíclic/producte lineal i menor quantitat de producte modificat per addició d'EDC.

Assaig	Concentració d'oligonucleòtid	Concentració d'EDC	equivalents	Anàlisi per MS-MALDI-TOF (relació cíclic/lineal i % modificació EDC)
1	100 µM	0.5 M	5000 eq	1:1.2 , 15 % +EDC
2	100 µM	1 M	10000 eq	1:0.4, 20 % +EDC
3	500 µM	2.5 M	5000 eq	1:0.3, 25 % + EDC
4	500 µM	5 M	10000 eq	1:0.15, 45 % + EDC i 15 % +2EDC
5	1 mM	5 M	5000 eq	1:0.25, 30 % +EDC
6	2 mM	5 M	2500 eq	1:0.2, 30 % +EDC

Taula 4.2. Assajos realitzats a diferents concentracions d'oligonucleòtid i EDC

#### 4.2.3 Ciclació amb CNBr i imidazole

Tot i que emprant EDC havíem aconseguit producte cíclic, hi havia el problema de la modificació de les bases d'una part força important de producte. Per això vam decidir assajar la ciclació emprant bromur de cianogen. Inicialment es van assajar les condicions descrites per Kool i col.<sup>209</sup>, que empen bromur de cianogen i imidazole en el medi: 200mM imidazole-HCl pH 7, 100 mM NiCl<sub>2</sub>, 100 mM CNBr (100 eq), deixant reaccionar durant 12 h i a una temperatura de 8 °C. Es van dur a terme els assajos amb L1-3'P i L3-3'P, i es van realitzar controls en H<sub>2</sub>O.

Seq.	Reacció	PAGE	MALDI-TOF	HPLC rp	HPLC-MS
L1-3'P	Control H <sub>2</sub> O	una banda més retinguda	×	~ apareix algun pic petit	×
	Kool	una banda menys retinguda	×	pic de producte desfosforilat molt més intens	s'observa massa prod. cíclic per SIR (poc intens)
L3-3'P	Control H <sub>2</sub> O	una banda més retinguda i una menys retinguda	×	apareix pic t <sub>R</sub> menor (14%)	×
	Kool	una banda menys retinguda	×	pic de producte desfosforilat molt més intens (sembla doble)	s'observa massa prod. cíclic per SIR (poc intens)

× no s'observa la massa del producte cíclic

Taula 4.3. Resum del assajos emprant CNBr i imidazole

Els resultats de les anàlisis no van ser concloents, ja que per PAGE s'observa una banda que migra més ràpid que el precursor lineal, que podria correspondre al producte cíclic (Figura 4.14.A i B), però no s'observa la massa desitjada per MS-MALDI-TOF. És probable que a l'oligonucleòtid cíclic li costi més volatilitzar-se que al lineal, com ens havia semblat observar en els assajos de separació dels *bi-loops* heterolineals (apartat 4.1.2), però tot i així hauríem d'observar-ne la massa encara que la intensitat fos petita. Si seguim la massa del producte cíclic mitjançant HPLC-MS, sí que s'observa un pic petit que correspon al producte desitjat en el cas de les reaccions en medi salí. Aquest fet tampoc no concorda ja que la banda que migra més per PAGE s'observa tant en a la reacció en H<sub>2</sub>O com en a la reacció en medi salí de L3-3'P i en canvi el pic de producte cíclic per HPLC-MS només s'observa en la reacció en medi salí.

Aquesta reacció amb CNBr i imidazole es va repetir amb l'oligonucleòtid L5-3'P, augmentat la concentració de CNBr fins a 1.5 M (1500 eq., ja propers als 2000-2500 descrits) i deixant reaccionar fins a 48h. L'anàlisi de la reacció mitjançant MS-MALDI-TOF i HPLC-MS va mostrar la presència de la massa del producte cíclic, tot i que força menys intens que el producte de partida. L'anàlisi mitjançant PAGE (Figura 4.14.C) va mostrar la presència de diversos productes que migraven més i algun que migrava menys, de manera que, tot i que tenim el patró d<pCGCTCCGT>, no sabem quina banda correspon al producte cíclic.

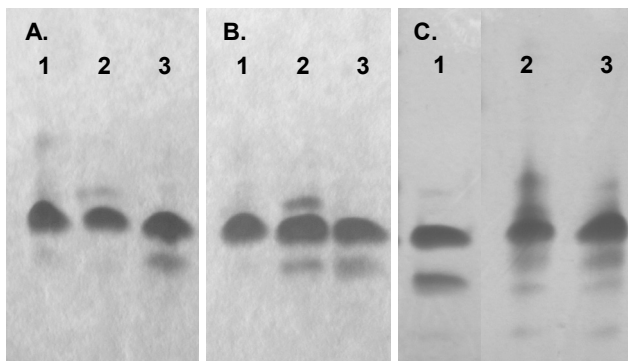


Figura 4.14. Anàlisi dels crús de reacció de: A. L3-3'P. B. L1-3'P. C. L5-3'P. Els carrils 1 corresponen a producte de partida (i patró de cicle en C) . Els carrils 2 corresponen a la reacció en H<sub>2</sub>O i els carrils 3 al cru de reacció en medi tamponat.

Tot i que aquestes condicions de reacció havien funcionat per a les reaccions models (capítol 3 d'aquest bloc), davant dels problemes d'anàlisi poc concloents, vam decidir assajar les condicions de Shabarova i col., que empra una major concentració de bromur de cianogen i generalment ja es realitza a baixa temperatura.

#### 4.2.4 Ciclació amb CNBr i MES

Es van assajar les condicions més enèrgiques descrites per Shabarova: MES-NaOH 200 mM pH 7, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, addicionant l'agent acoblant a una concentració de 1.88 M (1880 eq., inferior als 10000 descrits) i deixant reaccionar durant 5' a 5 °C. També vam realitzar un control en aigua. Aquests assajos es van dur a terme amb els oligonucleòtids L1-3'P, L3-3'P i L5-3'P. Només es va observar producte cíclic per MS-MALDI-TOF en els crús de reacció de L3-3'P i L5-3'P, però no va aparèixer cap banda addicional en l'anàlisi per PAGE ni es va observar producte cíclic per HPLC-MS. En l'anàlisi per HPLC apareixia un pic nou a major temps de retenció que el producte de partida.

L'assaig es va repetir en les mateixes condicions per a L5-3'P, deixant-lo reaccionar durant més temps i seguint la reacció per MS-MALDI-TOF. Es va observar producte cíclic des de temps curts de reacció, però la intensitat d'aquest pic no augmentava amb el temps sinó que apareixien altres pics que deuen correspondre a productes de degradació. L'anàlisi per PAGE als 3 dies de reacció (Figura 4.15) va mostrar l'aparició de dues bandes que migraven més ràpid que el producte lineal de partida i una de més lenta, que pensàvem que podria correspondre a producte desfosforilat. El producte cíclic presumiblement seria el de major intensitat. Aquest gel es va repetir a escala preparativa i se'n va retallar la banda intensa que migra més que el producte de partida, i es va corroborar que correspon al producte cíclic desitjat ( $m/z = 2451.2$  uma,  $M_{teòrica} = 2452.4$  uma). La banda que migra més lentament correspon a un producte de  $m/z = 2502$  uma, que no s'ha pogut identificar.

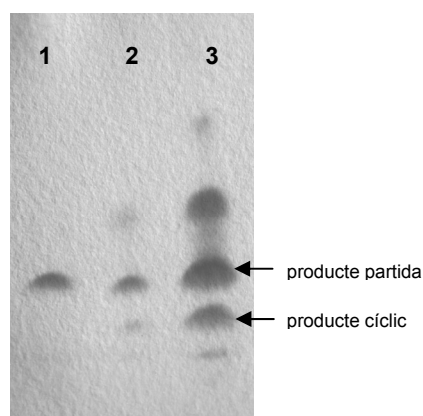


Figura 4.15. Anàlisi mitjançant PAGE als 3 dies de reacció.  
 Carril 1: precursor lineal. Carril 2: cru de reacció en  $H_2O$ .  
 Carril 3: cru de reacció en medi salí .

#### 4.2.5 Anàlisi dels resultats

Primer de tot cal dir que sembla que l'estabilitat del motiu estructural no és prou gran com per assegurar que la reacció de ciclació transcorri amb facilitat. En conseqüència, les condicions de reacció descrites a la literatura no són aplicables en el nostre cas ja que generalment es treballa a una concentració molt més baixa d'oligonucleòtid ( $50 \mu M$ ). Nosaltres necessitem treballar a concentració  $1$  mM per assegurar la formació del motiu i no sempre és possible incrementar la quantitat de reactiu per mantenir els equivalents descrits. En les reaccions amb EDC hem aconseguit arribar als  $5000$  eq. descrits, però això implica treballar a una concentració  $5$  M d'EDC, al límit de la seva solubilitat, i haver de dessalar les mostres per poder-les analitzar per MS-MALDI-TOF. En el cas de la reacció amb CNBr-imidazole, hem arribat a  $1500$  eq., propers als descrits, i per les condicions amb CNBr-MES només hem arribat a  $1880$  eq., molt inferiors als descrits, però hem incrementat el temps de reacció.

En segon lloc cal remarcar els problemes trobats per a l'anàlisi de les reaccions i la caracterització del producte. Existeixen contradiccions entre les diferents tècniques emprades ja que a vegades s'observa la massa del producte cíclic per MS-MALDI-TOF però en canvi no apareix cap banda que migri més ràpid que el producte de partida en l'anàlisi per PAGE. O viceversa, no s'observa la massa però sí que apareix una banda que podria correspondre al producte cíclic.

Deixant de banda aquests problemes, el que podem concloure és que:

- en general la ciclació emprant EDC funciona millor que no pas amb CNBr. Segurament això es degui a que la reacció amb EDC es pot deixar evolucionar durant més temps, ja que segueix avançant, però en canvi el bromur de cianogen s'hidrolitza i a partir d'un moment la reacció ja no progressa. El problema amb l'EDC és que dona reaccions secundàries amb les bases.

- respecte als controls en aigua, tot i que en algun cas també s'ha observat producte cíclic, podem dir que la ciclació pràcticament no té lloc, i que principalment s'observa que el precursor lineal reacciona amb l'EDC a través de les bases no aparellades.

- respecte a la ciclació de L3-3'P o L5-3'P, tot i que les proves forçant les condicions s'han realitzat amb L5-3'P per una major disponibilitat de producte, alguns dels assajos en què s'han realitzat reaccions en paral·lel mostren que la ciclació de L3-3'P funciona millor que la de L5-3'P. Aquest fet concorda amb la separació entre els grups a reaccionar segons les estructures de què disposem.

Com a plans de futur convindria repetir les reaccions amb L5-3'P i realitzar-les també amb L3-3'P en les condicions que considerem òptimes i aïllant suficient producte per a una caracterització completa:

- EDC: 50 mM MES-NaOH pH 6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 M EDC, 5 °C, 6 dies de reacció.

- CNBr: 50 mM MES-Et<sub>3</sub>N pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.88 M CNBr, 5 °C, 3 dies de reacció.

També ens agradaria assajar l'*N*-cianoimidazole, ja que segons Ferris i col.<sup>205b</sup> dona rendiments apreciablement millors que la combinació CNBr + imidazole, probablement degut al fet que el CNBr s'hidrolitza més ràpidament en el medi aquós de reacció. A més a més, les ciclacions més recents amb cicles de mida petita que han emprat un motlle de tipus quàdruplex (G-quàdruplex<sup>216</sup> i *i-motif*<sup>217</sup>) han usat aquest reactiu.

Com a altres opcions per augmentar el rendiment de producte cíclic, ens hem plantejat la formació d'un enllaç pirofosfat, ja que permetria la lligació entre grups no tan propers en l'espai i segurament amb major rendiment per la major nucleofília del fosfat enfront l'hidroxil. D'altra banda, l'ús de cosoluts neutres tipus polietilenglicol<sup>278</sup>, que augmenten la concentració efectiva d'oligonucleòtid i reactiu, podria millorar també el rendiment de la ciclació.





## 5 INTENT D'APLICACIÓ DE LA CICLACIÓ ASSISTIDA PER MOTLLE A LA FASE SÒLIDA

La idea darrere l'aplicació de la ciclació assistida per motlle a la fase sòlida ja ha estat apuntada en la introducció d'aquest bloc i resideix en combinar els avantatges d'ambdues aproximacions. Es tractaria de poder aplicar la metodologia de ciclació en estat sòlid desenvolupada al nostre grup a seqüències oligonucleotídiques més llargues i, per contrarestar la penalització entròpica, utilitzaríem el recurs d'aproximar els extrems en l'espai mitjançant l'estructuració amb un motlle, que podria ser intern o extern (Figura 5.1).

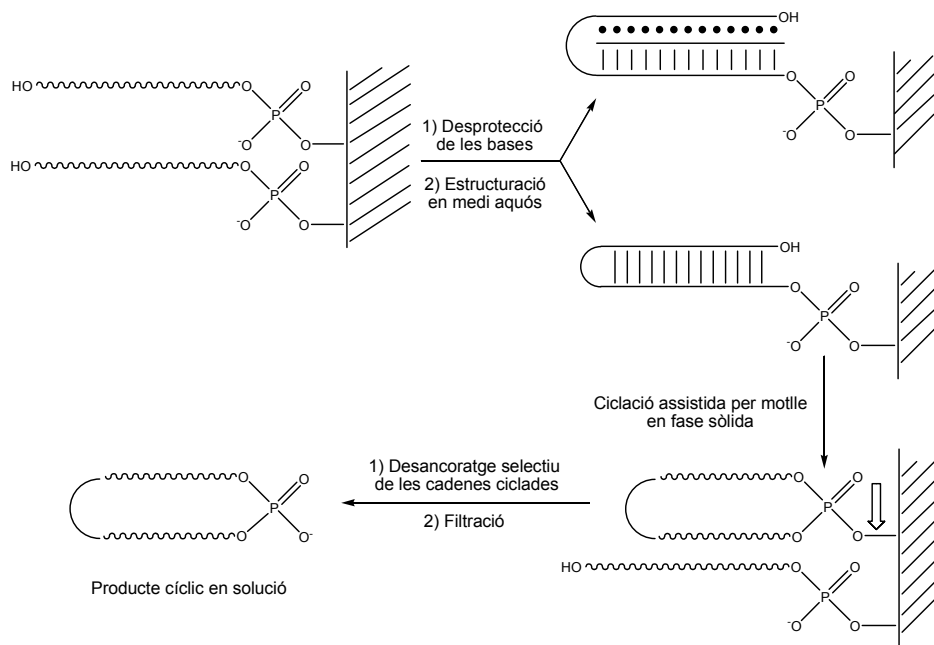


Figura 5.1. Esquema de l'aplicació de la ciclació assistida per motlle a la fase sòlida

Aquesta aproximació implicarà resoldre diverses qüestions:

- La desprotecció de les bases sense que es produeixi el desancoratge de l'oligonucleòtid.
- L'estructuració del motlle en medi aquós i alhora en fase sòlida, el que implicarà emprar una resina que tingui un bon comportament en aigua per a la ciclació, però també un bon comportament en solvent orgànics per a la síntesi del precursor lineal.
- L'activació d'un fosfat diester, mentre que en tots els casos de ciclació assistida per motlle s'activa i es fa reaccionar un fosfat monoester. En les metodologies de ciclació en solució anteriors, en què s'emprava el mètode del fosfat triester, sí que s'activava un fosfat diester, però es realitzava en medis orgànics amb reactius tipus MSNT, molt sensibles a la hidròlisi.

A la bibliografia només hem trobat una referència en què s'hagi ciclat químicament un fosfat diester<sup>229</sup>, però ha estat mitjançant la formació d'un enllaç pirofosfat, de manera que realment s'activa el fosfat monoester i el fosfat diester juga el paper de nucleòfil (Figura 5.2).

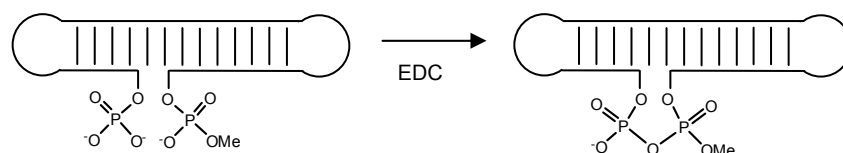


Figura 5.2. Formació d'un enllaç pirofosfat entre un fosfat monoester que és activat per l'EDC i un fosfat diester de metil

També cal destacar que a la literatura només existeix una aproximació similar a la nostra, però en la qual és el motlle extern el que es troba unit a una resina, de manera que s'hi hibrida el precursor lineal i es renta l'excés no hibridat abans de procedir a la ciclació en solució aquosa amb CNBr i imidazole, EDC o T4 DNA lligasa<sup>195</sup>. Com a suport sòlid empen CPG de mida de porus 2000Å i baixa funcionalització (2-5 µmol d'oligonucleòtid per g de resina), ja que determinen que aquestes són les millors condicions per a la hibridació sobre CPG.

La major part del treball d'aquest capítol va ser realitzada per Sinuhé Gracia Renard en el seu màster experimental<sup>279</sup>, sota la meua supervisió. Per aquest motiu només es comentaran de forma resumida els punts més importants

## 5.1 Elecció del motlle i de les seqüències

Es va escollir la formació d'un motlle extern, tipus trípex paral·lel o pirimidínic, ja que ha estat àmpliament estudiat per Kool<sup>209</sup> i aplicat amb èxit per diversos grups. L'elecció de les seqüències va venir marcada pel tipus d'estructura desitjada per a la hibridació entre el precursor lineal i la seqüència motlle: el precursor lineal havia d'estar format per dues regions polipirimidíniques que interaccionessin amb una seqüència motlle polipurínica (Figura 5.3). A part, també s'havia de tenir en compte que tant el precursor lineal com la seqüència motlle no formessin estructures internes. A més a més, es va escollir un precursor lineal ric en timines ja que no requereixen protecció en la base i això facilitarà la preparació del precursor lineal totalment desprotegit en fase sòlida.

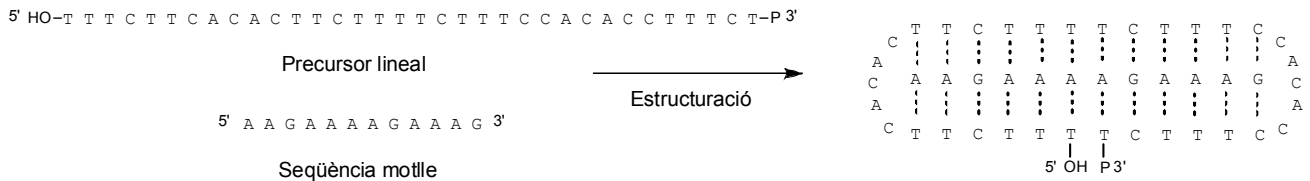


Figura 5.3. Seqüències escollides per al precursor lineal i el motlle

## 5.2 Assaig en solució

Abans d'intentar la ciclació en fase sòlida, es va comprovar que funcionava en solució, en les condicions descrites per Kool<sup>209</sup>: 50 µM del precursor lineal fosforilat en 3', 55 µM de la seqüència motlle (1.1 eq.), 200 mM de tampó d'imidazole-HCl pH 7, 100 mM de NiCl<sub>2</sub>. Es va escalfar per desnaturitzar la mostra, es va deixar refredar lentament per permetre l'estructuració dels oligonucleòtids i es va afegir la quantitat necessària de CNBr per tenir una concentració 125 mM de reactiu (2500 eq.). Es va deixar reaccionar durant 12 h i el cru es va dessalar mitjançant cromatografia d'exclusió molecular amb Sephadex G25. L'anàlisi mitjançant electroforesi en gel de poliàcrilamida (PAGE) va mostrar la quasi total desaparició de precursor lineal i l'aparició

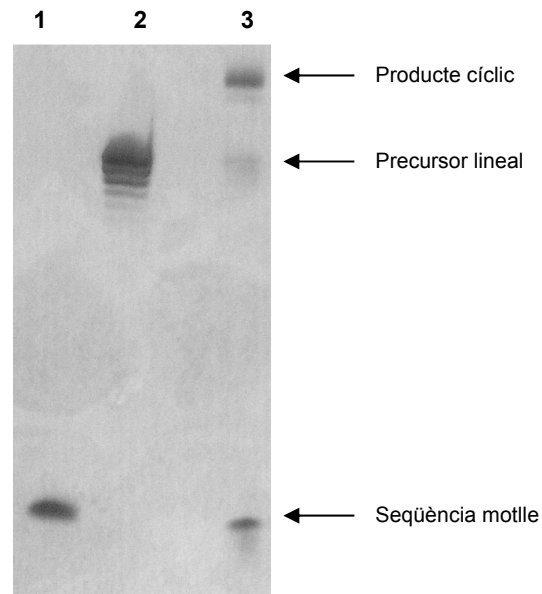


Figura 5.4. Anàlisi mitjançant PAGE en condicions desnaturitzants de la reacció de ciclació. Carril 1, seqüència motlle. Carril 2, precursor lineal. Carril 3, cru de reacció de ciclació

d'una banda corresponent al producte cíclic (Figura 5.4). Aquest presenta una migració menor que el precursor lineal, tal i com es troba descrit a la bibliografia per oligonucleòtids d'aquesta mida. La mostra es va purificar mitjançant PAGE preparatiu i es va caracteritzar per MS-MALDI-TOF. La caracterització mitjançant MS-MALDI-TOF del producte cíclic va ser costosa degut al seu elevat pes molecular, que en dificulta la desorció i volatilització. La massa trobada va ser de 10187.55 uma, mentre que la calculada és de 10192.60 uma. Tot i la diferència de cinc unitats entre les dues masses, el resultat es considera vàlid donada la grandària de l'oligonucleòtid. També es va realitzar un assaig de ciclació emprant les mateixes concentracions de reactiu i sals però amb un medi d'aigua/dioxà (1:0.7), que podria ser adequat per la ciclació en fase sòlida gràcies al bon comportament del suport sòlid TentaGel en dioxà, però no es va obtenir producte cíclic.

### 5.3 Intents de ciclació d'un oligonucleòtid 3'-fosfat diester

La ciclació en fase sòlida implica la condensació entre el fosfat diester de clorofenil de l'extrem 3' de la cadena, que es troba ancorada al suport sòlid, i l'hidroxil de l'extrem 5' (Figura 5.5). Com que la ciclació assistida per motlle requereix una estructuració entre el precursor lineal i la seqüència motlle, el medi de treball ha de ser aquós. Donat aquest fet, no es pot fer servir el reactiu típic per a l'activació de fosfats diester, l'MSNT, ja que s'hidrolitza, i s'han de buscar alternatives.

Inicialment es va assajar la ciclació en fase sòlida, com s'explicarà en el següent apartat. Davant els resultats negatius, es va intentar la ciclació d'un model en solució (apartat 5.3.2).

#### 5.3.1 Intent de ciclació en fase sòlida

La síntesi del precursor lineal és anàloga a la descrita per a la preparació d'oligonucleòtids cíclics (bloc 1, capítol 3, apartat 3.3.1). Després es realitza la desprotecció dels fosfats amb trietilamina/piridina i posteriorment es desprotegeixen les nucleobases amb un tractament amb amoníac aquós durant 4h a temperatura ambient. Aquest tractament és més suau que l'habitual ja que s'ha emprat el grup acetil per protegir els aminos exocíclics de les citosines, més làbil que el benzoïl que s'empra de manera estàndard. Les adenines estan protegides amb el grup benzoïl estàndard, però la seva desprotecció no és imprescindible per a la hibridació, ja que es troben en els llaços. Amb aquest tractament d'amonòlisi més suau s'intenta evitar un atac nucleòfil no desitjat sobre el fosfat diester o l'enllaç amida entre el *linker* i l'espaiador, que produirien el desancoratge prematur de l'oligonucleòtid. Vam comprovar que pràcticament no s'havia desancorat oligonucleòtid en el tractament amb  $\text{NH}_3$ .

Per realitzar l'intent de ciclació en fase sòlida, es va escalfar a 90 °C durant 5

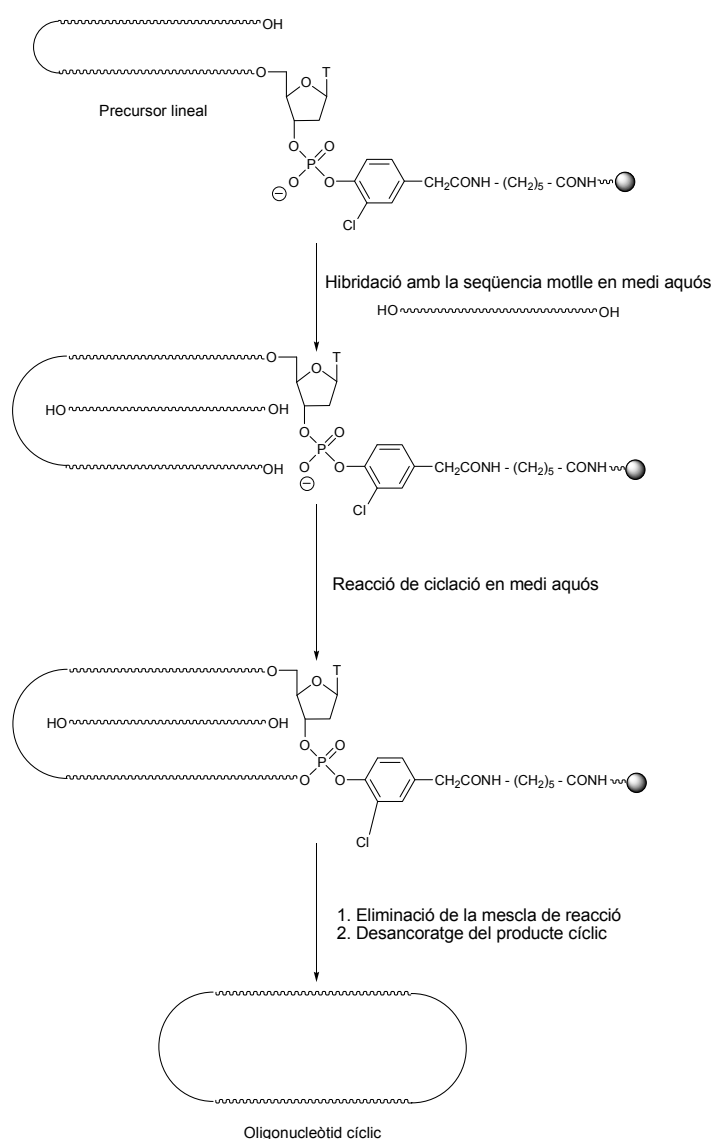


Figura 5.5. Esquema de la ciclació assistida per formació de tríplex en fase sòlida

minuts la mescla formada pel suport sòlid-precursor lineal, el motlle i el tampó i es va deixar refredar lentament fins a temperatura ambient per permetre l'estructuració dels oligonucleòtids. Es van doblar les concentracions dels oligonucleòtids i la quantitat de CNBr respecte a l'assaig en solució: 100  $\mu\text{M}$  de precursor lineal, 110  $\mu\text{M}$  de seqüència motlle, 200 mM d'imidazole-HCl pH 7, 100 mM de  $\text{NiCl}_2$ . El CNBr es va afegir un cop hibridades les cadenes i es va tornar a afegir CNBr a les 6 hores de reacció per tenir una concentració final de 250 mM. Finalitzada la reacció al cap de 12h, es van eliminar els reactius, es va rentar la resina i es va desancorar l'oligonucleòtid amb una solució 0.2 M de *syn*-piridin-2-aldoximat de tetrametilguanidini. Posteriorment es va dessalar la solució i s'analitzà el cru mitjançant PAGE, sense observar-se la presència del producte cíclic desitjat.

El resultat obtingut ens va portar a plantejar-nos diferents motius pels quals la ciclació no s'havia produït:

- L'efectivitat del reactiu per produir l'activació del fosfat diester perquè es produeixi la reacció de condensació. Per aquest motiu vam assajar la ciclació en solució d'un fosfat diester model (veure apartat 5.3.2).
- El comportament del suport sòlid enfront del medi aquós de treball i el seu grau de funcionalització, així com la correcta estructuració dels oligonucleòtids en el suport sòlid – medi aquós. El suport sòlid que s'ha emprat (TentaGel, copolímer de polietilenglicol i poliestirè) presenta una estructura en forma d'esferes poroses que permet el creixement de cadenes al seu interior, de manera que els oligonucleòtids no creixen únicament a la superfície. És important que el suport sòlid presenti un bon grau d'inflament en el solvent emprat per tal que la hibridació entre precursor lineal i motlle es produeixi correctament i per permetre l'accessibilitat dels reactius de ciclació a les cadenes interiors. Però el suport sòlid TentaGel no presenta un grau d'inflament gaire bo en aigua, fet que pot haver dificultat l'estructuració dels oligonucleòtids i l'accessibilitat dels reactius. Per aquest motiu, cal cercar suports sòlids amb un bon comportament en medi aquós (veure apartat 5.4).

### 5.3.2 Intents de ciclació d'un model en solució

Per comprovar si el problema en l'obtenció del producte cíclic podria ser l'efectivitat del reactiu per dur a terme la reacció de condensació, ens vam plantejar l'intent de ciclació en solució d'un oligonucleòtid fosfat diester de clorofenil que reproduïx l'estructura de l'oligonucleòtid ancorat sobre el suport. La síntesi d'aquest oligonucleòtid model es troba esquematitzada a la Figura 5.6 i descrita en detall en el màster de Sinuhé Gracia Renard<sup>279</sup>.

El cru de síntesi es va analitzar mitjançant HPLC i MS-MALDI-TOF i es va concloure que contenia una distribució d'oligonucleòtids amb diferent nombre d'adenines protegides, fet que concordaria amb que la desprotecció de les nucleobases va ser parcial donada la curta durada del tractament amb amoníac. Es va realitzar la purificació mitjançant MPLC, ajuntant totes les fraccions que contenien oligonucleòtid encara que amb diferent nombre d'adenines protegides, ja que es troben en els llaços i no intervenen en la hibridació amb la seqüència motlle. Finalment es va eliminar el grup DMT i es va quantificar, obtenint-se 29 OD de producte pur (34 % rendiment global).

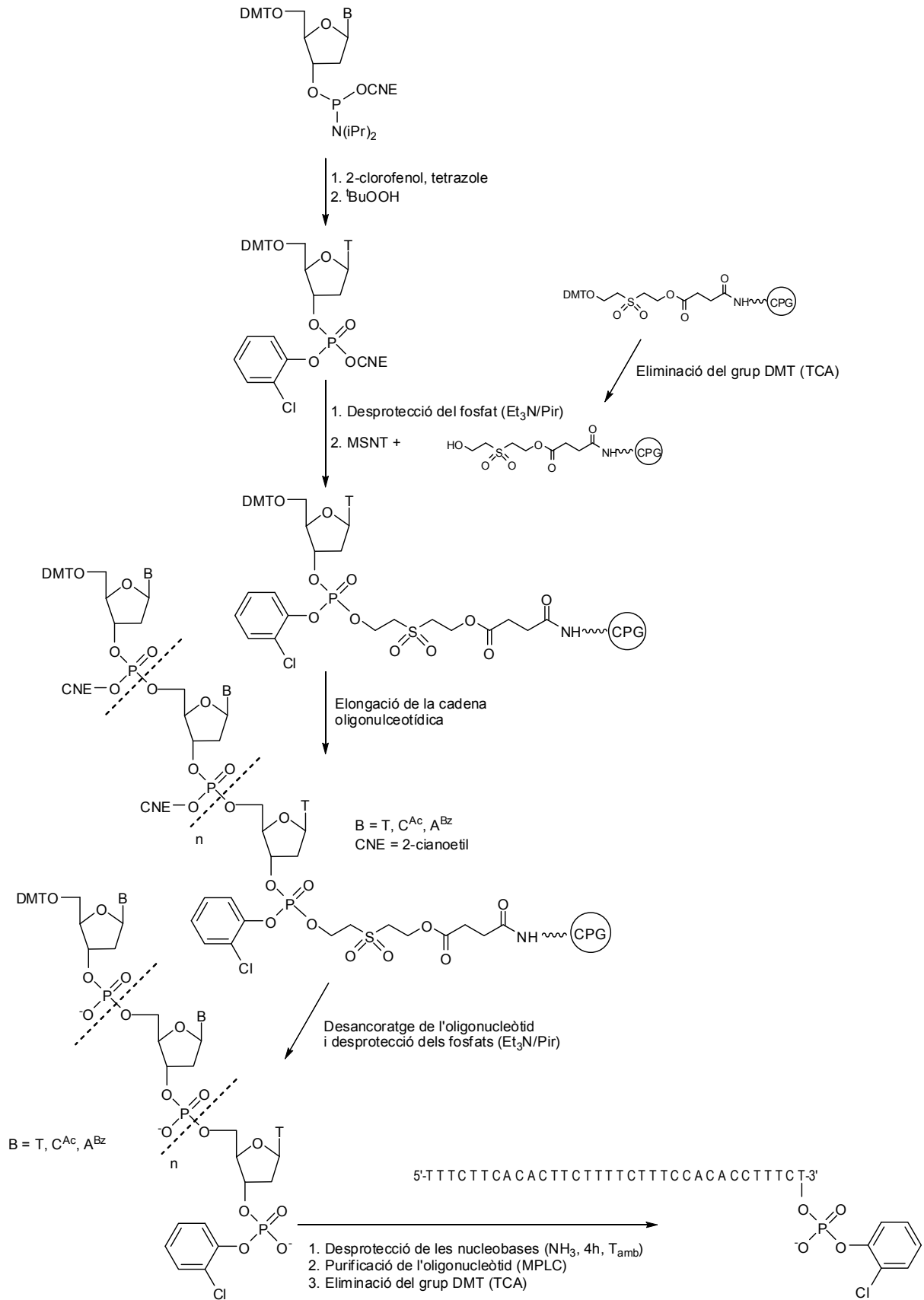


Figura 5.6. Preparació de l'oligonucleòtid 3'-fosfat diester de clorofenil

### 5.3.2.1 Intents de ciclació en medi aquós

La millor manera per dur a terme la condensació entre un fosfat diester i un hidroxil és emprant MSNT com a agent activant. Però, en aquest cas, a causa del medi aquós de reacció, es va descartar inicialment el seu ús ja que l'MSNT s'hidrolitza en presència d'aigua.

Ens vam plantejar realitzar diferents assajos, incloent com a agents acoblants el CNBr i l'EDC, carbodiimida que inicialment s'havia emprat a la química del fosfat triester, encara que amb resultats discrets. La dificultat de la reacció es troba en què els fosfats diesters s'activen molt més lentament i difícil que els fosfats monoesters<sup>280</sup>.

Es van realitzar quatre assajos de ciclació, dos d'ells emprant CNBr, amb imidazole (condicions de Kool<sup>209</sup>) o MES (condicions de Shabarova<sup>208</sup>) en el medi, el tercer assaig emprant EDC i el quart emprant EDC i HOBt amb les condicions descrites en la Taula 5.1:

Assaig	1	2	3	4
Precursor lineal	50 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Seq. motlle	55 $\mu$ M (1.1eq)	55 $\mu$ M (1.1eq)	110 $\mu$ M (1.1eq)	110 $\mu$ M (1.1eq)
Medi	200 mM imidazole-HCl pH 7, 100 mM NiCl <sub>2</sub>	250 mM MES-TEA pH 7, 20 mM MgCl <sub>2</sub>	50 mM MES-NaOH pH 6, 20 mM MgCl <sub>2</sub>	50 mM MES-NaOH pH 6, 20 mM MgCl <sub>2</sub>
Agent acoblant	125 mM CNBr (2500 eq)	500 mM CNBr (10000 eq)	200 mM EDC (2000 eq)	200 mM EDC i 100 mM HOBt
T i temps	T <sub>amb</sub> , 12-48 h	0 °C, 4 min	4 °C, 5.5 dies	4 °C, 5.5 dies

Taula 5.1. Diferents assajos de ciclació realitzats amb el fosfat diester model en medi aquós

L'anàlisi per PAGE de les alíquotes extretes a diferents temps de reacció de les diferents proves no va mostrar la presència del producte cíclic desitjat (Figura 5.7). Els resultats obtinguts ens van fer pensar en algun tipus de problema relacionat amb el precursor lineal, donat que amb EDC esperàvem l'obtenció de producte cíclic, encara que fos amb un rendiment discret. Aleshores vam realitzar un petit estudi de l'estructuració del precursor lineal.

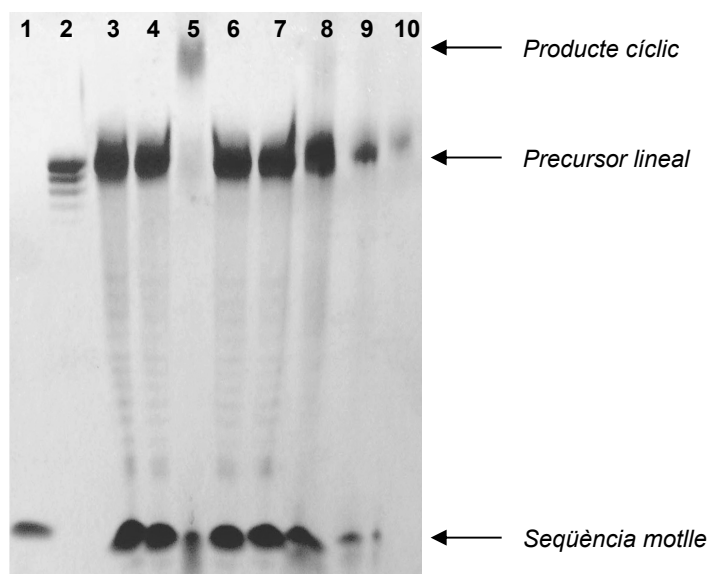


Figura 5.7. Anàlisi mitjançant PAGE en condicions desnaturalitzants dels crús de reacció dels assajos 1 i 4. Carril 1, seqüència motlle. Carril 2, precursor lineal. Carrils 3,4,6,7, cru de reacció de ciclació amb EDC/HOBt (assaig 4) a les 24, 48, 72h i 5.5 dies de reacció, respectivament. Carril 5, cru de reacció de ciclació del precursor lineal monoester. Carrils 8,9,10, cru de reacció de ciclació amb CNBr (assaig 1) a les 12, 24 i 48h de reacció, respectivament.

Es va enregistrar la corba de fusió, en presència de la seqüència motlle, del precursor lineal fosfat monoester i del precursor lineal fosfat diester (Figura 5.8). Les dues corbes de fusió presenten el mateix perfil amb dues temperatures de fusió molt semblants, essent 42 °C pel precursor lineal fosfat monoester i 41 °C pel precursor lineal fosfat diester. Aquest resultat sembla indicar una correcta estructuració del precursor lineal fosfat diester en les condicions emprades, tot i que l'experiment no és totalment concloent ja que el medi emprat per realitzar les corbes de fusió (10 mM de solució amortidora Tris-HCl pH 7, 100 mM de NaCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>) és diferent al de la reacció de ciclació (200 mM de solució amortidora d'imidazole-HCl pH 7, 100 mM NiCl<sub>2</sub>).

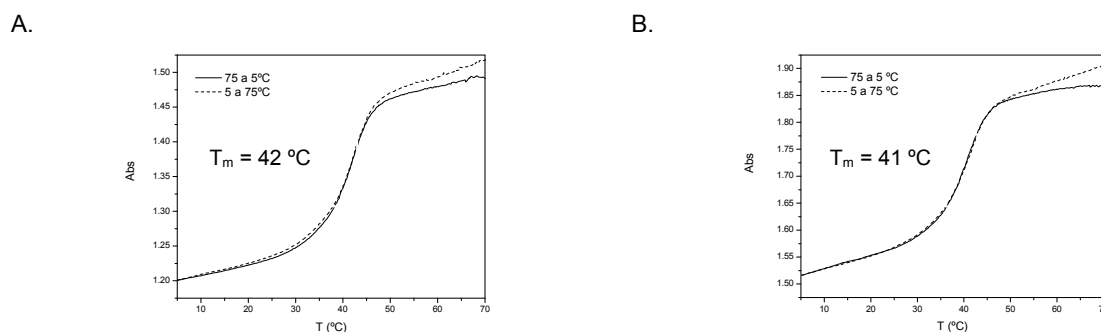


Figura 5.8. Corbes de fusió del precursor lineal fosfat monoester (A) i del precursor lineal fosfat diester (B) estructurats amb la seqüència motlle (3 μM precursor lineal, 3.3 μM motlle, 10 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>)

### 5.3.2.2 Intents de ciclació en medi orgànic

Els intents de ciclació en medi orgànic es basen en la idea d'hibridar els oligonucleòtids en un volum d'aigua mínim i un cop estructurats afegir-hi el reactiu dissolt en el solvent orgànic, per arribar a una composició final de 95 % de solvent orgànic i un 5 % d'aigua. Aquesta aproximació es va adaptar de les reaccions descrites a la bibliografia per a la síntesi orgànica assistida per DNA<sup>238</sup>, on la reacció entre dues molècules es porta a terme conjugant-les amb dos oligonucleòtids que en estructurar-se formant un dúplex apropen les dues molècules a l'espai permetent la reacció entre elles. Aquesta metodologia de primer hibridar en aigua i després afegir el reactiu en el solvent orgànic (Figura 5.9) ha estat emprada amb èxit per dur a terme reaccions amb reactius insolubles en aigua o reaccions que no poden tenir lloc en medi aquós<sup>281</sup>.

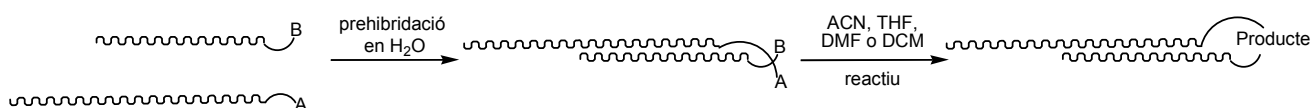


Figura 5.9. Reacció entre molècules conjugades a oligonucleòtids en medi orgànic

Els oligonucleòtids (2 nmol de precursor lineal i 2.2 nmol de seqüència motlle) s'hibridaren en 15 μl d'una solució aquosa 100 mM NaCl i 10 mM MgCl<sub>2</sub>, escalfant a 90 °C durant 5 minuts i deixant refredar lentament fins a temperatura ambient. Aleshores s'afegí l'agent acoblant en el dissolvent orgànic anhidre fins a un volum de 300 μl (95 % dissolvent orgànic, 5 % solució aquosa amb una



concentració final de 6  $\mu$ M del precursor lineal). El reactiu que es volia assajar per a la ciclació era l'MSNT, que ha estat emprat amb èxit per a la condensació de fosfats diester, dissolt en piridina anhidra o en una mescla de piridina i acetonitril. També es va provar de dur a terme la reacció amb EDC dissolta en ACN anhidre i, a efectes comparatius, en aigua. Varen realitzar-se diversos assajos, que es troben resumits a la Taula 5.2. En alguns casos (assajos 3 i 4), després de 12h de reacció es va afegir altra vegada MSNT. Transcorregut el temps de la reacció, els crús es van dessalar mitjançant filtració molecular amb Sephadex G-25 i s'analitzaren mitjançant PAGE, sense observar-se la presència de producte cíclic.

Assaig	1	2	3	4	5	6
Agent acoblant	MSNT				EDC	
Conc. i equiv.	0.2 M en pir (30.000 eq)	0.2 M pir/ACN (30.000 eq)	2.2 M en pir (300.000 eq)	2.2 M en pir (300.000 eq)	0.9 M ACN (125.000 eq)	10 M en H <sub>2</sub> O (500.000 eq)
Medi aquós (15 $\mu$ l)	100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>	100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>	100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>	50mM MES pH6 100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>
T i temps	T <sub>amb</sub> , 12h	T <sub>amb</sub> , 12h	T <sub>amb</sub> , 48h	T <sub>amb</sub> , 48h	T <sub>amb</sub> , 48h	T <sub>amb</sub> , 48h

Taula 5.2. Diferents assajos de ciclació realitzats amb el model fosfat diester en medi orgànic

El resultat negatiu d'aquests assajos es pot deure principalment a dos motius:

- La falta d'estabilitat de l'estructura tipus triple hèlix en el medi orgànic, ja que les reaccions descrites per Liu i col·laboradors per a la síntesi orgànica assistida per DNA aprofiten l'estructuració en forma de dúplex, i no pas en forma de tríplex.
- Un excés insuficient d'agent condensat donada la presència d'aigua en el medi de reacció i la seva degradació davant d'aigua.

També és possible que calgués optimitzar la proporció entre el precursor lineal i la seqüència motlle i assajar altres dissolvents orgànics o la proporció entre ells.

#### 5.4 Exploració de nous suports per a la síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida

Després de l'intent fallit de ciclació en fase sòlida, una de les qüestions plantejades va ser la relacionada amb el tipus de suport sòlid emprat. Calia un suport sòlid amb un bon comportament en medi aquós donada la necessitat d'una estructuració entre el precursor lineal i la seqüència motlle. A part del suport de boles de vidre de porus controlat (CPG) ja emprat en la síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida, en vam trobar d'altres que podrien tenir un bon comportament en medi aquós, però que mai s'havien fet servir per a la síntesi d'oligonucleòtids. Vam decidir assajar dos suports alternatius: el suport sòlid Aminomethyl-ChemMatrix (Figura 5.10.A) i el suport sòlid AM-SURE<sup>282</sup> (Figura 5.10.B). El primer està format per polietilenglicol reticulat amb grups aminometil i presenta bones propietats d'inflament tant en dissolvents apolars com polars. El suport AM-SURE està preparat a partir d'aminometil poliestirè, que es rigidifica per reacció dels grups amino amb 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina,

deixant només triazines lliures a l'exterior, que posteriorment es derivatitzen amb bis(2-aminopropil)-polietilenglicol. Aquest suport sòlid presenta una rigidesa que li confereix bones propietats mecàniques i permet un contacte fàcil dels grups funcionals amb els reactius.

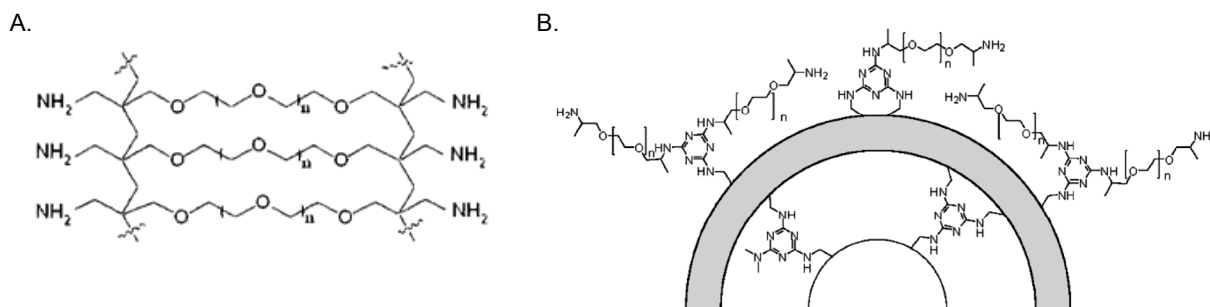


Figura 5.10. Estructures dels suports sòlids: A. Aminometil-ChemMatrix. B. Amsure.

La derivatització del suport polimèric per al seu posterior ús en la síntesi d'oligonucleòtids es va realitzar de la forma habitual, tal i com s'esquemmatitza en la Figura 5.11. Donat l'elevat grau de funcionalització inicial dels suports (769  $\mu\text{mol/g}$  l'Amsure i 680  $\mu\text{mol/g}$  la ChemMatrix), es van emprar unes condicions d'acoblament per obtenir una funcionalització molt més baixa que la inicial<sup>283</sup>. El grau de funcionalització final es va determinar mitjançant la quantificació dels cations DMT, essent de 67  $\mu\text{mol/g}$  per la resina Amsure i 32  $\mu\text{mol/g}$  per la ChemMatrix, valors adequats per a la síntesi d'oligonucleòtids. Posteriorment es van acetilar els grups amino que havien quedat sense reaccionar.

Per assajar aquestes resines, es va escollir una seqüència que contingués totes les bases amb l'objectiu que la síntesi fos prou representativa i es va triar un dodecàmer autocomplementari: d(ACGCGTACGCGT).

Es van realitzar diversos assajos modificant el programa de síntesi i introduint alguns canvis, anàlegs als que es realitzen en la síntesi d'oligonucleòtids cíclics sobre TentaGel: allargar els temps de destil·lació, acoblament i oxidació; dissoldre els derivats fosforamidit dels nucleòsids en mesclades ACN/DCM (1:1) i assajar l'hidroperòxid de *tert*-butil com a alternativa al iode, tot i que no hauria de ser necessari donat el bon comportament d'aquestes resines en aigua. Malgrat els diversos assajos i que la quantificació dels cations DMT efectuada pel sintetitzador suggeria un bon acoblament (veure Figura 5.12.A), no es van aconseguir crús de síntesi millors que els mostrats en la Figura 5.12.B, francament dolents. En els espectres de MS-MALDI-TOF dels crús s'observava la massa del producte desitjat i altres masses corresponents a fragments i deleccions.

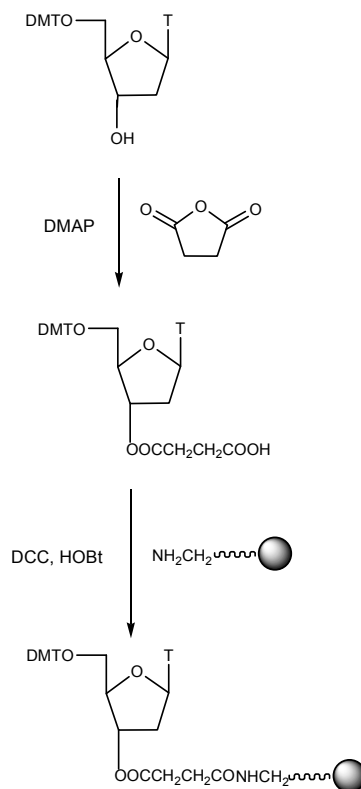


Figura 5.11. Derivatització dels suports polimèrics

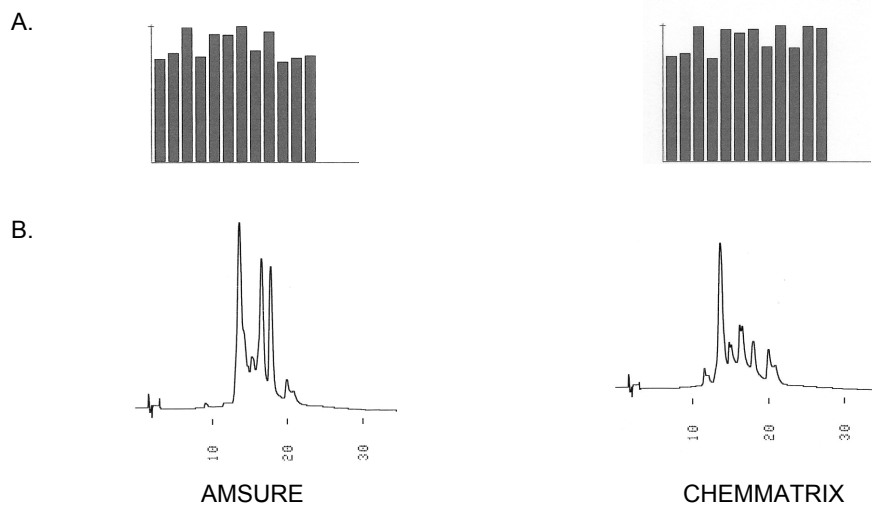


Figura 5.12. Resultats dels intents de síntesi sobre les resines Amsure i ChemMatrix. A. Quantificació dels cations DMT realitzada pel sintetitzador. B. Cromatogrames dels crús de síntesi del dodecàmer

Posteriorment a la realització d'aquest treball va aparèixer un article sobre l'ús de la resina ChemMatrix per a la síntesi d'oligonucleòtids així com per a la hibridació d'oligonucleòtids ancorats al suport sòlid<sup>284</sup>. Aquesta resina es va poder aplicar en la síntesi automàtica d'oligonucleòtids allargant el temps d'acoblament fins a 300s i dissolent els amidits en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Derivatitzant el suport convenientment perquè l'oligonucleòtid no es desancori en el tractament d'amonòlisi, es van obtenir oligonucleòtids ancorats al suport ChemMatrix que es van hibridar eficientment en solució aquosa amb la seva seqüència complementària.