

III. Interacció amb el DNA i citotoxicitat

Capítol 5.

Estudis d'interacció amb el DNA

5.1. Introducció

Fins ara està acceptat que la principal diana biològica dels compostos de platí, amb possible activitat antitumoral és el DNA. Aquesta interacció provoca un canvi en l'estructura secundària i terciària del DNA, que consisteix, en el cas del cisplatí, en la torsió d'entre 30 i 35° de la doble hèlix i un desenrotllament d'uns 20°, tal i com s'ha explicat en el capítol d'introducció. Per aquest motiu s'han estudiat els canvis que provoquen els diferents complexos de platí (II) sintetitzats en la molècula de DNA. S'ha treballat amb els compostos de platí que es mostren en la Figura 5. 1.

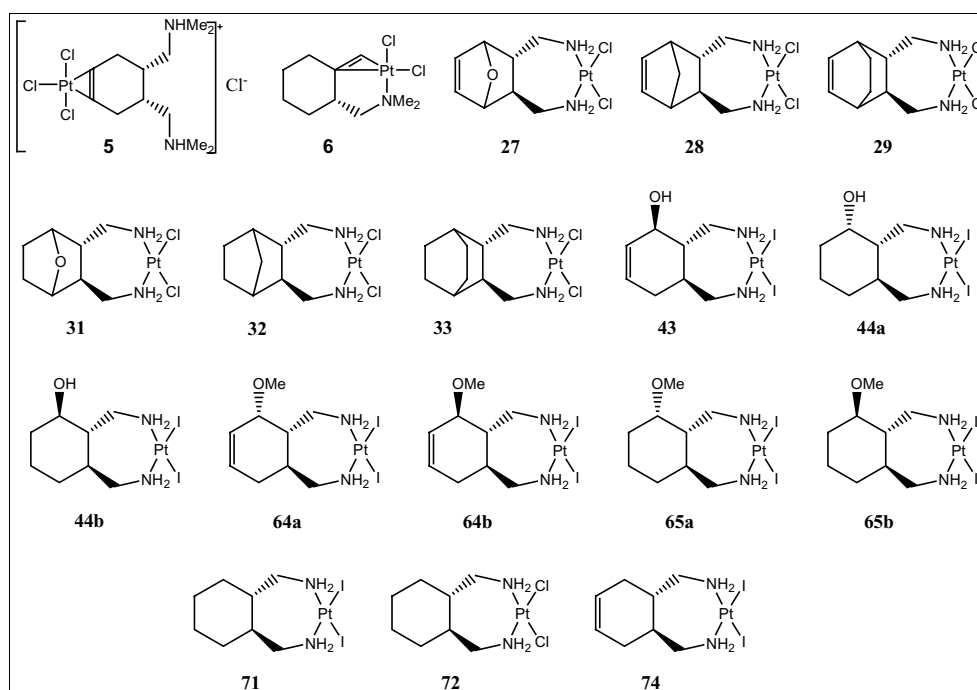


Figura 5. 1. Compostos de platí (II) emprats per als estudis d'interacció amb el DNA

De la mateixa manera que en la síntesi i caracterització dels compostos, s'han dividit els complexos en tres grans grups a l'hora d'estudiar la interacció amb el DNA. El primer està format pels complexos **5** i **6**, que tenen la peculiaritat de tenir un enllaç organometàl·lic. El segon grup de complexos el formen aquells que tenen lligands bicíclics (**27**, **28**, **29**, **31**, **32**, **33**) i finalment el tercer gran grup està format pels complexos amb lligands monocíclics (**43**, **44**, **64**, **65**, **71**, **74**).

A través de diferents tècniques s'ha estudiat, de forma qualitativa, la modificació que provoquen els complexos en el DNA. Els canvis provocats en l'estructura secundària del DNA s'han estudiat mitjançant la tècnica de **dicroïsmes circulars (DC)**; les modificacions produïdes en l'estructura terciària s'han vist a partir d'**estudis electroforètics (EF)** i; finalment s'han visualitzat les imatges mitjançant **microscòpia de forces atòmiques (Atomic Force Microscopy, AFM)**. En un principi, en totes aquestes tècniques són comparables els productes iodats amb els clorats, ja que es tracta dels lligands làbils i són les formes hidrolitzades les que interaccionen finalment amb el DNA.

5.2. Dicroïsmes circulars

5.2.1. Introducció a la tècnica

La tècnica de dicroïsmes circulars (DC) es basa en l'observació de la interacció entre la llum polaritzada circularment i molècules òpticament actives. Es mesura la dependència de l'absorció diferencial de la llum polaritzada circularment a la dreta i a l'esquerra respecte de la longitud d'ona. Aquesta tècnica és molt sensible als canvis de conformació de la molècula estudiada.

Quan el feix de llum polaritzat circularment travessa una substància òpticament activa, els raigs de llum polaritzats a la dreta i a l'esquerra viatgen a velocitats diferents i s'absorbeixen de diferent manera, és a dir els seus coeficients d'extinció no són iguals, $\epsilon_r \neq \epsilon_l$. La diferència $\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$ és el que s'anomena **dicroïsmes circulars** i és el valor que mesuren tots els espectrofotòmetres comercials. El resultat d'aquesta absorció diferencial és la llum polaritzada el·lípticament. Normalment, encara que l'aparell mesura $\Delta\epsilon$, s'acostumen a presentar els valors de l'el·lípticitat a les longituds d'ona considerades com a resultat.

L'el·lipticitat molar (Θ) es calcula com a:

$$\Theta = \Delta\varepsilon / c \cdot l$$

on c és la concentració de la substància òpticament activa (mol L^{-1}), l és el camí òptic (cm) i l'el·lipticitat molar Θ s'expressa com a $^{\circ} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

Per als àcids nucleics, els grups fosfat presenten transicions electròniques d'elevada energia a longituds d'ona per sota els 170 nm; els sucres tenen bandes d'absorció de molt baixa intensitat al voltant dels 190 nm. Els grups cromòfors dels àcids nucleics són les bases nitrogenades, ja que poden produir-se un gran nombre de transicions $\pi\text{-}\pi^*$, des dels orbitals π plens als orbitals π^* buits i d'energia més elevada. Aquestes transicions comencen sobre els 300 nm i tenen elevada intensitat. Els parells d'electrons no enllaçants de les bases poden donar lloc a transicions de tipus $n\text{-}\pi^*$, aquestes però, són d'intensitat menor i queden emmascarades per les transicions $\pi\text{-}\pi^*$.

Les bases per si soles tenen un pla de simetria i com a conseqüència no són òpticament actives. Tanmateix el sucre és asimètric i com que està unit a la base pel carboni C1', indueix DC en les bandes d'absorció de les bases. D'altra banda, l'elevat caràcter hidrofòbic de les bases, provoca el seu apilament, sobretot en dissolvents polars, de manera que les transicions electròniques estan tan properes que interaccionen per donar un espectre de DC d'alta intensitat.⁸⁴

Considerant aquesta dependència del DC amb les interaccions entre les bases, la tècnica és altament sensible als canvis en l'estructura secundària dels àcids nucleics i per aquest motiu s'ha escollit per a l'estudi dels canvis conformacionals que els complexos metàl·lics provoquen en el DNA.

En les figures següents es mostren algunes de les diferents formes que pot adoptar el DNA i els corresponents espectres de dicromisme circular. Així doncs, un canvi en l'el·lipticitat és indicatiu d'un canvi en l'apilament de les bases, en els solcs major i menor del DNA, i, en l'obertura i enrotllament de l'hèlix.⁸⁵ El DNA presenta diferents conformacions en funció de l'apilament de les bases, els ponts d'hidrogen que s'estableixen i les repulsions dels grups fosfats. Cada conformació presenta una corba de dicromisme circular característica, tal i com es comprova en la Figura 5. 3.⁸⁶

⁸⁴ Nakanishiova, K.; Berova, N.; Woody, R. W. *Circular Dichroism. Principles and Applications*, VCH Publishers Inc., New York, **1994**, 152-160.

⁸⁵ a) Ivanov, V. I.; Minchenkova, L. E.; Schvolkina, A. K.; Poletavev, A. I. *Biopolymers* **1973**, *12*, 89-95.

b) Maquet, J. P.; Butour, J. B. *Biochimie* **1978**, *60*, 901-905.

⁸⁶ a) Feilfeder, D. *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Serie de Biología Molecular*, Editorial Reverté S.A., Barcelona, **1991**.

b) Adams, R. L. P.; Knowler, J. T.; Leadre, D. P. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 11th ed., Chapman & Hall, London, UK, **1992**.

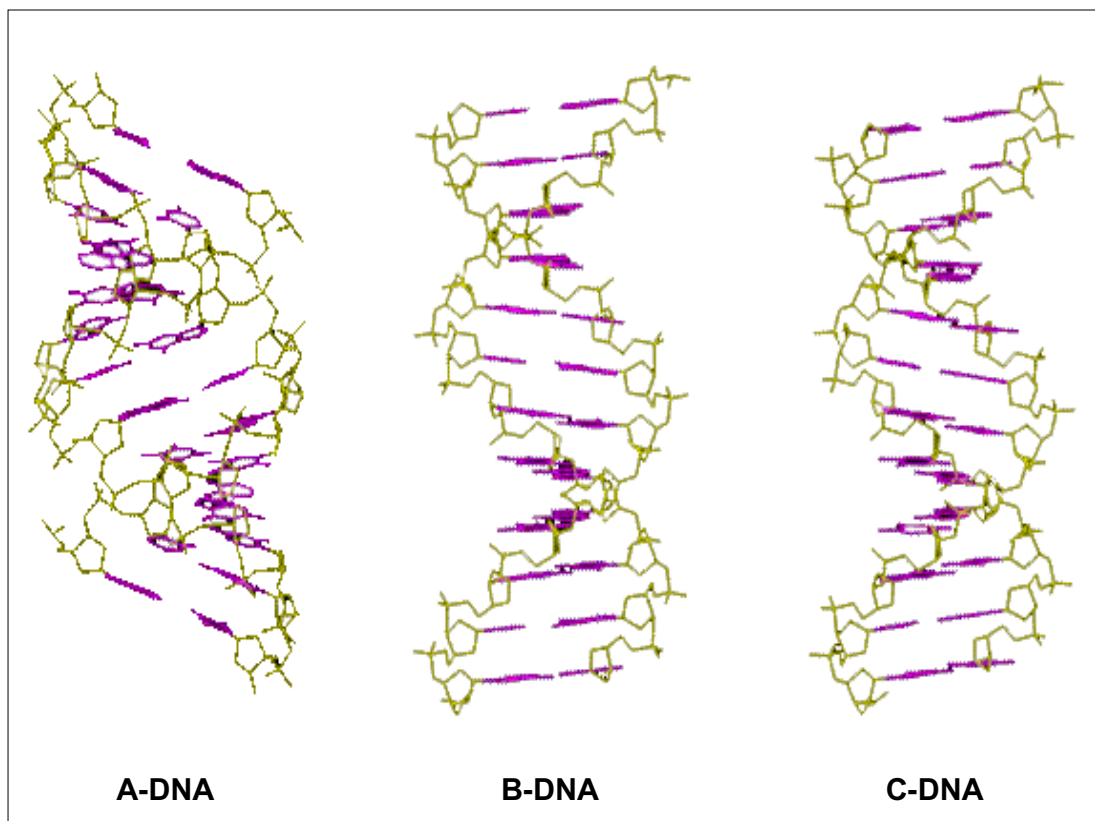


Figura 5. 2. Algunes de les conformacions del DNA.

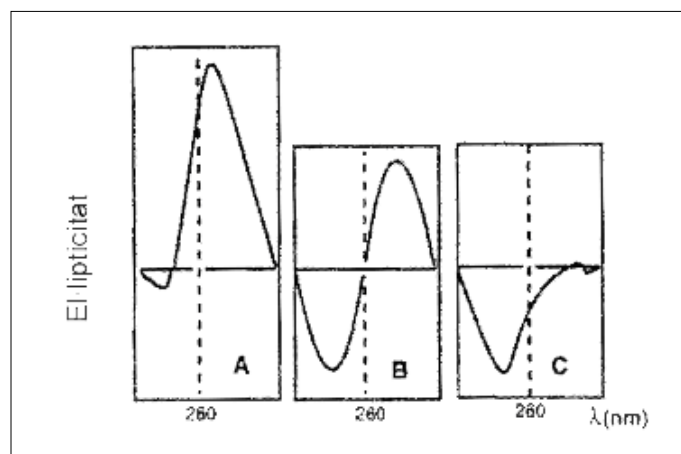


Figura 5. 3. Espectres de dicroïsm circular de les formes A, B i C del DNA.

5.2.2. Resultats i discussió

Per a realitzar aquests estudis s'ha emprat CT DNA (*Calf Thymus* DNA, CT DNA), que és un DNA lineal. Les mostres s'han incubat amb DNA a diferent raó molar teòrica per nucleòtid (r_i) durant 24 hores a 37 °C i en la foscor. Passat aquest temps s'han enregistrat els corresponents espectres de diòscime circular, tots ells es recullen en l'Annex II.

El que és interessant comparar són els canvis produïts tant en l'el·lipticitat com en la longitud d'ona en el màxim i el mínim de la corba de DC (diòscime circular). L'increment es calcula prenent com a referència la corba de DC del DNA lliure. Tots els resultats es comparen amb els obtinguts per al cisplatí, que es pren com a control positiu.

Com ja s'ha comentat per a facilitar la comparativa s'han dividit els compostos de platí en tres grans blocs, segons els Capítols 2, 3 i 4, per facilitar-ne el seu estudi comparatiu, i corresponen als tres següents apartats.

5.2.2.1. Complexos 5 i 6

S'ha estudiat, per a diferents r_i (raó molar teòrica de compost per nucleòtid), la interacció dels complexos 5 i 6 amb el CT DNA i s'han comparat els resultats amb els obtinguts per al cisplatí. Les corbes de DC obtingudes es mostren en la Figura 5. 4.

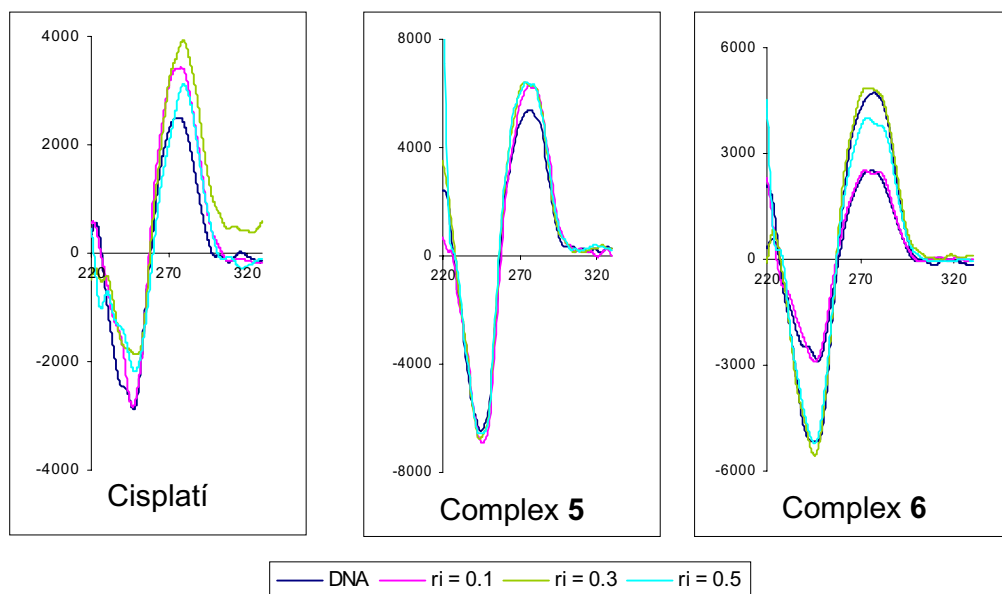


Figura 5. 4. Espectres de diòscime circular del cisplatí, complex 5 i complex 6 a diferents r_i .

En la Taula 5. 1 es mostren els valors d'el·lipticitat i longitud d'ona corresponents al màxim i al mínim de la corba de dicroïsm obtinguda per a cada r_i . També s'han calculat els increments d'el·lipticitat i longitud d'ona en el punt màxim respecte del DNA patró. Aquestes diferències són les que ens permeten comparar els diferents espectres obtinguts i s'han representat gràficament en funció de la raó molar teòrica de compost per nucleòtid (r_i), (Figura 5. 5).

| Mostra | r_i | $\Theta_{\max}^{[a]}$ | $\Delta\Theta_{\max}/10^3$ | $\lambda_{\max}^{[b]}$ | $\Delta\lambda_{\max}$ | $\Theta_{\min}^{[a]}$ | $\lambda_{\min}^{[b]}$ |
|-----------|-------|-----------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| DNA patró | | 5.41 | | 276.8 | | -6.46 | 244.9 |
| | 0.1 | 6.26 | 0.85 | 275.8 | -1.0 | -6.89 | 245.4 |
| Complex 5 | 0.3 | 6.42 | 1.01 | 273.3 | -3.5 | -6.75 | 243.9 |
| | 0.5 | 6.43 | 1.02 | 273.8 | -3.0 | -6.58 | 244.4 |
| DNA patró | | 2.50 | | 277.0 | | -2.88 | 247.4 |
| | | 4.71 | | 276.0 | | -5.18 | 246.0 |
| Cisplatí | 0.1 | 3.42 | 0.92 | 277.8 | 1.8 | -2.83 | 246.6 |
| | 0.3 | 3.92 | 1.42 | 279.2 | 3.2 | -1.88 | 249.2 |
| | 0.5 | 3.12 | 0.61 | 279.4 | 3.4 | -2.18 | 248.0 |
| Complex 6 | 0.1 | 2.51 | 0.01 | 272.4 | -4.6 | -2.91 | 245.4 |
| | 0.3 | 4.87 | 0.16 | 273.4 | -2.6 | -5.56 | 245.4 |
| | 0.5 | 4.02 | -0.69 | 273.6 | -2.2 | -5.21 | 245.4 |

[a]: deg·cm²·dmol⁻¹·10³ [b]: nm

Taula 5. 1. Valors corresponents als màxims i mínims en les corbes de dicroïsm circular a diferents r_i .

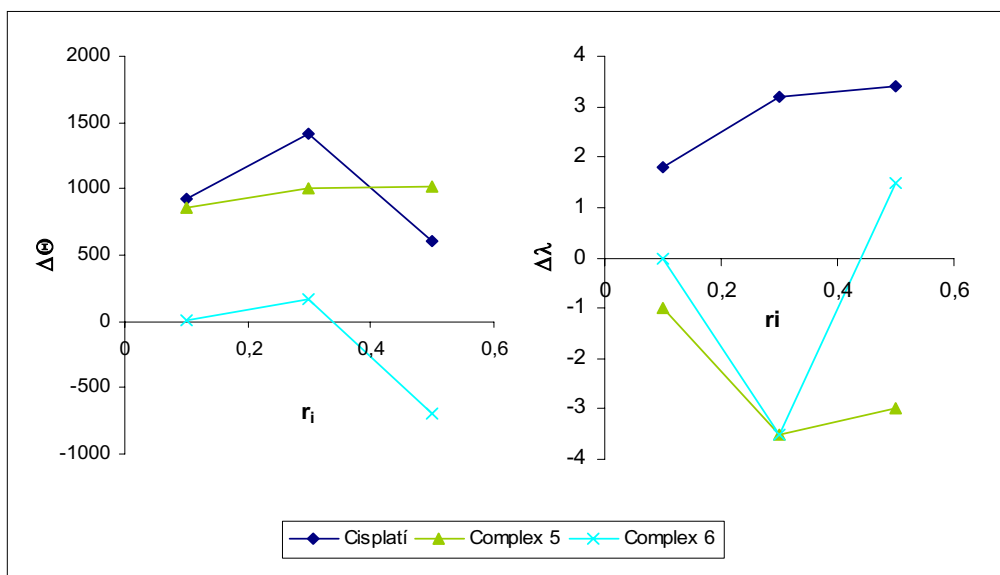


Figura 5. 5. Representació gràfica de la diferència d'el·lipticitat (esquerra) i longitud d'ona (dreta) en el punt màxim per als diferents valors de r_i .

En les gràfiques s'aprecia que tots dos complexos provoquen un augment en la banda positiva de l'el·lipticitat per a r_i baixes, que sembla que tingui tendència a disminuir en augmentar la concentració del complex, és a dir, per a r_i superiors. Aquest comportament és anàleg a l'observat en el cisplatí. En el cas del complex **6** per a $r_i = 0.5$ l'el·lipticitat en comptes d'augmentar, respecte del DNA patró, disminueix.

Pel que fa referència a les longituds d'ona s'observa un desplaçament hipsocròmic en tots dos complexos, desplaçament contrari al provocat pel cisplatí. El complex **6** però, mostra una tendència similar a la del cisplatí, és a dir, a mesura que augmenta la r_i s'observa un desplaçament batocròmic en la banda positiva del dicroïsme.

Comparant els dos complexos sembla que el **5** provoca un canvi més acusat en la corba de DC i per tant en l'estructura secundària del DNA. De fet té força lògica si observem les dues estructures. El complex **5** té tres lligands làbils, tres punts d'unió al DNA, està carregat positivament i podria interaccionar més fàcilment amb els fosfats del DNA i també presenta la possibilitat de formar ponts d'hidrogen mitjançant els dos grups amoni.

5.2.2.2. Complexos amb lligands bicíclics

Amb aquests complexos amb lligands bicíclics es pretén comparar la influència d'un major impediment estèric i una major rigidesa dels lligands a l'hora d'interaccionar amb el DNA. També es vol estudiar com afecta en l'estructura secundària del DNA la mida del pont i la presència d'un heteroàtom en el pont (pont oxigenat), així com la presència d'un doble enllaç en els complexos de platí.

Com en el cas anterior s'han incubat els diferents complexos amb CT DNA a diferents r_i a 37 °C durant 24 hores. Els espectres de DC obtinguts per a cadascun dels complexos es troben en l'Annex II. En la Taula 5. 2 es recullen els valors d'el·lipticitat i longitud d'ona corresponents al màxim i al mínim de la corba de dicroïsme circular per a cada valor de r_i , així com els increments d'el·lipticitat i longitud d'ona en el màxim.

Per comparar els diferents espectres de DC s'han calculat els increments d'el·lipticitat i longitud d'ona corresponents al màxim de la corba i s'han representat enfront de la raó molar teòrica del compost per nucleòtid, r_i (Figura 5. 6). Si ens fixem en la gràfica de l'increment d'el·lipticitat enfront de r_i s'aprecia que en general els complexos mostren un comportament similar al cisplatí, és a dir, que a r_i baixes augmenta $\Delta\theta$ i que a r_i superiors disminueix. Hi ha, però dues excepcions, els complexos **27** i **31**, que corresponen als dos complexos amb un lligand amb el pont oxigenat. En el cas del complex **27** s'observa un augment de $\Delta\theta$ a mesura que augmenta r_i . Tanmateix, el complex **31** mostra el comportament oposat, disminueix $\Delta\theta$ a mesura que augmenta r_i . Si comparem els complexos insaturats **27**, **28** i **29** amb els saturats **31**, **32** i **33** sembla que els canvis més

importants, referents a $\Delta\Theta$ els provoquin els complexos insaturats. A l'hora de comparar la mida del pont entre els complexos **28** i **29** i els complexos **32** i **33** s'aprecien canvis més importants quan l'impediment estèric és menor, és a dir amb els complexos **28** i **32**. En general és pot dir que tots els complexos provoquen canvis més acusats en les corbes de dicorisme circular que no pas el cisplatí.

En la gràfica de $\Delta\lambda$ enfront de r_i s'observa per a tots els complexos un desplaçament batocròmic com el que provoca el cisplatí.

| Mostra | r_i | $\Theta_{\max}^{[a]}$ | $\Delta\Theta_{\max}/10^3$ | $\lambda_{\max}^{[b]}$ | $\Delta\lambda_{\max}$ | $\Theta_{\min}^{[a]}$ | $\lambda_{\min}^{[b]}$ |
|-------------------|-------|-----------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| DNA patró | | 2.50 | | 276.0 | | -2.88 | 247.4 |
| | 0.1 | 3.42 | 0.92 | 277.8 | 1.8 | -2.83 | 246.6 |
| Cisplatí | 0.3 | 3.92 | 1.42 | 279.2 | 3.2 | -1.88 | 249.2 |
| | 0.5 | 3.12 | 0.61 | 279.4 | 3.4 | -2.18 | 248.0 |
| DNA patró | | 6.56 | | 273.8 | | -7.88 | 245.4 |
| Complex 27 | 0.1 | 7.79 | 1.23 | 274.2 | 0.4 | -7.11 | 246.2 |
| | 0.3 | 8.51 | 1.95 | 278.2 | 4.4 | -7.09 | 245.8 |
| | 0.5 | 9.37 | 2.81 | 276.6 | 2.8 | -6.21 | 247.0 |
| Complex 29 | 0.1 | 8.52 | 1.96 | 278.4 | 4.6 | -7.49 | 246.8 |
| | 0.3 | 8.57 | 2.01 | 278.8 | 5.0 | -5.72 | 248.0 |
| | 0.5 | 7.07 | 0.51 | 289.2 | 15.4 | -3.85 | 248.6 |
| Complex 31 | 0.1 | 10.55 | 3.99 | 278.8 | 5.0 | -6.55 | 247.0 |
| | 0.3 | 8.90 | 2.34 | 278.4 | 4.6 | -5.58 | 248.4 |
| | 0.5 | 7.02 | 0.46 | 281.6 | 7.8 | -4.37 | 248.0 |
| DNA patró | | 10.11 | | 273.8 | | -10.71 | 245.4 |
| Complex 28 | 0.1 | 14.49 | 4.38 | 279.4 | 5.6 | -7.67 | 248.0 |
| | 0.3 | 12.07 | 1.96 | 280.4 | 6.6 | -7.14 | 248.4 |
| | 0.5 | 13.85 | 3.74 | 279.2 | 5.4 | -8.15 | 248.4 |
| Complex 32 | 0.1 | 11.45 | 1.34 | 275.4 | -1.4 | -10.77 | 246.8 |
| | 0.3 | 15.48 | 5.37 | 277.6 | 0.8 | -8.79 | 248.4 |
| | 0.5 | 14.61 | 4.50 | 277.6 | 0.8 | -9.12 | 248.6 |
| Complex 33 | 0.1 | 14.13 | 4.02 | 277.0 | 3.2 | -9.69 | 247.4 |
| | 0.3 | 14.53 | 4.42 | 278.8 | 5.0 | -8.68 | 248.0 |
| | 0.5 | 11.74 | 1.64 | 278.4 | 4.6 | -7.37 | 248.8 |

[a]: $^{\circ}\text{cm}^2\text{-dmol}^{-1}\cdot 10^3$

[b]: nm

Taula 5. 2. Valors corresponents als màxims i mínims en les corbes de dicorisme circular a diferents r_i .

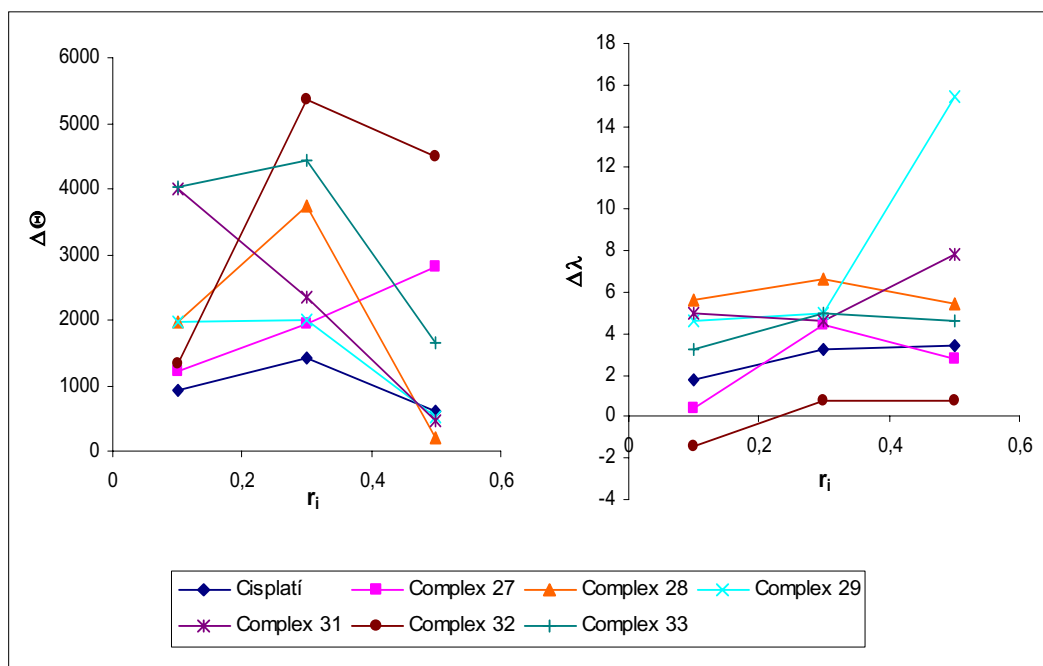


Figura 5. 6. Representació gràfica de la diferència d'el·lipticitat (esquerra) i longitud d'ona (dreta) en el punt màxim per als diferents valors de r_i .

5.2.2.3. Complexos amb lligands monocíclics

Els complexos amb lligands monocíclics presenten un menor impediment estèric i una major flexibilitat conformacional respecte dels complexos anteriors amb lligands bicíclics. Dins d'aquest grup de complexos es vol estudiar la influència d'un grup hidroxil, d'un grup metoxi i com afecta la seva configuració relativa, ja que es disposa de complexos diastereomèrics. Com en el cas anterior també es pretén observar la influència d'un doble enllaç. Totes aquestes característiques estructurals són les que es volen posar de manifest i estudiar la seva influència en l'estructura secundària del DNA, mitjançant la tècnica de dicromisme circular.

Els espectres de DC obtinguts per a cadascun dels complexos amb lligands monocíclics es troben en l'Annex II. En la Taula 5. 3 es recullen els valors d'el·lipticitat i longitud d'ona corresponents al màxim i al mínim de la corba de dicromisme circular per a cada valor de r_i , així com els increments d'el·lipticitat i longitud d'ona en el màxim.

| Mostra | r_i | $\Theta_{\max}^{[a]}$ | $\Delta\Theta_{\max}/10^3$ | $\lambda_{\max}^{[b]}$ | $\Delta\lambda_{\max}$ | $\Theta_{\min}^{[a]}$ | $\lambda_{\min}^{[b]}$ |
|-------------|-------|-----------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| DNA patró | | 2.50 | | 276.0 | | -2.88 | 247.4 |
| Cisplatí | 0.1 | 3.42 | 0.92 | 277.8 | 1.8 | -2.83 | 246.6 |
| | 0.3 | 3.92 | 1.42 | 279.2 | 3.2 | -1.88 | 249.2 |
| | 0.5 | 3.12 | 0.61 | 279.4 | 3.4 | -2.18 | 248.0 |
| DNA patró | | 4.96 | | 274.2 | | 245.4 | -5.02 |
| Complex 43 | 0.1 | 3.67 | -1.29 | 273.4 | -0.8 | -5.93 | 246.6 |
| | 0.3 | 3.18 | -1.78 | 277.6 | 3.4 | -5.44 | 248.4 |
| | 0.5 | 3.59 | -1.37 | 279.8 | 5.6 | -3.99 | 248.4 |
| DNA patró | | 3.62 | | 277.8 | | -5.77 | 244.6 |
| Complex 44a | 0.1 | 3.01 | -0.61 | 273.4 | -4.4 | -7.90 | 245.8 |
| | 0.3 | 5.38 | 1.76 | 276.0 | -1.8 | -4.42 | 248.4 |
| | 0.5 | 4.50 | 0.88 | 280.2 | 2.4 | -4.72 | 247.4 |
| Complex 44b | 0.1 | 6.35 | 2.73 | 274.0 | -3.8 | -4.02 | 246.0 |
| | 0.3 | 5.49 | 1.87 | 275.4 | -2.4 | -4.92 | 246.2 |
| | 0.5 | 6.08 | 2.46 | 276.8 | -1.0 | -4.34 | 246.4 |
| DNA patró | | 6.80 | | 275.4 | | -7.75 | 246.0 |
| Complex 64a | 0.1 | 7.97 | 1.17 | 276.2 | 0.8 | -7.33 | 246.0 |
| | 0.3 | 8.12 | 1.32 | 276.2 | 0.8 | -6.64 | 247.0 |
| | 0.5 | 7.90 | 1.10 | 278.0 | 2.6 | -4.99 | 248.2 |
| Complex 64b | 0.1 | 7.82 | 1.02 | 276.2 | 0.8 | -7.41 | 246.4 |
| | 0.3 | 8.40 | 1.60 | 277.8 | 2.4 | -7.14 | 247.0 |
| | 0.5 | 7.76 | 0.96 | 278.2 | 2.8 | -6.79 | 247.0 |
| Complex 65a | 0.1 | 7.07 | 0.27 | 275.2 | -0.2 | -7.39 | 246.6 |
| | 0.3 | 6.00 | -0.80 | 279.4 | 4.0 | -5.88 | 247.8 |
| | 0.5 | 6.50 | -0.30 | 278.2 | 2.8 | -6.47 | 247.2 |
| Complex 65b | 0.1 | 6.90 | 0.10 | 276.0 | 0.6 | -7.33 | 246.0 |
| | 0.3 | 6.38 | -0.42 | 279.6 | 4.2 | -6.64 | 247.0 |
| | 0.5 | 4.83 | -1.97 | 280.2 | 4.8 | -4.99 | 248.2 |
| Complex 74 | 0.1 | 6.43 | -0.37 | 275.4 | 0.0 | -7.01 | 246.6 |
| | 0.3 | 5.76 | -1.04 | 275.8 | 0.4 | -7.09 | 246.6 |
| | 0.5 | 2.18 | -4.62 | 283.4 | 8.0 | -2.10 | 246.2 |
| DNA patró | | 4.96 | | 274.2 | | -5.02 | 245.4 |
| Complex 72 | 0.1 | 5.34 | 0.38 | 275.0 | 0.8 | -4.97 | 246.0 |
| | 0.3 | 5.39 | 0.43 | 275.6 | 1.4 | -5.19 | 246.6 |
| | 0.5 | 4.69 | -0.28 | 279.8 | 5.6 | -4.50 | 247.0 |

 [a]: $^{\circ}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot 10^3$

[b]: nm

 Taula 5. 3. Valors corresponents als màxims i mínims en les corbes de dicromisme circular a diferents r_i .

Per a major claredat s'han representat dues gràfiques d'increment d'el·lipticitat enfront de r_i i dues gràfiques d'increment de longitud d'ona enfront de r_i , dividint els complexos en dos subgrups (Figura 5. 7 i Figura 5. 8).

En les gràfiques de $\Delta\Theta$ versus r_i s'observa un comportament distint en funció dels complexos. Els complexos **64a** i **64b** es comporten de forma gairebé idèntica al cisplatí. D'altra banda, s'aprecien valors negatius de $\Delta\Theta$ pels complexos **43**, **65a**, **65b** i **74**, és a dir que la seva el·lipticitat en el màxim de la corba de DC disminueix en relació a la corba de DNA. Els diferents diastereòmers es comporten de forma molt similar. També s'observen canvis importants comparant els complexos insaturats **43**, **64a**, **64b** i **74** amb els saturats **44a**, **44b**, **65a**, **65b** i **71**. Per exemple en els complexos **43** i **74** amb doble enllaç, com ja s'ha dit, presenten valors negatius de $\Delta\Theta$, en canvi els corresponents complexos sense doble enllaç **44a**, **44b** i **71** presenten valors positius de $\Delta\Theta$. Ara bé, en introduir un metoxi passa exactament el contrari, els complexos amb doble enllaç **64a** i **64b** mostren valors de $\Delta\Theta$ positius i viceversa pels complexos **65a** i **65b**.

Pel que fa referència a les gràfiques de $\Delta\lambda$ vs r_i s'observa la mateixa tendència per a tots els complexos, augmenta $\Delta\lambda$ en augmentar r_i . Existeix una excepció, en el complex **65a** per a $r_i = 0.5$ $\Delta\lambda$ torna a disminuir, mostrant el mateix comportament que el cisplatí. En tots els complexos s'aprecia un desplaçament batocròmic excepte pel parell de diastereòmers **44a** i **44b**.

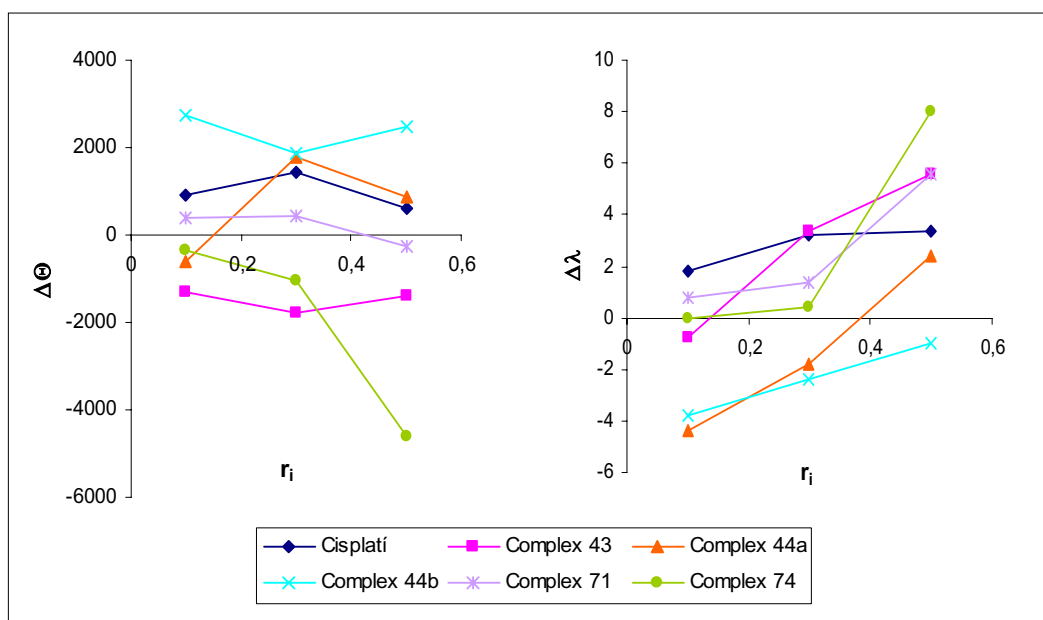


Figura 5. 7. Representació gràfica de la diferència d'el·lipticitat (esquerra) i longitud d'ona (dreta) en el punt màxim per als diferents valors de r_i .

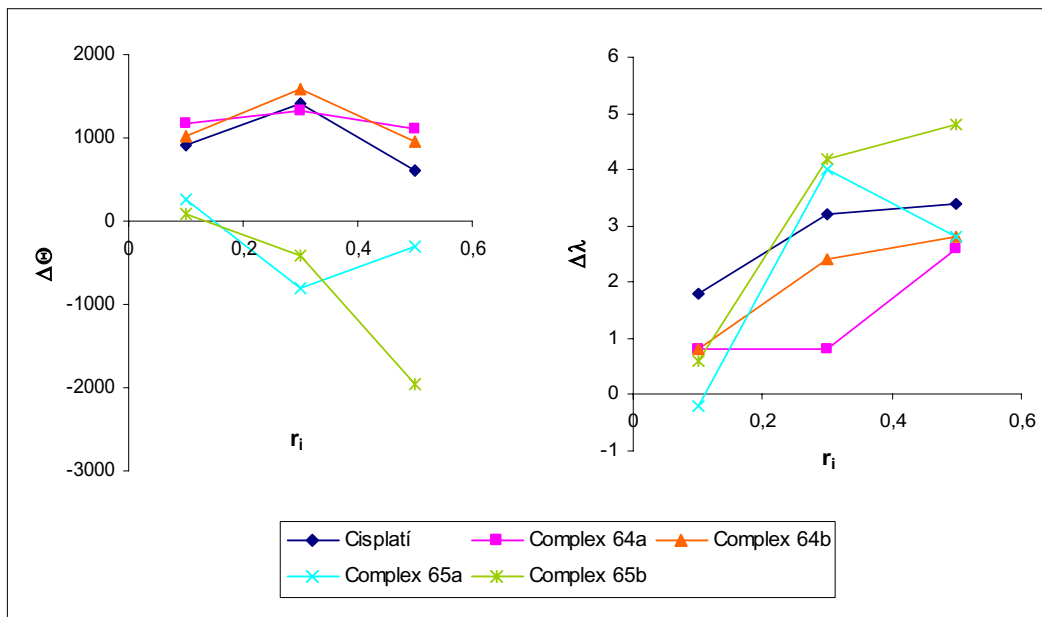


Figura 5. 8. Representació gràfica de la diferència d'el·lipticitat (esquerra) i longitud d'ona (dreta) en el punt màxim per als diferents valors de r_i .

5.2.2.4. Recapitulat

Els complexos **5** i **6** tot i presentar una estructura no convencional sembla que també són capaços de modificar l'estructura secundària del DNA.

Per als complexos amb lligands bicíclics i monocíclics s'aprecia una modificació en l'estructura secundària del DNA de forma diversa depenent de les diferents característiques estructurals. Així doncs es podrien realitzar les següents observacions:

- El comportament dels diferents diastereòmers és molt similar.
- S'observa força diferència en els compostos amb o sense doble enllaç.
- De la mateixa manera que passava amb el pont oxigenat, els canvis provocats pels complexos amb un grup hidroxil són més importants.
- En introduir un grup metoxil el signe de $\Delta\theta$ s'inverteix.
- Els complexos amb lligands bicíclics provoquen canvis més dràstics en les corbes de DC, de forma similar al cisplatí, és a dir amb $\Delta\theta$ positius.
- Els complexos **43**, **65a**, **65b** i **74** presenten valors de $\Delta\theta$ negatius.

5.3. Electroforesi

5.3.1. Introducció a la tècnica

L'electroforesi en gel d'agarosa és un dels mètodes més emprats per a separar i identificar fragments de DNA. En aquesta tècnica el DNA se sotmet a un camp elèctric de direcció i força constants i s'estudia la migració dels diferents fragments a través del gel. La migració diferencial de les molècules de DNA té lloc en funció de dos factors principals: la mida molecular i el grau de superenrotllament.

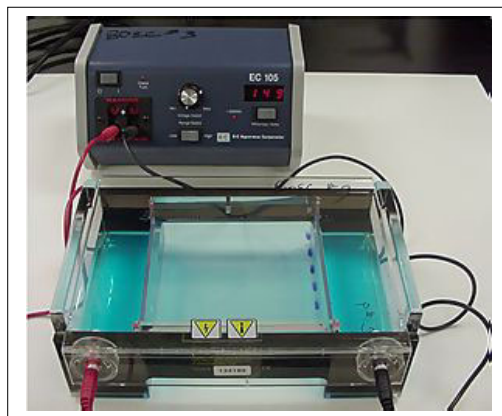


Figura 5. 9. Fotografia d'un aparell d'electroforesi en gel d'agarosa.

Per als nostres estudis electroforètics s'ha emprat gel d'agarosa i DNA del plàsmid pBR322. Els plàsmids es defineixen com a material genètic extracromosòmic que es troba en bacteris en forma circular quan estan en repòs, encara que poden presentar superenrotllament.⁸⁷ Aquest tipus de DNA presenta una mida fixa (4.36 kbp) i les molècules poden trobar-se majoritàriament en dues formes: la forma circular covalentment tancada (CCC), de major percentatge i la forma circular oberta (OC), que és la forma relaxada⁸⁸ (Figura 5. 10). Conjuntament amb aquestes dues formes també apareixen, de forma molt minoritària la forma lineal i les formes dimèriques.

La velocitat de migració de les dues espècies majoritàries depèn de molts factors com la diferència de potencial aplicada, el tampó emprat, la proporció d'agarosa en gel, la mida del DNA i el nombre de voltes superhelicoidals, entre d'altres factors. Tanmateix, per a unes condicions fixades, la velocitat de migració depèn exclusivament del nombre

⁸⁷ Grinsted, J.; Bennett, P. *Methods in Biology*, Vol. 21: *Plasmid Technology*, Academic Press, London, **1998**.

⁸⁸ Lippard, S.J. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 211

de voltes superhelicoidals, a més voltes, més compacta és l'estructura i augmenta la mobilitat. Així doncs, la forma CCC migra més ràpidament que la forma OC i es podran observar dues marques corresponents a les formes majoritàries del DNA.⁸⁹

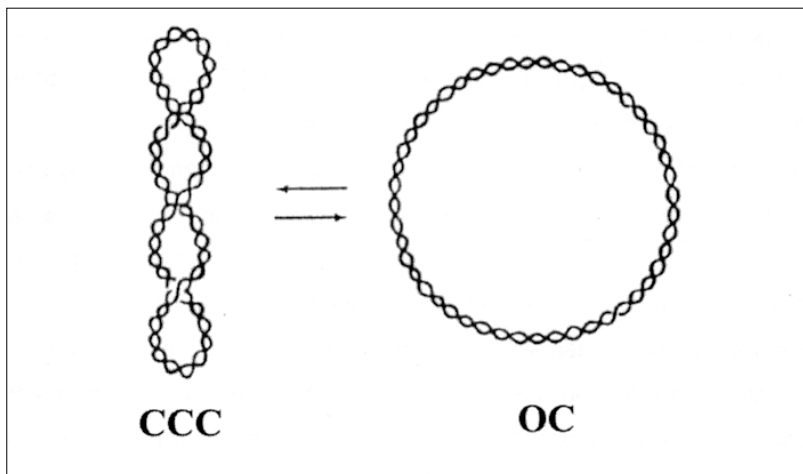


Figura 5. 10. Representació esquemàtica de les formes CCC i OC del DNA circular.

Els complexos metàl·lics poden provocar tant una disminució del superenrotllament com la compactació de la forma OC. Com a conseqüència s'espera un canvi en la mobilitat de les diferents formes del DNA i, per tant, poder avaluar les modificacions en la seva estructura terciària provocades pels complexos metàl·lics.⁹⁰

5.3.2. Resultats i discussió

La tècnica d'electroforesi en gel d'agarosa ens permet estudiar els canvis que produeixen els compostos en l'estructura terciària del DNA. S'ha treballat amb el DNA plàsmid pBR322, que és un DNA circular i que majoritàriament presenta les formes discutides anteriorment (Figura 5. 10). S'han incubat els diferents complexos de platí(II), que volien ser estudiats, amb el DNA pBR322 durant 24 hores a 37 °C. S'ha treballat a una raó molar de compost per nucleòtid de 0.5 i s'ha emprat el cisplatí com a control positiu.

⁸⁹ a) Nielsen, P.; Zhen, W.; Henriksen, U.; Buchardt, O. *Biochemistry* **1988**, *27*, 67

b) Keck, M.V.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3386

⁹⁰ a) Bowler, B.E.; Holis, L.S.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6102

b) Espezo, R.T.; Lebowitz, J. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 95

c) Cohen, G.L.; Bauer, W.R.; Barton, J.K.; Lippard, S.J. *Science* **1979**, *203*, 1014

Com en el cas del dicroïsme circular s'han dividit els compostos de platí en tres grans grups per tal de facilitar-ne els seu estudi comparatiu:

- Complexos amb lligands que s'enllacen a través d'un doble enllaç. (Complexos **5** i **6**)
- Complexos amb lligands bicíclics. (Complexos **27**, **28**, **29**, **31**, **32**, **33**)
- Complexos amb lligands monocíclics. (Complexos **43**, **44**, **64**, **65**, **71**, **74**)

5.3.2.1. Complexos 5 i 6

En la imatge es mostra l'electroforesi del DNA pBR322 (carril 1), i d'aquest incubat amb cisplatí i amb el complexos **5** i **6** a una raó molar de 0.5 (Figura 5. 11).

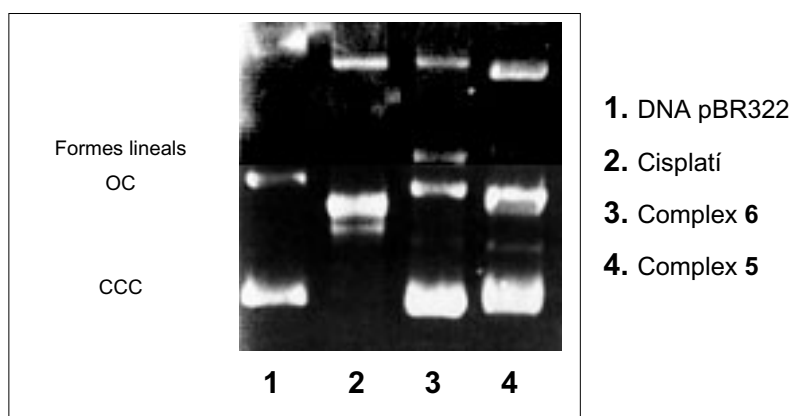


Figura 5. 11. Electroforesi en gel d'agarosa del DNA plàsmid pBR322 sol, incubat amb cisplatí, i els complexos **5** i **6** a una raó molar de 0.5.

S'ha emprat cisplatí com a control positiu (carril 2) ja que les modificacions que produeix en el DNA són ben conegudes. S'observa un retard de la forma CCC i un augment de la mobilitat electroforètica de la forma OC. Està descrit que per a cada àtom de platí enllaçat al DNA es produeix un desenrotllament de la superhèlix, és a dir de la forma CCC, de 13° mitjançant la ruptura de ponts d'hidrogen entre les bases. Si la quantitat de metall enllaçat és prou gran arriba un punt en què la forma CCC migra a la mateixa velocitat que la forma OC, la qual cosa indica que la superhèlix s'ha desenrotllat completament. Aquest punt rep el nom de *punt de coalescència*.⁸⁹ Quan el percentatge de metall és superior al del punt de coalescència, la superhèlix torna de nou a formar voltes superhelicoidals però, ara en sentit contrari, de manera que la mobilitat

electroforètica torna a augmentar.⁹¹ Aquest fenomen no s'arriba a observar en les raons molars estudiades en aquest treball. D'altra banda els adductes *cis*-bifuncionals provoquen una torsió en la doble hèlix, originant microplegaments locals i la conseqüent compactació de la molècula de DNA.⁹²

El complex **6** no provoca un canvi aparent en les formes OC i CCC del DNA, tanmateix s'observa un increment significatiu de les formes lineals del DNA. Per contra, el complex **5** sí que sembla tenir una certa tendència a retardar la forma CCC, és a dir, que els canvis produïts en el DNA van en la mateixa direcció que el cisplatí, tot i que segurament caldrien raons molars força superiors per observar canvis significatius.

5.3.2.2. Complexos amb lligands bicíclics

Dins d'aquest grup de complexos es pretén estudiar la influència de les diferents característiques estructurals dels lligands no làbils sobre els canvis patits en l'estructura terciària del DNA. En la Figura 5. 12 es mostra la imatge obtinguda mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.

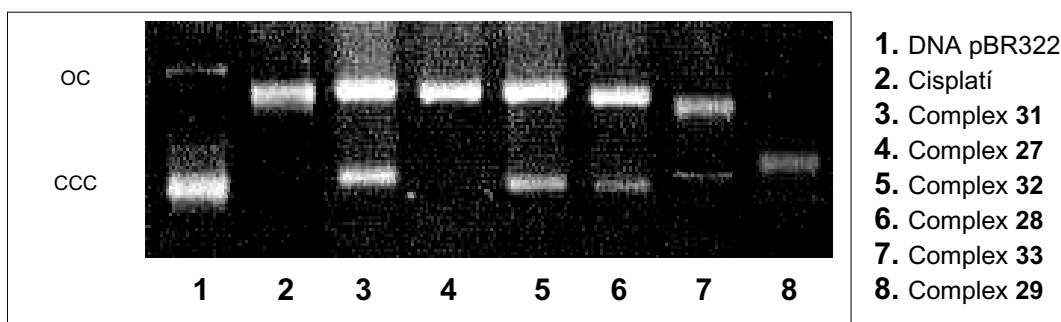


Figura 5. 12. Electroforesi en gel d'agarosa del plàsmid pBR322 sol, i incubat amb el cisplatí i els complexos que s'indiquen.

Els canvis més importants s'observen en els carrils 4 i 8 corresponents als complexos **27** i **29**, en ambdós casos es produeix coalescència de les formes OC i CCC del DNA, és a dir, provoquen canvis importants en l'estructura terciària del DNA de forma similar al cisplatí. El complex **33** (carril 7) provoca un augment de la mobilitat de la forma OC i un retard de la forma CCC, aquest últim senyal pràcticament no s'aprecia. En els altres

⁹¹ J.K. Barton, J.k.; Butini, J.; Gray, H.B.; Lippard, S.J.; Valentine, J.S. *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, California, **1994**.

⁹² Navarro-Ranninger, C.; Pérez, J.M.; Zamora, F.; González, V.M.; Masaguer, J.R.; Alonso, C. *J. Inorg. Biochem.* **1993**, *52*, 37.

casos, carrils 3, 5 i 6 (complexos **31**, **32** i **28**) els canvis produïts són molt menys significatius.

Si ens fixem en l'estructura dels lligands dels diferents complexos en general es pot assumir que la introducció d'un doble enllaç provoca una major modificació en l'estructura terciària del DNA (complexos **27**, **28** i **29**). Finalment, també s'aprecien diferències significatives en funció del pont dels lligands, els canvis més importants en la mobilitat electroforètica s'observen pels complexos amb lligands amb el pont oxigenat i amb el pont amb un grup CH_2CH_2 , aquest últim amb un major impediment estèric.

5.3.2.3. Complexos amb lligands monocíclics

S'ha treballat de la mateixa manera que en els casos anteriors a l'hora d'incubar les mostres i de realitzar l'electroforesi. La imatge obtinguda es mostra en la Figura 5. 13.

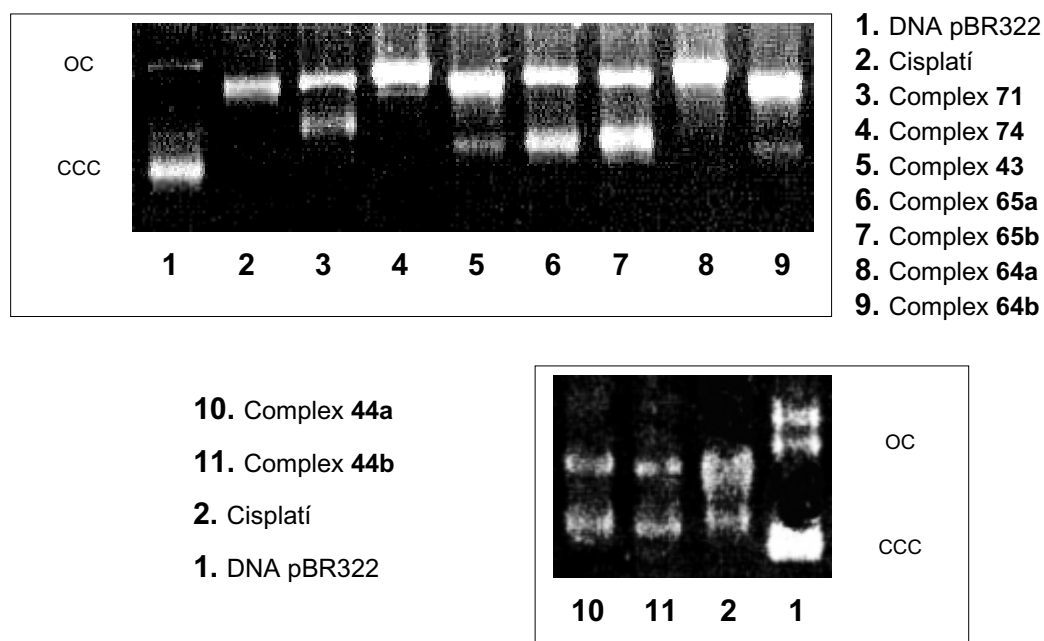


Figura 5. 13. Electroforesi en gel d'agarosa del plàsmid pBR322 sol, i incubat amb el cisplatí i els complexos que s'indiquen.

En una primera aproximació es pot dir que en major o menor intensitat tots aquests complexos són capaços de modificar l'estructura terciària del DNA. Tanmateix els complexos **65a** i **65b** provoquen canvis menys significatius (carrils 6 i 7).

De la mateixa manera que passava en el cas anterior, s'observen diferències força acusades entre els complexos amb lligands saturats i insaturats, els canvis més rellevants els provoquen els complexos amb lligands insaturats corresponents als carrils

4, 5, 8 i 9 (complexos **74**, **43**, **64a**, **64b**). D'altra banda els diferents diastereòmers tenen un comportament molt similar, només els diastereòmers **64a** i **64b** (carrils 8 i 9) mostren un comportament diferenciat, en el cas de **64a** s'observa coalescència, la qual cosa no succeeix per al complex **64b**.

En general els complexos **71** i **74**, que posseeixen un menor impediment estèric, són capaços de modificar l'estructura terciària del DNA amb una major intensitat que no pas els altres complexos. Tanmateix no s'observen diferències significatives entre els complexos amb un grup hidroxil (**43**, **44a**, **44b**) o un grup metoxil (**64a**, **64b**, **65a** i **65b**).

5.3.2.4. Recapitulat

Referent als complexos **5** i **6** es pot concloure que ambdós modifiquen l'estructura terciària del DNA, encara que de forma menys significativa que no pas el cisplatí. El complex **5** té una tendència similar als canvis produïts pel cisplatí. El complex **6**, per contra, sembla que no modifica les formes CCC i OC del DNA en aquestes raons molars, tot i que s'observa un augment significatiu de les formes lineals.

En general la resta de complexos, tant amb lligands bicíclics com amb lligands monocíclics, són capaços de modificar l'estructura terciària del DNA. Comparant-los cal sobretot destacar que els complexos amb lligands insaturats provoquen modificacions força més rellevants, així com els que presenten un menor impediment estèric en el cas dels complexos amb lligands monocíclics.

5.4. Microscòpia de forces atòmiques

5.4.1. Introducció a la tècnica

La microscòpia de forces atòmiques (*Atomic Force Microscopy*, AFM) és una tècnica que emprava un microscopi d'alta resolució, anomenat genèricament microscopi de camp pròxim. La imatge s'obté a partir de la interacció d'una punta (sonda) i la mostra, que es disposa normalment sobre una làmina de mica. Es mesuren els desplaçaments que es veu obligada a fer la sonda per mantenir una força constant. La poca separació que hi ha entre la sonda i la mostra permet mesurar una àrea de mostra molt petita. A diferència dels microscopis tradicionals la resolució no està limitada pels efectes de difracció sinó per la mida de la sonda.

La microscòpia de forces atòmiques està sent emprada en un gran nombre d'aplicacions en electrònica, telecomunicacions, biologia o química. S'empra tant en l'estudi de diferents materials (metalls, semiconductors, ceràmics, vidre, membranes sintètiques i biològiques, polímers, etc.) com en l'estudi de diferents fenòmens (abradió, corrosió, lubricació, etc.).

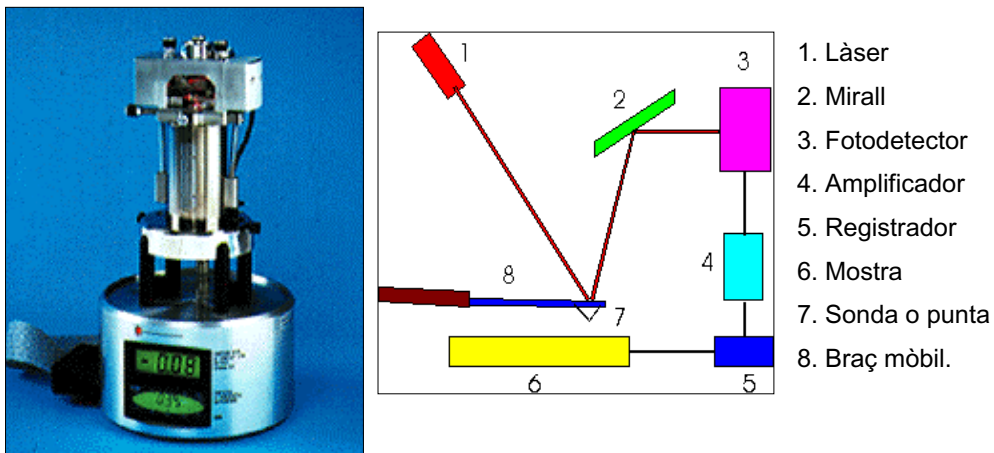


Figura 5. 14. Fotografia d'un aparell d'AFM (dreta) i esquema de les parts del microscopi d'AFM (esquerra).

La tècnica d'AFM presenta diferents modes, els tres més importants són el mode de contacte, el mode de no-contacte i el *tapping mode*, que es representen en la Figura 5. 15. És aquest últim mode el que va proporcionar una expansió de la tècnica cap a sistemes biològics ja que se superen els problemes associats a la fricció, l'adhesió i les forces electrostàtiques.

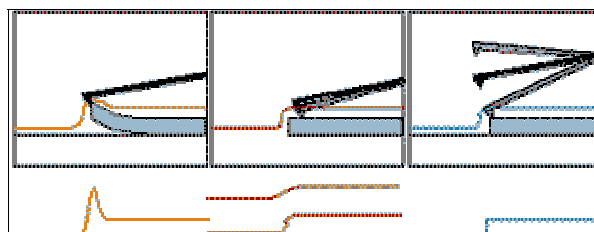


Figura 5. 15. Mode de contacte (dreta), mode de no-contacte (centre) i tapping mode (esquerra).

En el mode TMAFM (*tapping mode AFM*) el contacte entre la punta i la mostra és intermitent i dèbil, de manera que es minimitzen les forces laterals i les mostres no són arrossegades.⁹³

La TMAFM és una tècnica potent per a la investigació d'estructures biològiques, ja que no deteriora la mostra, permet l'estudi no tan sols en una interfase aire-sòlid, sinó també en una de líquid-sòlid, revela el relleu topogràfic real i la mostra pot visualitzar-se directament.⁹⁴ Els sistemes biològics que es poden analitzar són, entre d'altres, cristalls d'aminoàcids, DNA o RNA, cromosomes, membranes cel·lulars o proteïnes .

El 1992 es publicà la primera imatge creïble de plàsmid circular, obtinguda mitjançant AFM en aire.⁹⁵ S'aconseguí amb l'ús de cations divalents, com el Mg^{2+} , de manera que s'adsorbissin en la superfície de la mica i poguessin actuar de pont entre el suport i els grups fosfats del DNA, que estan carregats negativament a pH neutre.^{96, 97}

S'han realitzat molts estudis biològics per a observar l'efecte que provoca el cisplatí sobre diferents tipus de DNA.⁹⁸ Tots ells reflecteixen que les molècules de DNA es compacten i es fan més curtes com a conseqüència de la capacitat del cisplatí a enllaçar-se al DNA i provocar microplegaments.⁹⁹

5.4.2. Resultats i discussió

La tècnica de TMAFM permet visualitzar imatges de DNA i estudiar les modificacions que provoquen cadascun dels complexos. Per fer-ho s'han incubat els complexos amb el DNA plàsmid pBR322, prèviament escalfat a 60 °C, per afavorir-ne la seva forma OC. Les mostres s'han preparat a una relació molar d'aproximadament $r_1 = 0.5$ i s'han incubat 24 h a 37°C. També s'han obtingut imatges del DNA pBR322 i el cisplatí incubat amb el mateix tipus de DNA que, com en el cas del dicromisme circular i dels estudis electroforètics, s'ha emprat com a control positiu.

En la Figura 5. 16 es mostren les imatges del DNA i del mateix DNA incubat amb cisplatí, que serviran de referència per a la discussió de les imatges posteriors amb els altres complexos. El DNA lliure presenta una elevada relaxació i pot observar-se perfectament la seva forma circular OC. En canvi, quan està incubat amb cisplatí es veu la formació de microplegaments de la molècula que donen lloc a una compactació de la mateixa.

⁹³ Bustamante, C.; Garcia, R. *Investigación y Ciencia* **1997**.

⁹⁴ Fritzche, W.; Schaper, A.; Jovin, T.M. *European Microscopy and Analysis* **1996**, 5-7.

⁹⁵ Bustamante, C.; Vesenska, J.; Tang, C.L.; Rees, W.; Guthod, M.; Keller, R., *Biochemistry*, **1992**, 31, 22-26.

⁹⁶ Shao, Z.; Mou, J.; Czajkowsky, D.M.; Yang, J.; Yuan, J.Y., *Advances in Physics*, **1996**, 46, 1-86.

⁹⁷ Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*, New York: Springer, **1984**.

⁹⁸ Cohen, G.L.; Bauer, W.R.; Barton, J.K.; Lippard, S.J. *Science* **1979**, 203, 1014-1016.

⁹⁹ Onoa, B.; Cervantes, G.; Moreno, V.; Prieto, M. J. *Nucleic Acids Research* **1998**, 26 (6), 1473-1480.

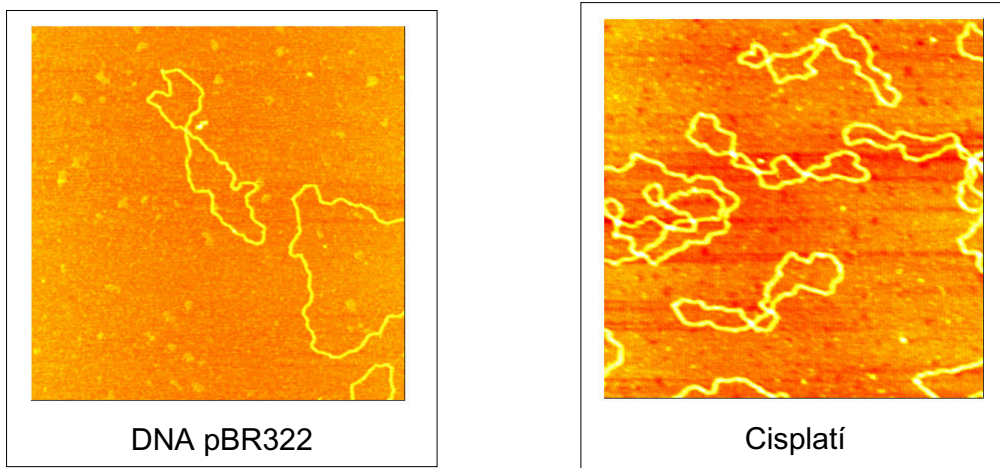


Figura 5. 16. *Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 (esquerra) i del mateix DNA incubat amb cisplatí (dreta).*

5.4.2.1. Complexos 5 i 6

En la Figura 5. 17 es mostren les imatges de DNA incubat amb el complex 5 i el complex 6 obtingudes.

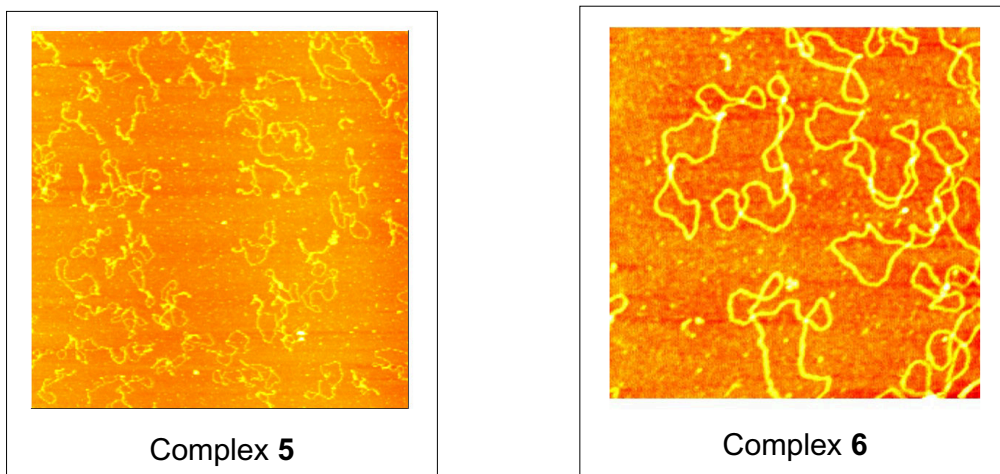


Figura 5. 17. *Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 incubat amb el complex 5 (esquerra) i el complex 6 (dreta).*

En el cas del compost 5 les imatges indiquen que es produeix una modificació en l'estructura del DNA, s'observa la formació de nodes que provoquen la compactació de la molècula. A més sembla com si hi hagués certa agregació, la qual cosa no és difícil d'interpretar si tenim en compte que el compost presenta tres possibles punts de

coordinació al DNA. Amb el complex **6** no s'aprecia l'agregació de diferents molècules de DNA, ja que només té dos lligands làbils i per tant dos possibles punts de coordinació al DNA. En aquest cas també es pot veure la formació de nodes i la compactació de la molècula, tot i que de forma menys acusada. També s'observen algunes molècules de DNA amb la forma CCC.

5.4.2.2. Complexos amb lligands bicíclics

Les imatges obtingudes de DNA pBR322 incubat amb els diferents complexos amb lligands bicíclics es mostren en les figures següents. En general s'aprecia que en tots els casos els complexos són capaços de modificar l'estructura del DNA. En les dues imatges de la Figura 5. 18 s'observa que els complexos **27** i **31** són capaços de modificar l'estructura del DNA de forma similar al cisplatí, mitjançant nòduls i microplegaments.

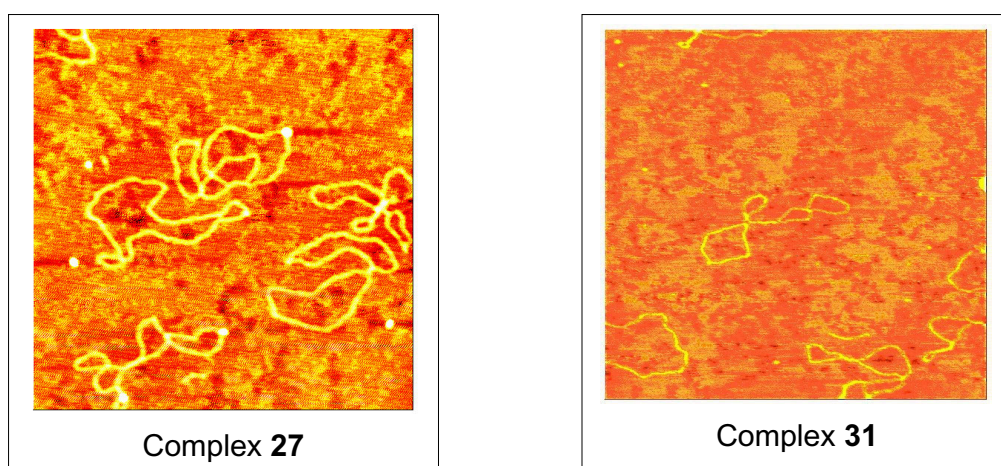


Figura 5. 18. Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 incubat amb el complex **27** (esquerra) i el complex **31** (dreta).

Tant el complex **28** com el complex **32** provoquen una sèrie de microplegaments i com a conseqüència compactació de la molècula de DNA. Tanmateix en el cas del complex **28** la modificació del DNA és més significativa i també s'observa certa agregació de diferents molècules de DNA (Figura 5. 19).

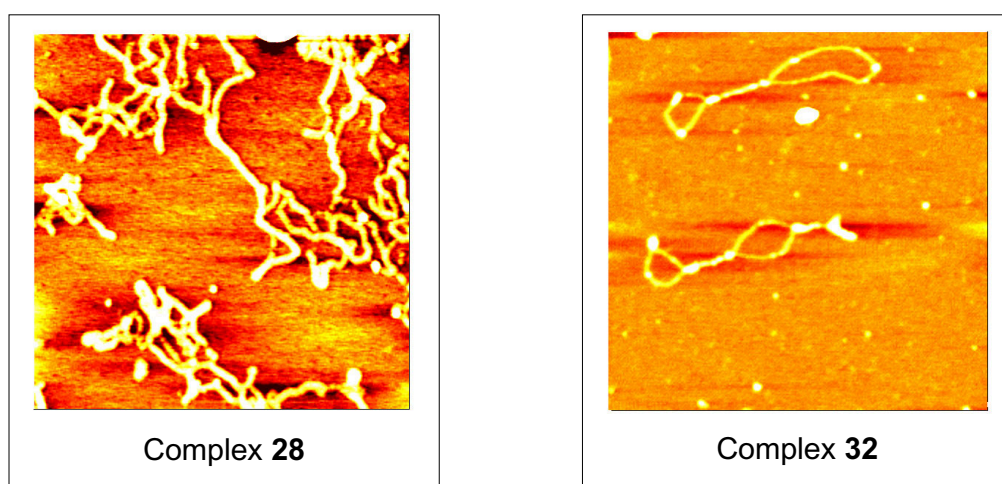


Figura 5. 19. Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 incubat amb el complex **28** (esquerra) i el complex **32** (dreta).

En la Figura 5. 20 es mostren les imatges corresponents al DNA pBR322 incubat amb els complexos **29** i **33**. En ambdós casos s'observa una modificació en l'estructura del DNA mitjançant la formació de nòduls i microplegaments. Per al complex **29** els microplegaments observats arriben a formar angles propers a 90° i també s'observa agregació de diferents molècules de DNA.

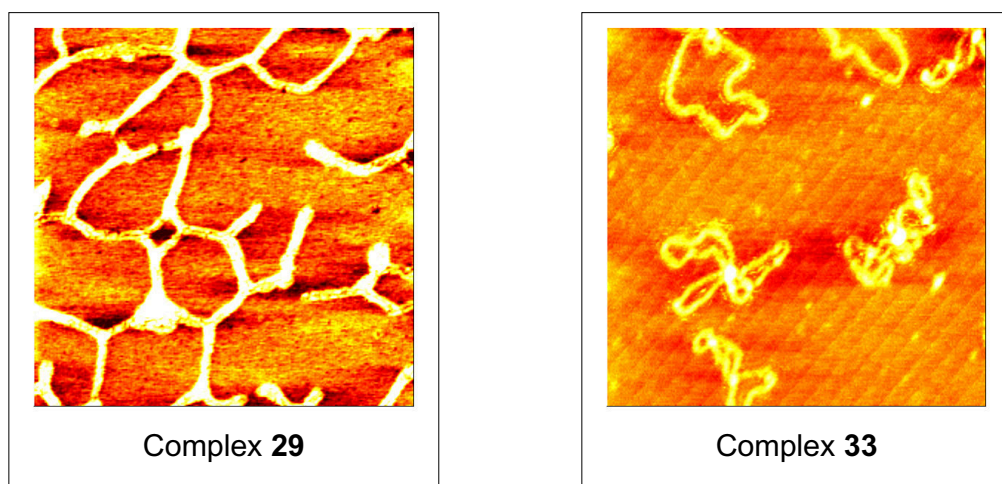


Figura 5. 20. Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 incubat amb el complex **29** (esquerra) i el complex **33** (dreta).

Tal i com passava amb les tècniques de dicroïsmo circular i electroforesi en gel d'agarosa, en general s'observen diferències força significatives entre els complexos amb lligands saturats i insaturats. Els complexos **28** i **29** provoquen canvis més dràstics en l'estructura del DNA.

5.4.2.3. Complexos amb lligands monocíclics

Les imatges següents corresponen al DNA pBR322 incubat amb els complexos **43**, **44a** i **44b** (Figura 5. 21). En totes les imatges s'observa la formació de microplegaments i nòduls que provoquen la compactació de la molècula de DNA. Ara bé per al complex **43** també s'aprecia agregació de diferents molècules de DNA.

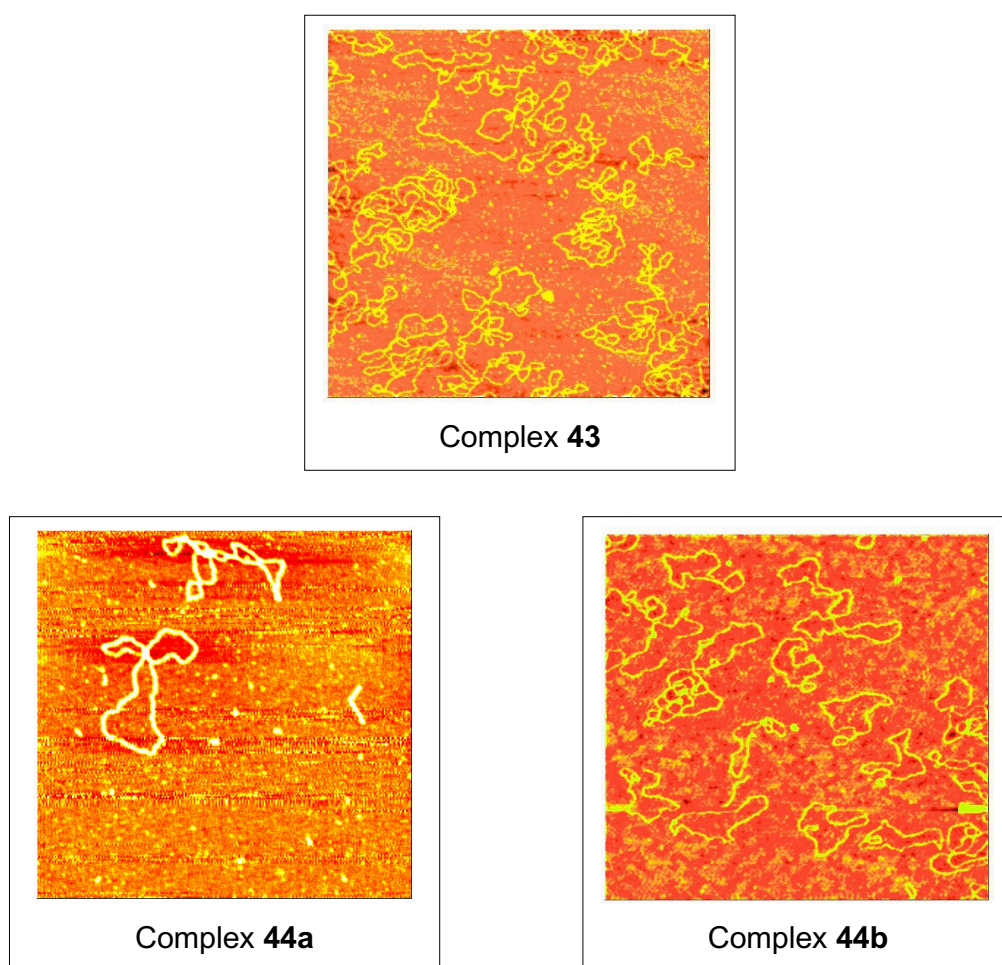


Figura 5. 21. Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 incubat amb el complex **43** (dalt), el complex **44a** (esquerra) i **44b** (dreta).

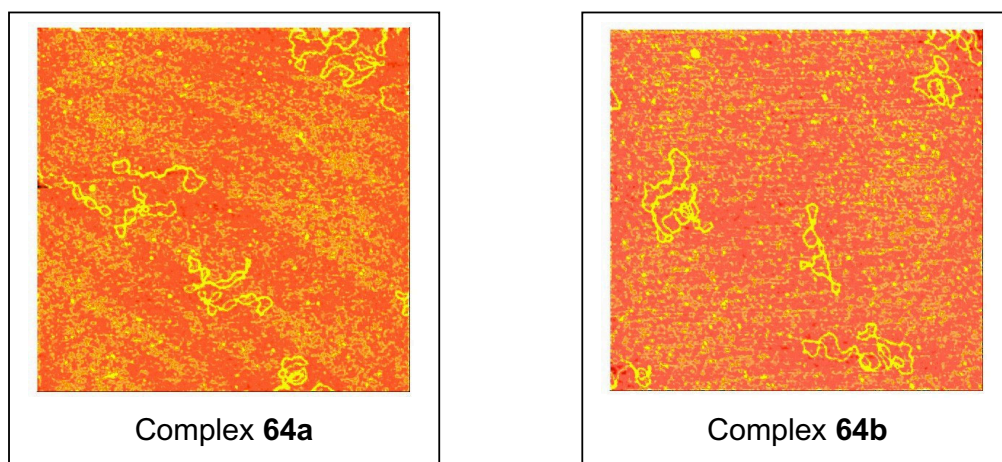


Figura 5. 22. *Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 incubat amb el complex 64a (esquerra) i el complex 64b (dreta).*

Les imatges obtingudes per als diastereòmers **64** i **65** es mostren en la Figura 5. 22 i Figura 5. 23. En tots els casos s'observen canvis en l'estructura del DNA similars als provocats pel cisplatí. No s'aprecien diferències significatives entre diastereòmers, el que sí que sembla és que els complexos **65a** i **65b** són capaços de produir un major compactament de la molècula de DNA.

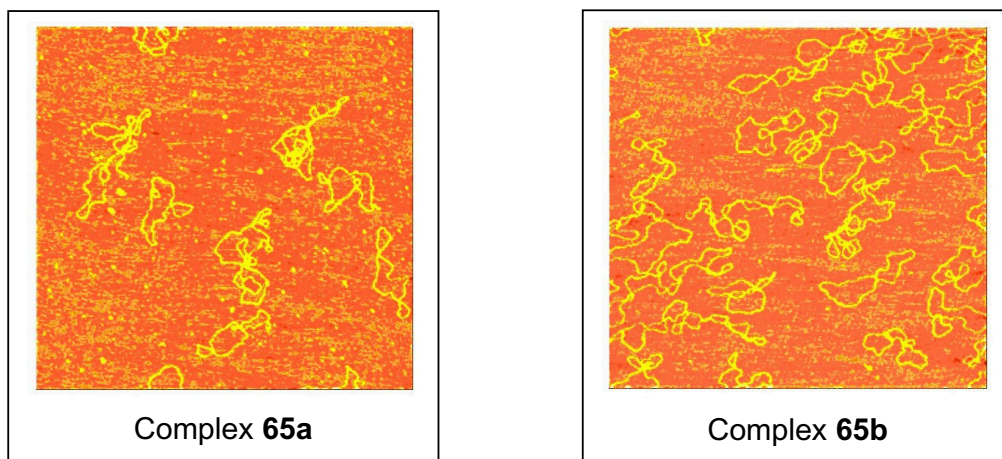


Figura 5. 23. *Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 incubat amb el complex 65a (esquerra) i el complex 65b (dreta).*

Com en els casos anteriors els complexos **71** i **74** també són capaços de modificar l'estructura del DNA pBR322 de forma similar al cisplatí, és a dir, mitjançant microplegaments i nòduls que provoquen la compactació de la molècula de DNA. No s'observen diferències significatives entre un compost i l'altre (Figura 5. 24).

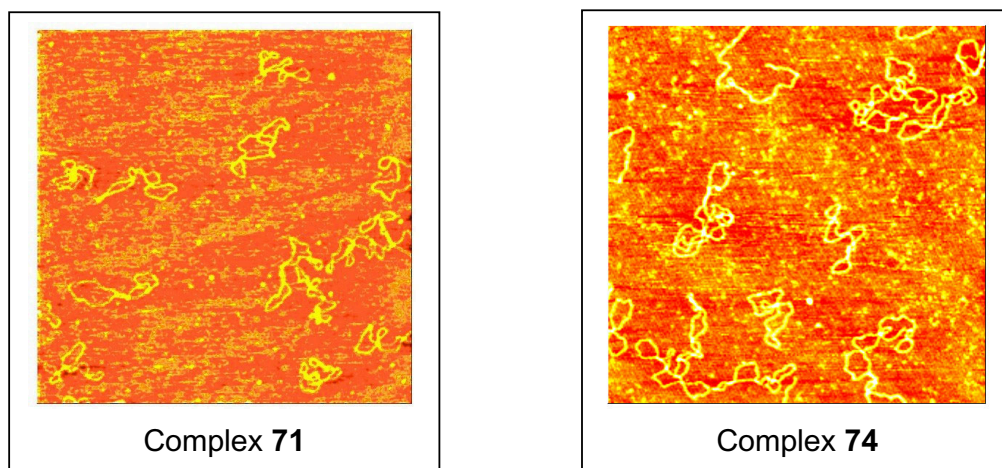


Figura 5. 24. Imatges de TMAFM corresponents al DNA pBR322 incubat amb el complex **71** (esquerra) i el complex **74** (dreta).

5.4.2.4. Recapitulat

La tècnica de microscòpia de forces atòmiques permet visualitzar imatges de DNA. S'ha emprat un DNA plasmídic i s'ha incubat amb els diferents complexos que es volien estudiar.

En funció de les imatges obtingudes es pot dir que el compost **5** interacciona amb el DNA modificant-ne la seva estructura i que els canvis produïts pel complex **6**, però no són tan significatius.

La resta de complexos són capaços d'interaccionar i modificar l'estructura del DNA. Ho fan però, de forma diversa en funció de les seves característiques estructurals. En general els complexos amb lligands que posseeixen un doble enllaç provoquen canvis més significatius en el DNA, així com una major agregació de diferents molècules de DNA.

5.5. Resum del capítol

Amb els complexos de platí obtinguts s'ha estudiat de forma qualitativa la seva interacció amb el DNA mitjançant diferents tècniques. El dicroïsme circular ha permès l'estudi dels canvis produïts en l'estructura secundària del DNA. Les modificacions produïdes en l'estructura terciària del DNA s'han vist mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. Finalment s'han visualitzat les imatges amb al tècnica de microscòpia de forces atòmiques.

En general s'ha vist que tots els complexos, en major o menor mesura, són capaços de modificar l'estructura del DNA. S'han establert diferents relacions en funció de les característiques estructurals dels lligands no làbils dels complexos.