

Tesi doctoral presentada per En/Na

Berta ALGUERÓ CAMA

amb el títol

**"Anàlegs d'oligonucleòtids que incorporen grups
tioèter i/o imidazole: reacció amb transplatí i
entrecreuament amb la cadena complementària "**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

QUÍMICA

Barcelona, 13 de gener de 2006.

Facultat de Química
Departament de Química Orgànica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



2 ESTUDIS DE COMPLEXACIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS MODIFICATS AMB TRANSPLATÍ

2.1 INTRODUCCIÓ

Com s'ha comentat a la introducció, a partir del descobriment del cisplatí per Rosenberg l'any 1965, gran nombre de complexos de platí(II) han estat i estan essent estudiats com a possibles agents per a combatre diferents tipus de càncers. L'objectiu d'aquests treballs és ampliar l'espectre d'activitat i alhora disminuir els efectes secundaris i els possibles mecanismes de resistència d'aquests complexos. Un cop dins la cèl·lula, el cisplatí activat pot reaccionar amb molts components biològics: àcids nucleics, proteïnes, membranes fosfolipídiques, etc. Des de fa molt temps es considera el DNA com la molècula diana responsable de l'activitat del cisplatí, però també és important la possible participació d'altres biomolècules, principalment pèptids i proteïnes, tant en el mecanisme d'acció com en els efectes secundaris del fàrmac.

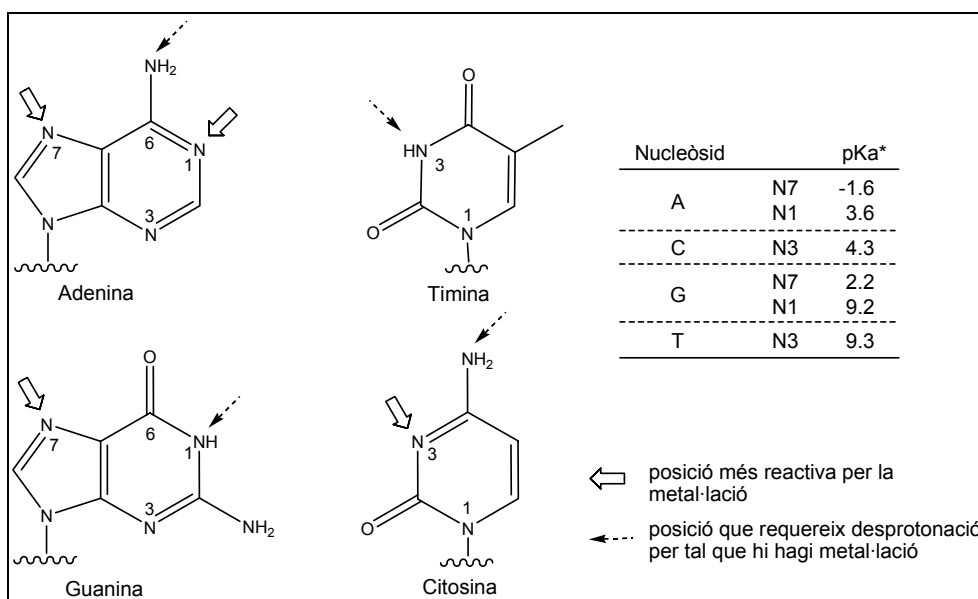


Figura 2.1. Posicions més reactives de les nucleobases front a la metal·lació. * Els valors de pKa inferiors a 7 corresponen a l'equilibri $BH^+ = B + H^+$, i els superiors a 7 a l'equilibri $BH = B^- + H^+$.

Diferents grups d'investigació estan intentant avaluar les preferències dels compostos de platí(II) pels diferents lligands presents tant en les proteïnes com en el DNA, per tal d'elucidar en últim terme el mecanisme d'acció de l'anticancerígen cisplatí i poder dissenyar racionalment nous fàrmacs més actius amb menys efectes secundaris.¹ En el cas del DNA, la unió dels compostos de platí(II) es produeix als àtoms de nitrogen de les nucleobases. De tots ells, els principals punts de coordinació són el *N7* de la guanina, *N7* i *N1* de l'adenina i el *N3* de la citosina, seguint l'ordre de preferència: *N7G*>*N7A*>*N1A*>*N3C*.² D'altra banda, els nitrògens *N1* de la guanina i *N3* de la timina serien candidats a la coordinació si estiguessin desprotonats, la qual cosa té lloc a pH ~ 9-10 (veure Figura 2.1). A la resta de posicions no s'ha observat coordinació del metall a pH fisiològic, justificant-se en el cas dels nitrògens *N3* púrics per motius d'impediment estèric (estan situats al solc petit i són menys accessibles).³ Tot i així, s'han descrit alguns casos on el *N3* de la A pot metal·lar-se excepcionalment.⁴

L'ió metàl·lic Pt^{2+} és un àcid de Lewis de tipus tou,⁵ de manera que presenta gran afinitat per lligands també tous, com són els tiolats i tioèters, grups funcionals presents en les cadenes laterals dels aminoàcids cisteïna i metionina, respectivament. La unió Pt-sofre està molt afavorida cinèticament i en el cas dels tiolats aquesta unió és irreversible.⁶ En canvi, la unió Pt-sofre d'un grup tioèter és més reactiva i pot evolucionar amb migració de l'àtom de platí cap a una posició nitrogenada, com per exemple els nitrògens de l'anell d'imidazole del residu d'histidina, per donar una unió més estable termodinàmicament.⁷ Per tant, els complexos de platí(II) poden interaccionar amb pèptids i proteïnes, i coordinar-se a residus aminoacídics com la cisteïna (irreversible), la metionina o la histidina (veure Figura 2.2).

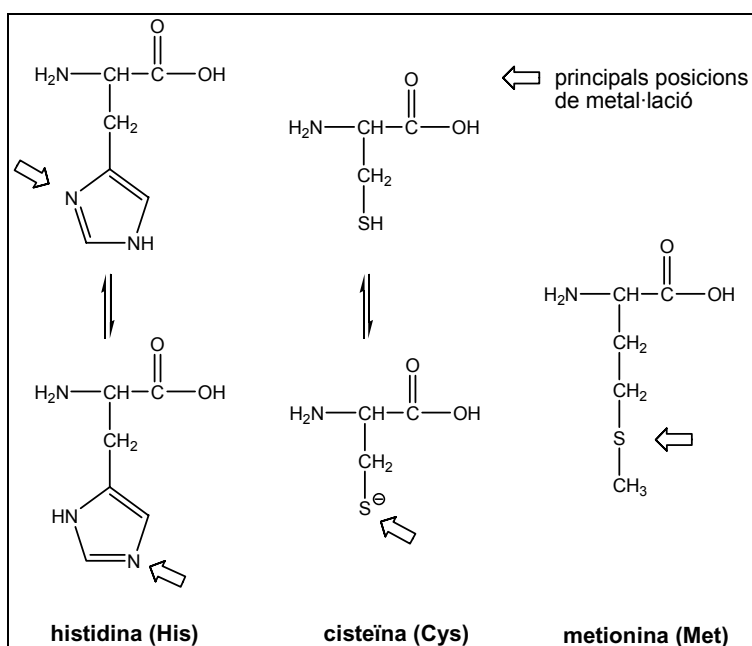


Figura 2.2. Posicions més reactives dels aminoàcids histidina, cisteïna i metionina front a la metal·lació.

S'han dut a terme molts estudis dirigits a elucidar com reaccionen els compostos de platí(II) amb els components dels pèptids o dels àcids nucleics.^{6,7} També s'ha estudiat la reactivitat front a nucleòsids modificats amb determinats grups funcionals presents en pèptids,⁸ però hi ha molt poca informació disponible sobre l'evolució de les reaccions d'aquests complexos metàl·lics amb els dos tipus de biomolècules simultàniament. En aquest sentit, en el nostre grup de treball s'han emprat diferents híbrids pèptid-oligonucleòtid per tal d'estudiar les seves reaccions amb diferents complexos de platí(II).⁹ El fet de treballar amb híbrids pèptid-oligonucleòtid permet introduir, en una mateixa molècula, diferents grups funcionals amb capacitat per a coordinar-se a l'àtom metàl·lic, de manera que es poden extreure dades sobre reactivitat. A la Figura 2.3 i Figura 2.4 es mostren, respectivament, les estructures dels complexos de platí(II) i d'alguns dels híbrids emprats en aquests estudis. El $[\text{PtCl}(\text{dien})]\text{Cl}$ (dien: 1,5-diamino-3-azapentà) presenta una única posició reactiva i ha estat molt utilitzat per a l'estudi de la preferència del platí(II) per a diferents lligands (aminoàcids, pèptids, nucleòtids, etc.). Els adductes monofuncionals que es formen permeten predir els possibles adductes que es formarien en una primera etapa de les reaccions amb cisplatí o transplatí. Pel que fa al $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$, s'ha emprat àmpliament com a model del cisplatí. Aquest compost, amb certa activitat clínica, forma quelats molt estables d'estructura similar als que forma el cisplatí. L'estabilitat d'aquests quelats és el principal motiu pel qual es justifica el seu ús en estudis de complexació, sobretot en aquells casos en què es fa reaccionar amb lligands que continguin àtoms donadors de sofre (metionina o cisteïna), els quals provoquen la labilització i pèrdua del lligand ammina en disposició *trans* respecte a ells quan es coordinen al cisplatí. Per tant, els estudis de complexació amb aquest compost model són una simplificació respecte al fàrmac real, el cisplatí.

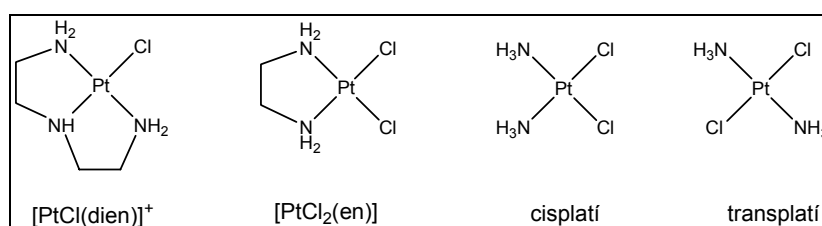


Figura 2.3. Estructura dels complexos model $[\text{PtCl}(\text{dien})]\text{Cl}$ i $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$, de l'anticancerigen cisplatí i del transplatí.

El treball realitzat amb $[\text{PtCl}(\text{dien})]\text{Cl}$ ha permès constatar la gran reactivitat del tioèter de la metionina per a ser coordinat pel metall. Ara bé, després d'aquesta reacció, s'observa que el metall tendeix a migrar a una posició nitrogenada, perquè s'assoleix una major estabilitat termodinàmica en el complex. S'ha detectat una major reactivitat de la guanina respecte a histidina, de manera que la migració té lloc preferentment al *N7* de la guanina (veure un esquema dels resultats a la Figura 2.5).

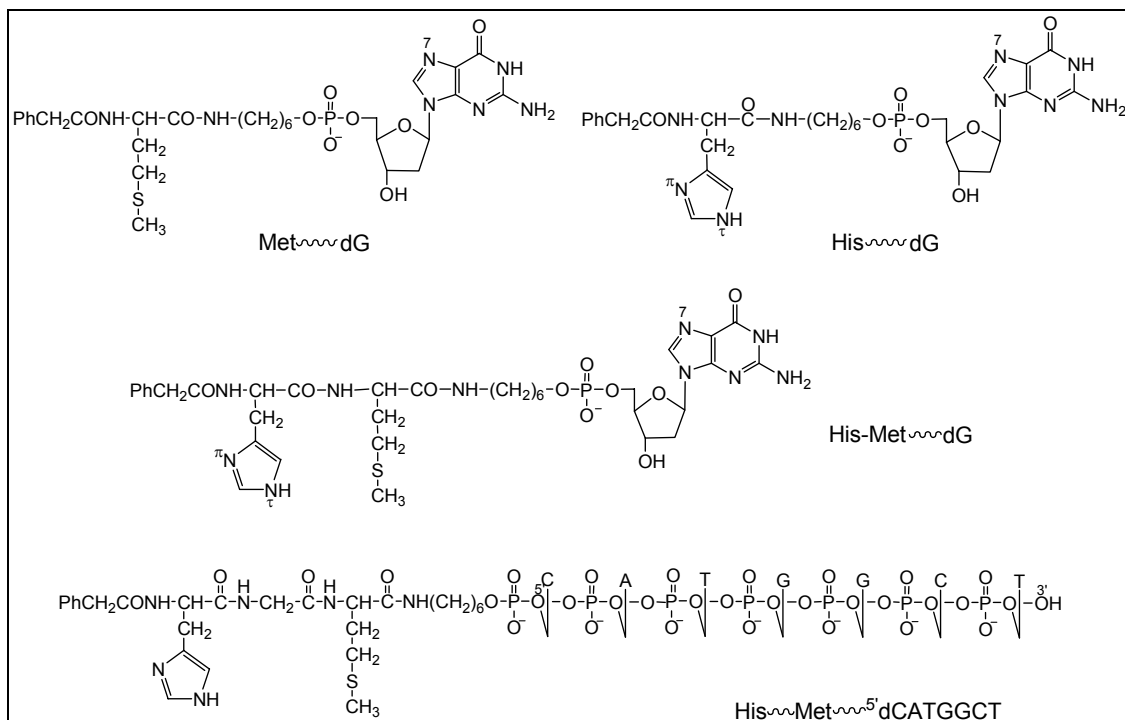


Figura 2.4. Estructura d'alguns dels híbrids pèptid-oligonucleòtid emprats per als estudis de complexació.

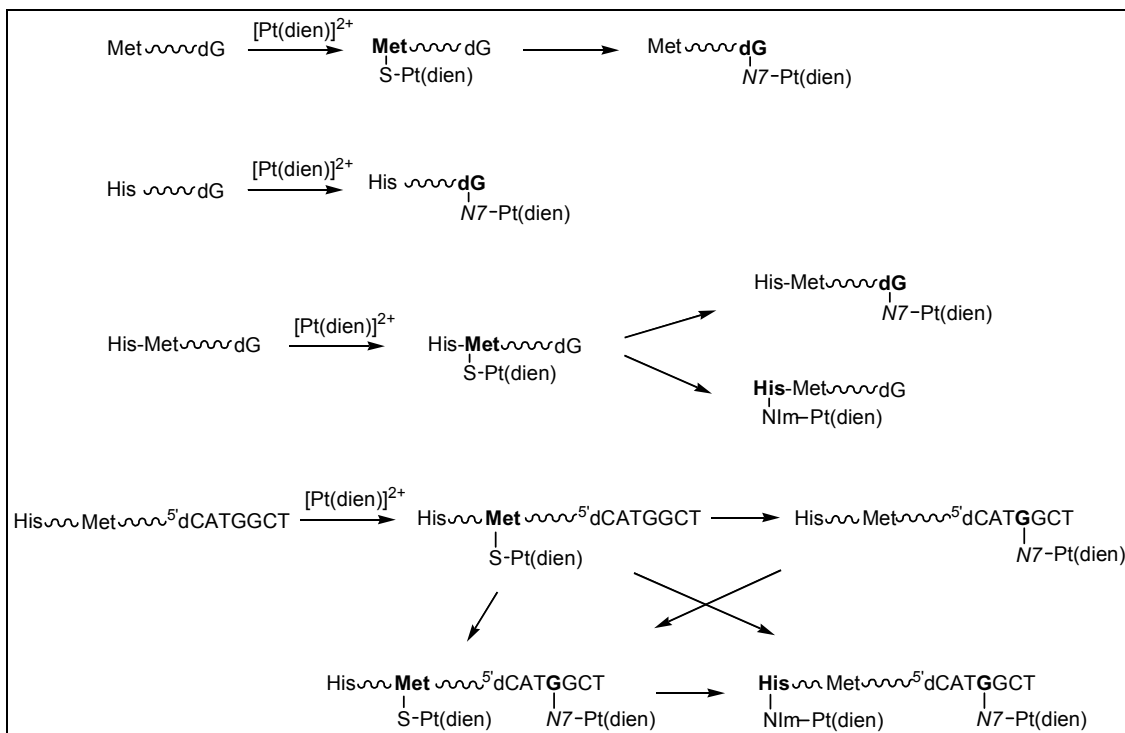


Figura 2.5. Esquema dels resultats de complexació de [PtCl(dien)]Cl amb híbrids pèptid-oligonucleòtid.

Aquests resultats, totalment en concordança amb els coneixements que es tenen de la reactivitat dels complexos de platí(II), fan preveure que en els oligonucleòtids que continguin el grup tioèter (X^S) l'evolució de les reaccions de platinació estarà clarament marcada per la presència d'aquest grup funcional.

D'altra banda, és interessant ressaltar l'estudi comparatiu realitzat amb l'híbrid de talla més gran, en presència de cisplatí i de l'isòmer inactiu transplatí. La reacció amb cisplatí dona lloc inicialment i majoritària a un adducte monofuncional on el platí es coordina al tioèter de la metionina, que evoluciona formant un adducte bifuncional amb el metall coordinat al sofre de la metionina i a una posició nitrogenada (de la histidina veïna o d'una nucleobase). Amb el pas del temps, el lligand ammina en *trans* a la metionina es perd i és substituït per un altre lligand, donant lloc majoritàriament a adductes de tipus tricoordinat, on el platí es coordina a la histidina, a la metionina i a una de les guanines, la de l'extrem 5' preferentment (Figura 2.6). El més destacable d'aquest experiment és el fet que l'adducte bifuncional corresponent a la coordinació a les dues guanines consecutives, que es considera la lesió responsable de l'activitat antitumoral del cisplatí, només es forma en un ~ 1%. Aquest resultat posa de manifest la dificultat del cisplatí, un cop administrat *in vivo*, d'arribar a la diana terapèutica (el DNA) per formar l'adducte bifuncional intracadena amb dues G consecutives. Degut a l'estabilitat dels adductes trifuncionals obtinguts, és de suposar que la formació d'entrecreuaments entre DNA i proteïnes pot tenir un paper molt important en el mecanisme d'acció del cisplatí, o si més no en els efectes secundaris del fàrmac.

D'altra banda, el complex transplatí, en presència del mateix híbrid pèptid-oligonucleòtid (Figura 2.6), dona lloc a uns adductes totalment diferents. En aquest cas, en el medi de reacció es formen ràpidament adductes bifuncionals on el platí es coordina a la metionina i a una guanina (preferentment la G de l'extrem 5'), sense detectar-se adductes monofuncionals. Cal pensar que hi ha una primera coordinació del transplatí al tioèter de la metionina però que per efecte *trans* l'enllaç al clorur està molt labilitzat i ràpidament l'adducte monofuncional evoluciona cap a un adducte bifuncional. Aquests productes, cinèticament afavorits, evolucionen donant lloc a uns nous adductes termodinàmicament més estables, on l'àtom metàl·lic es coordina a la histidina i a una de les dues G del fragment oligonucleotídic. D'altra banda, en presència d'una cadena complementària al fragment oligonucleotídic de l'híbrid, s'estableix un entrecreuament intercadena, on el platí es coordina a l'anell d'imidazole de la histidina i a la G de l'extrem 3' de la cadena complementària. És gràcies a aquest precedent que es va plantejar, tal i com s'ha comentat a la Introducció de la Memòria, la modificació de cadenes oligonucleotídiques introduint grups funcionals que mimetitzen les cadenes laterals dels residus d'histidina i de metionina, per tal de trobar una metodologia que permeti la formació d'entrecreuaments entre una cadena antisentit i la seva seqüència diana. La presència del grup tioèter fa que la reacció de complexació sigui molt ràpida i que el platí es dirigeixi inicialment cap al sofre, pràcticament sense competició per part dels altres lligands. Això és molt important, ja que pot permetre platinar selectivament una posició en presència d'altres grups funcionals afins al platí(II), és a

dir, platinar cadenes oligonucleotídiques sense restricció de seqüència. L'accessibilitat de sintons o derivats nucleosídics que incorporen grups tioèter o imidazole (veure capítol 1) permet efectuar estudis de platinació amb aquests grups funcionals en diferents posicions de la cadena oligonucleotídica, i no només en els extrems, com en el cas dels híbrids pèptid-oligonucleòtid.

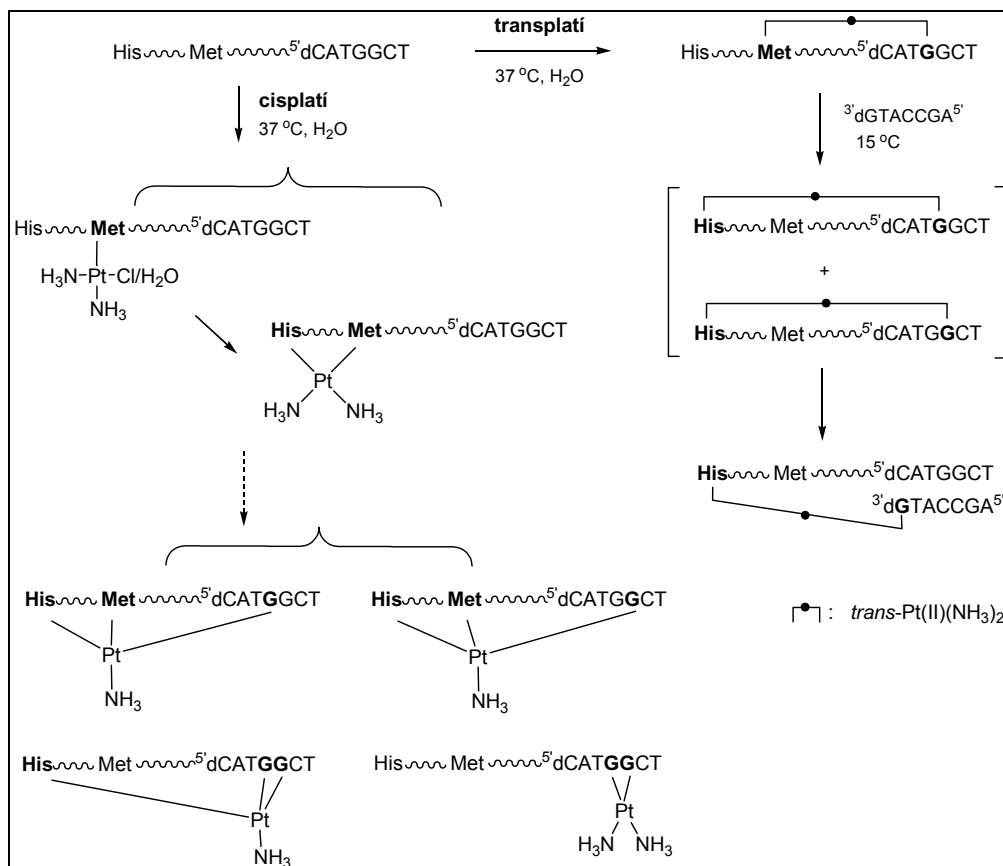


Figura 2.6. Diferent reactivitat de cisplatí i transplatí amb l'híbrid pèptid-oligonucleòtid PhacHisGlyMet-espaiador-^{5'}dCATGGCT.

En aquest punt de la Tesi, es planteja l'estudi de la reactivitat del transplatí en presència d'oligonucleòtids modificats amb X^S i/o X^L . Es parteix treballant amb cadenes model de seqüència senzilla, amb la idea que les conclusions d'aquests experiments permetran dissenyar oligonucleòtids més complexes, combinant els nous sintons amb les nucleobases naturals en diferents posicions.

Així, doncs, el principal objectiu d'aquesta part del treball és esbrinar quins són els complexos que es formen preferentment. D'una banda, es tracta d'elucidar la constitució de l'adducte intracadena que es forma (grups funcionals implicats en la coordinació, distància entre les nucleobases que els contenen). D'altra, si és possible, estudiar quin és el procés que condueix a la formació d'un determinat quelat. Cal veure si els resultats obtinguts amb els híbrids pèptid-

oligonucleòtid es correlacionen amb els estudis de complexació de transplatí amb els oligonucleòtids modificats amb X^S i X^I . Entre d'altres coses, és important veure si el tioèter dirigeix la reacció de platinació, tal i com fa la metionina, i després avaluar l'estabilitat d'aquests nous adductes i la possible migració del platí cap a d'altres nucleobases de la molècula. Pel que fa a l'anell d'imidazole, és interessant determinar el seu paper en la formació dels adductes, i en aquells casos en què l'oligonucleòtid contingui les dues nucleobases modificades, veure si el platí forma adductes amb X^S i X^I , i quina és la seva estabilitat. En el cas de la reacció dels híbrids amb $[PtCl_2(en)]$, s'ha observat que es forma el quelat amb coordinació del platí al tioèter i a l'imidazole, i que pot evolucionar a d'altres adductes.^{9b}

Per tant, en aquest capítol es descriuen els resultats obtinguts en els estudis de complexació amb oligonucleòtids model que contenen X^S , X^I i els dos anàlegs nucleosídics a la vegada.

2.2 EL TRANSPLATÍ EN SOLUCIÓ

El transplatí és un complex molt insoluble en aigua (8 vegades menys soluble que el cisplatí) i la substitució dels lligands cloro per molècules d'aigua està menys afavorida. A la següent figura s'il·lustren les corresponents reaccions d'aquatització, amb el valor de les constants d'equilibri associades:

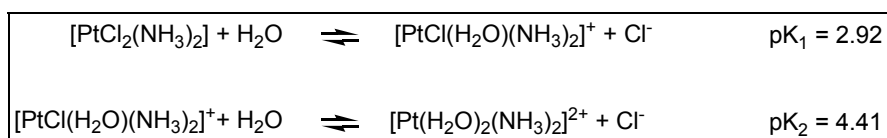


Figura 2.7. Reaccions de substitució del lligand cloro del transplatí, amb el corresponent valor de pK a 25 °C en presència de $NaClO_4$ 0.1 M.¹⁰

Tant l'espècie monoaquamonocloro com la diaqua desprotonen en solució aquosa, de manera que el lligand aqua passa a la forma hidroxó:

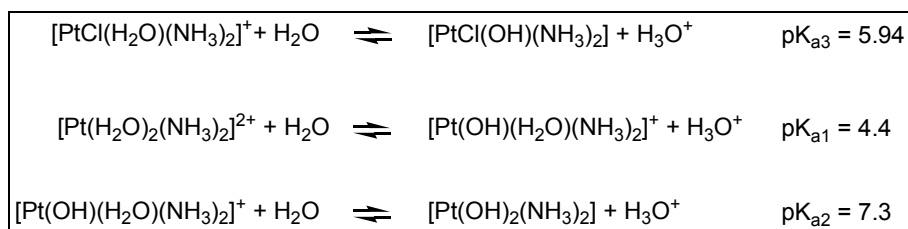


Figura 2.8. Reaccions d'hidròlisi de les espècies de platí aquatitzades, amb el corresponent valor de pK_a a 25 °C. pK_{a1} i pK_{a2} són valors consens¹¹ a partir de resultats obtinguts per mètodes diferents, mentre que pK_{a3} està determinat a 0.1 M de $NaClO_4$ i a una concentració 5 mM de transplatí.¹²

Així, doncs, el transplatí en solució pot presentar diferents formes, de reactivitat diferent. En funció del pH, l'equilibri es desplaçarà cap a una banda o cap a una altra, però en general queda clar que a pH lleugerament àcid ja estan més afavorides les formes hidroxò que les aqua. També és interessant tenir en compte la concentració d'ions clorur en el medi, ja que també afecta a la proporció de les diferents formes complexades. Les fraccions molars de les espècies de *trans*-Pt(NH₃)₂, a pH 7.4 i a la concentració d'ions clorur present tant en el plasma com en el nucli cel·lular (104 mM i 4 mM, respectivament), s'indiquen a la Taula 2.1.¹¹

espècie	[Cl ⁻] 104 mM	[Cl ⁻] 4 mM
[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	0.68	0.05
[PtCl(OH)(NH ₃) ₂]	0.31	0.60
[PtCl(H ₂ O)(NH ₃) ₂] ⁺	0.008	0.02
[Pt(H ₂ O) ₂ (NH ₃) ₂] ²⁺	3x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁴
[Pt(OH)(H ₂ O)(NH ₃) ₂] ⁺	0.003	0.15
[Pt(OH) ₂ (NH ₃) ₂]	0.004	0.19

Taula 2.1. Fracció molar de les espècies de *trans*-Pt(NH₃)₂ a pH 7.4 a dues concentracions d'ions clorur.

De la taula se'n deriva que, en disminuir la concentració de clorurs en el medi, predominen les espècies aquatitzades del transplatí, alhora que a pH fisiològic els lligands aqua es troben majoritàriament desprotonats. A la Figura 2.9 s'il·lustra quines espècies es troben en equilibri a una concentració de clorurs 4 mM, en funció del pH.¹¹

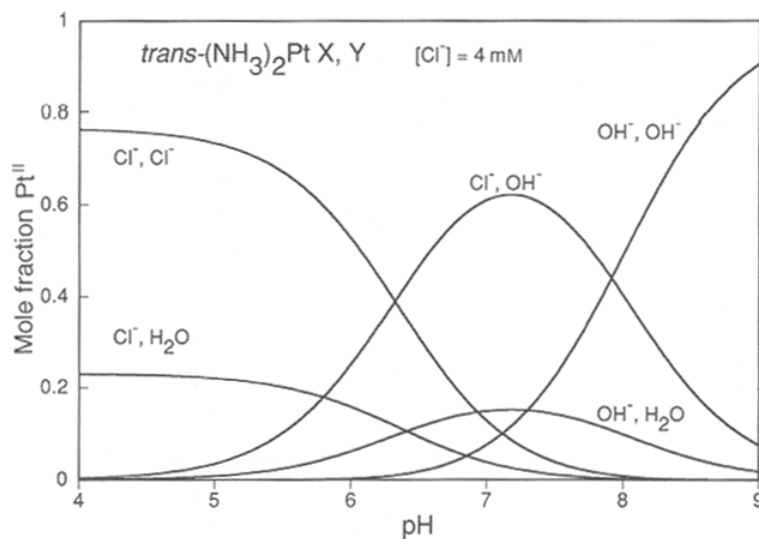


Figura 2.9. Representació de la fracció molar de les espècies de *trans*-Pt(NH₃)₂ en funció del pH, a una concentració de clorurs 4 mM. La corba del complex diaminodiaqua es troba prop de la línia de base i no es veu.¹¹

Aquestes dades incideixen, per tant, en la reactivitat de les diferents espècies de *trans*-Pt(NH₃)₂ front a les nucleobases. L'hidròxid és molt mal grup sortint, de manera que és virtualment no reactiu.¹³ L'ordre de reactivitat, doncs, està relacionat amb la capacitat del lligand de ser un bon grup sortint, i és H₂O > Cl⁻ >>> OH⁻. Per tant, les espècies actives del transplatí que reaccionen més de pressa amb les biomolècules són les que contenen un lligand aqua, i justament són les presents en menor proporció en les nostres condicions de treball (veure més endavant).

2.3 ESTUDIS DE PLATINACIÓ AMB OLIGONUCLEÒTIDS QUE INCORPOREN X^S

La majoria d'oligonucleòtids emprats en aquests estudis tenen una seqüència del tipus ⁵dX^SNNNN, on N és un mateix nucleòtid per a una cadena determinada (T, C, A o G). Es va voler avaluar la reactivitat de X^S en presència de les diferents nucleobases naturals, així com determinar si hi ha una mida òptima en la formació dels possibles adductes bifuncionals i quina és la seva estabilitat. Prèviament als estudis amb transplatí, es realitzà un assaig de complexació emprant l'oligonucleòtid ⁵dX^STTT i el compost [PtCl(dien)]Cl.

El nucleòsid X^S presenta dues possibles posicions candidates a metal·lar-se, l'àtom de sofre del grup tioèter i el N3 de la nucleobase (Figura 2.10). Ja s'ha exposat la gran afinitat del platí(II) per coordinar el sofre, pel fet que aquest metall és un àcid tou i té preferència per lligands tous. Es podria pensar en la formació d'adductes on el platí s'unís al sofre i al N3 simultàniament, però tot sembla indicar que el nombre de metilens del braç i l'estereoquímica del complex no són compatibles (complex plano-quadrat, on el metall s'uneix als dos grups amb disposició *trans*). A més a més, el pH al qual es realitzen aquests estudis de complexació és lleugerament àcid, de manera que el N3 presenta una menor nucleofília que a pH neutre o bàsic (pK_a ~ 4.3 N3 de la citosina).

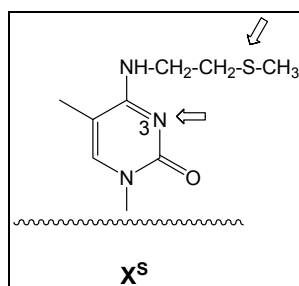


Figura 2.10. Punts reactius del derivat de 5-metilcitosina modificat en la posició 4 amb un penjoll de tioèter (X^S).

2.3.1 Reacció entre [PtCl(dien)]Cl i $5'dX^S$ TTT

Com ja s'ha comentat, el complex monofuncional [PtCl(dien)]Cl ha estat àmpliament utilitzat com a model de l'adducte que es forma en la primera etapa d'unió de compostos antitumorals de platí al DNA, tot i que aquest compost no presenta activitat com a fàrmac.¹⁴ També, pel fet que només té un punt reactiu, s'ha utilitzat com a model per a estudiar la preferència del platí(II) per diferents lligands (aminoàcids, nucleòtids, etc.).⁸ En el nostre cas, l'ús d'aquest compost té per finalitat comprovar la capacitat del nucleòtid modificat amb un grup tioèter per a ser coordinat per l'àtom metàl·lic, i veure si es produeix la migració de l'àtom metàl·lic a una altra posició de l'oligonucleòtid.

El tractament de l'oligonucleòtid $5'dX^S$ TTT amb el complex monofuncional de platí [PtCl(dien)]Cl (0.95 eq) es va portar a terme en solució aquosa (0.05 mM) a 37 °C, a pH lleugerament àcid, i es va seguir per HPLC en fase reversa (Figura 2.11). A diferència del comportament típic del grup tioèter en presència d'aquest tipus de compostos, on la platinació és immediata,^{9b} al cap de 1 h només s'havia platinat un 35 % d'oligonucleòtid. Es va forçar la reacció afegint 1.9 eq més de [PtCl(dien)]Cl, i al cap de 4.5 h es va assolir la platinació quantitativa de l'oligonucleòtid. La nova espècie es va caracteritzar com l'adducte amb el grup tioèter del nucleòsid X^S platinat, $5'dX^S$ TTT{S-Pt(dien)}. A la Figura 2.12, es mostra en forma de gràfic la intensitat relativa dels diferents compostos detectats mitjançant HPLC al llarg de la reacció de platinació.

En general, la caracterització dels adductes platinats es realitza mitjançant anàlisi per EM MALDI-TOF del producte purificat per HPLC. També s'extreu informació dels crús resultants de les proves enzimàtiques i d'oxidació (veure apartat 2.3 a la Part Experimental). Mitjançant el tractament amb 3'- i 5'-exonucleases, es detecta el fragment d'oligonucleòtid platinat que no pot ser digerit pels enzims degut a la coordinació de l'àtom metàl·lic a una nucleobase de la cadena, mentre que per tractament amb aigua oxigenada es determina si hi ha un augment de 16 unitats de massa (que indicaria que el sofre del tioèter no intervé en la coordinació). En aquest cas, l'adducte no va ser digerit per tractament amb fosfodiesterasa de melsa de bou (SpPD, 5'-exonucleasa), mentre que sí que ho va ser per tractament amb fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD, 3'-exonucleasa). D'altra banda, per tractament amb aigua oxigenada durant 1 h no es va observar oxidació del grup tioèter a sulfòxid, de manera que es confirmava l'existència de coordinació al sofre de X^S . Cal tenir present que en principi es formen els dos possibles diastereòmers, degut a la coordinació al sofre (té dos parells d'electrons no enllaçants), encara que per HPLC, tant en aquest cas com en la majoria d'adductes on el platí es coordina al sofre, només es detecti un únic pic cromatogràfic.

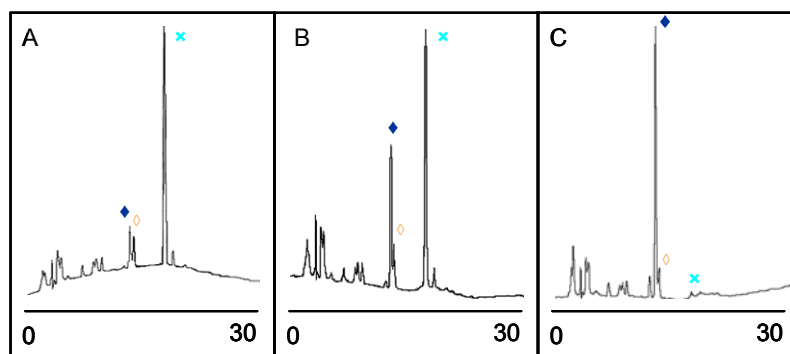


Figura 2.11. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'dX^S TTT$ i $[PtCl(dien)]Cl$ als 30 min (A), 1 h (B) i 4.5 h (C).

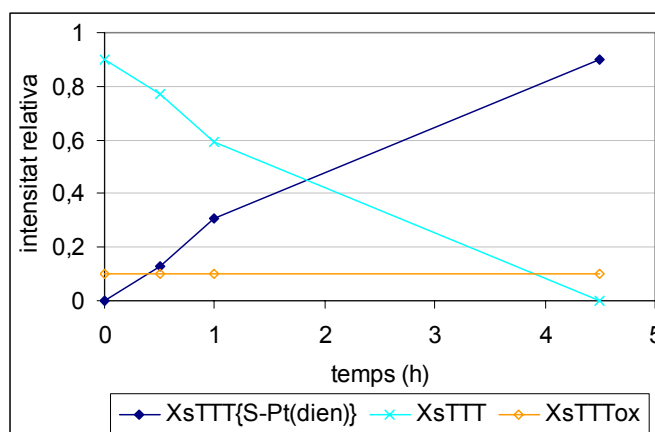


Figura 2.12. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $5'dX^S TTT$ i $[PtCl(dien)]Cl$.

L'oligonucleòtid de partida contenia un 10 % d'oligonucleòtid $5'dX^S TTT$ en forma oxidada, proporció que es va mantenir constant al llarg de la reacció (el platí no es coordina al grup sulfòxid). Deixant evolucionar la reacció al llarg d'una setmana, no es va observar la migració de l'àtom metàl·lic del sofre a cap altre punt de l'oligonucleòtid, ni al N3 del propi X^S ni a cap timina de la seqüència, la qual cosa ja era d'esperar perquè les timines no són especialment reactives i caldria una desprotonació del N3 de la nucleobase per tal que tingués lloc la coordinació.

Així, doncs, la nova nucleobase modificada X^S és apta per a ser coordinada per l'àtom metàl·lic i dóna lloc a adductes platinats que poden ser caracteritzats fent ús de les tècniques desenvolupades en el nostre grup de treball. A partir d'aquests resultats amb el complex monofuncional, es va continuar l'estudi amb el transplatí.

2.3.2 Reacció del transplatí amb 5'dX^STTTT

Per tal de dissoldre el transplatí, s'escalfa una suspensió 10 mM en aigua fins a quasi ebullició durant 10 min, agitant vigorosament, emprant immediatament la solució resultant (veure Figura 2.13). Una altra manera de tenir en forma activada el transplatí és per reacció amb nitrat d'argent (AgNO₃) en dimetilformamida (DMF). Emprant 1 eq de AgNO₃, el lligand cloro reacciona amb la plata per donar lloc al precipitat de clorur d'argent, quedant una posició de coordinació lliure que és ocupada majoritàriament per una molècula de DMF (ligand làbil, com l'aigua). Per reacció amb 2 eq de AgNO₃, s'obté directament la forma doblement labilitzada, amb dues molècules de DMF com a lligands làbils.¹⁵ En solució majoritàriament aquosa, el lligand que es coordina és una molècula d'aigua.

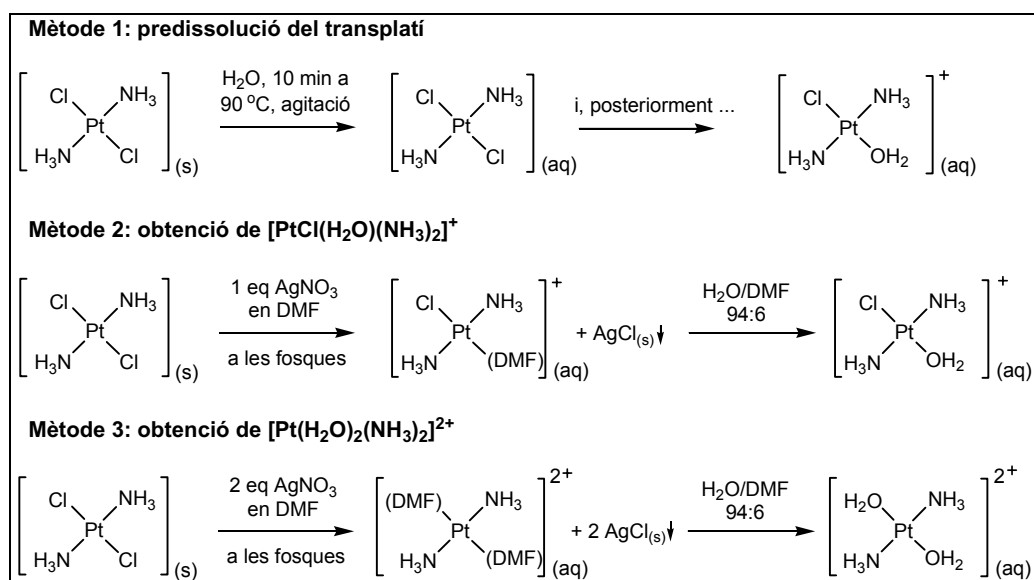


Figura 2.13. Diferents maneres d'activar el transplatí.

Per tal de determinar si els resultats de la reacció de complexació varien en funció de com s'activa el transplatí al medi de reacció, en aquest primer assaig es va considerar oportú emprar els tres mètodes mencionats (Figura 2.13). Quan s'utilitzà directament la forma [PtCl₂(NH₃)₂] dissolta, es va afegir un petit excés de compost platinat (3 eq), donada la baixa solubilitat del transplatí en aigua, i també es va addicionar el mateix percentatge de DMF que en els altres casos (aproximadament un 6 %, valor que es considera que no afecta a la formació dels adductes platinats en medi aquós).¹⁵

Centrant-nos en la reacció amb el transplatí predissolt per escalfament (mètode 1), es va portar a terme en solució aquosa (0.05 mM) a 37 °C, emprant 3 eq de transplatí. Es va seguir l'evolució de la reacció per HPLC en fase reversa, analitzant alíquotes separades al llarg del temps, a les quals s'afegí una solució saturada de clorur de potassi per tal de capturar els possibles adductes monofuncionals, i es congelaren fins al moment de l'anàlisi (veure Figura

2.14). A les 5 h, tot l'oligonucleòtid de partida ja havia reaccionat ($t_{1/2} \sim 2$ h a 37°C). La reacció es mantingué a 37°C durant 4 dies per a determinar si hi havia algun canvi en la proporció dels adductes formats, observant-se bàsicament cert percentatge de desplatiniació (15 % d'oligonucleòtid de partida).

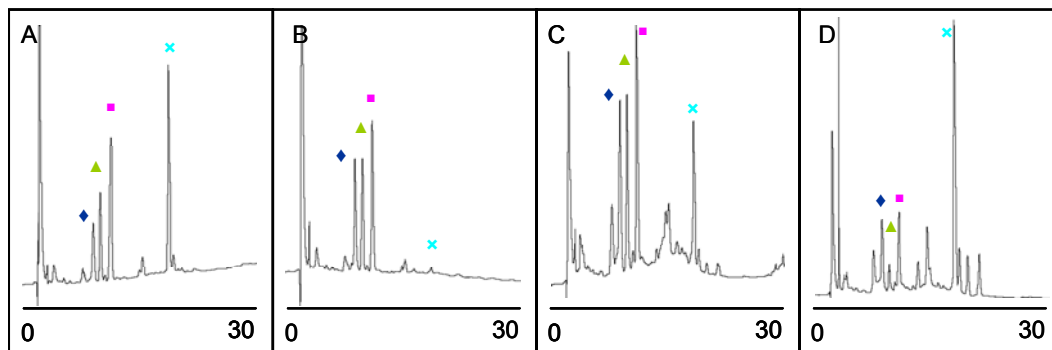


Figura 2.14. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'dX^S TTTT$ i transplatí, activat pel mètode 1, als 30 min (A), 5 h (B) i 4 dies (C). El perfil cromatogràfic D correspon a la reacció efectuada afegint el complex activat en la forma $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$ (mètode 2), al cap de 4 dies.

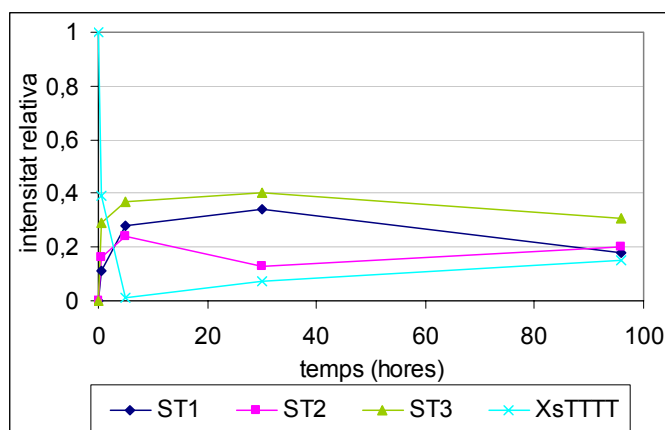


Figura 2.15. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $5'dX^S TTTT$ i transplatí (activació pel mètode 1).

Tal i com s'explica a la part experimental, la reacció emprant transplatí predissolt per escalfament (mètode 1) va ser més neta que quan s'emprà transplatí activat amb $AgNO_3$ (mètodes 2 i 3), però en els tres casos es formaren tres adductes que correspongueren a la coordinació del platí al sofre de la nucleobase modificada (X^S) i a una de les timines de la seqüència: $5'dX^S TTTT-Pt(NH_3)_2$ (**ST1**), $5'dX^S TTTT-Pt(NH_3)_2$ (**ST2**) i $5'dX^S TTTT-Pt(NH_3)_2$ (**ST3**). Als 30 min, s'obtingueren perfils pràcticament idèntics dels crús de reacció corresponents als mètodes 1 i 2 ($t_{1/2} \sim 2$ h a 37°C). Per al mètode 3, als 30 min es va detectar una relació entre els adductes formats similar a la dels altres dos mètodes, però el percentatge de platinació fou

molt més baix. Donat que els diferents mètodes d'activació i addició del transplatí van proporcionar resultats similars, es va decidir continuar emprant sempre el primer mètode, que consisteix en la predissolució del complex per escalfament, tant per comoditat com perquè s'obtenen crus menys heterogenis (s'eliminen possibles artefactes deguts a la presència de DMF o l'ió Ag^+).

Així, doncs, en cap dels tres casos no es detectà la formació de cap adducte monofuncional (substitució d'un únic lligand cloro), sinó que ràpidament es formaren els adductes bifuncionals. El més probable és que el transplatí en forma aquatitzada (ja sigui amb una o dues molècules d'aigua) primerament coordini el grup tioèter però que, per efecte *trans*, ràpidament es perdi el segon clorur i es doni la coordinació al $\text{N}3$ de la T.

L'efecte *trans*, del qual ja se n'ha parlat en anteriors punts de la Tesi, es defineix com la labilització de la unió a certs lligands per part d'altres lligands en disposició *trans* que es denominen *trans*-directors.¹⁶ Se sap que l'efecte *trans* està controlat cinèticament perquè no sempre condueix a l'isòmer termodinàmicament més estable. El cianur, el monòxid de carboni i l'òxid nítric són els directors *trans* més potents, mentre que l'hidròxid i l'aigua són molt pobres. Els lligands que inclouen un àtom de sofre (com és el tioèter o el tiolat) tenen també un efecte *trans* molt considerable.¹⁷ En general, la timina no és una nucleobase que reaccioni fàcilment amb el transplatí,¹⁸ ja que cal desprotonació del $\text{N}3$ (pKa 9.3), però és segurament gràcies a la coordinació al tioèter que aquesta unió es fa possible. Un exemple d'això és la formació d'adductes platinats amb transplatí per coordinació a un grup fosforotioat i una timina, resultat que no s'obté amb cisplatí (veure en el capítol 3, els resultats de Chu i Orgel).¹⁹ Es coneix algun exemple de platinació al $\text{N}3$ de la T, descrit en el camp dels parells de bases modificats per un metall, on es força la reacció de $\text{trans-}[\text{PtCl}(\text{DMF})(\text{NH}_3)_2]^+$ amb 1 eq de 1-metilimidina desprotonada (en forma de sal de potassi).²⁰ També hi ha exemples en què la timina es fa servir com a grup protector, per a l'obtenció de sintons platinats aptes per a ser introduïts a l'extrem 5' de cadenes oligonucleotídiques (es comenta al capítol 3).²¹

Molt probablement, com a conseqüència del fet que la coordinació s'estableix amb una geometria lineal, no és possible o és minoritària la formació d'un adducte on el platí(II) es coordini al sofre i al $\text{N}3$ de la nucleobase veïna.

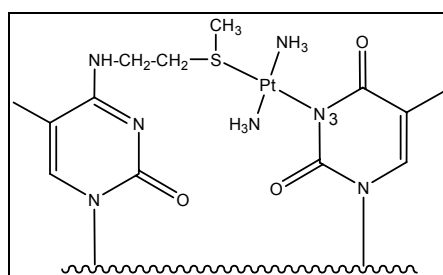


Figura 2.16. Estructura general dels adductes platinats que mostra la coordinació del metall al sofre de X^{S} i al $\text{N}3$ d'una de les timines de la seqüència (prèvia desprotonació).

Dels tres adductes formats, el majoritari va ser aquell en què el platí es coordina al tioèter i a la T de l'extrem 3' (**ST3**) (veure Figura 2.16). No es van observar canvis en les posicions de coordinació al llarg del temps, sinó tan sols un augment de l'oligonucleòtid de partida, degut a la desplatiniació dels adductes ja formats. L'extensió de la desplatiniació va ser més important en els casos en què la mescla de reacció contenia possibles traces de nitrat d'argent. En general, la unió Pt-S està afavorida cinèticament però no és termodinàmicament molt estable, de manera que l'àtom metàl·lic té tendència a migrar a una posició nitrogenada per donar un complex més estable (vegeu, per exemple, la Figura 2.5).^{8b-c,22} En el nostre cas, degut a la poca afinitat del platí per les timines, la migració no estaria afavorida i probablement per aquest motiu amb el temps tan sols té lloc la desplatiniació parcial dels adductes (es trenca la unió Pt-N3 per efecte *trans*, i després la unió Pt-S).

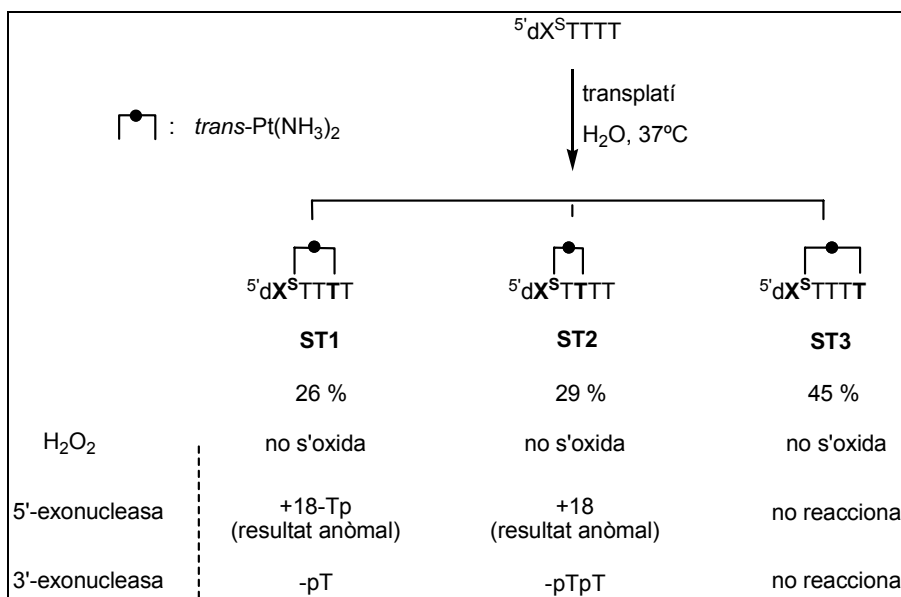


Figura 2.17. Reacció de complexació amb $5'dX^S TTTT$, amb un resum dels resultats dels estudis de caracterització dels adductes majoritaris.

Els tres adductes majoritaris es van aïllar i caracteritzar tal i com es detalla a la part experimental (veure també Figura 2.17). Mitjançant EM MALDI-TOF es va detectar la massa corresponent als adductes oligonucleòtid-*trans*-Pt(NH₃)₂, observant-se la distribució típica del platí, alhora que també es va detectar la pèrdua, típica en els espectres de masses obtinguts amb aquesta tècnica, d'una i dues molècules d'amoníac.²³ També es va observar la massa corresponent a l'oligonucleòtid de partida, la qual cosa indica que aquests adductes no són molt estables i que durant el seu aïllament, així com en allargar-se el temps de reacció, desplatinen.

En la caracterització dels adductes formats, la presència d'oligonucleòtid de partida és un bon patró intern per tal d'avaluar el bon funcionament dels mètodes de caracterització. Per exemple, per tractament amb aigua oxigenada, cap dels adductes es va oxidar, confirmant la coordinació

del platí a l'àtom de sofre de la nucleobase modificada. Ara bé, el patró intern d'oligonucleòtid de partida sí que es va oxidar, demostrant que el tractament havia estat suficientment llarg, i permetent assegurar si havia incrementat la massa de l'adducte 16 unitats o no.

En el tractament amb la 5'-exonucleasa, s'esperava que no pogués ser digerit cap dels adductes. Així va ser per a l'adducte $5'dX^S\text{TTTT-Pt}(\text{NH}_3)_2$ (**ST3**), però en els altres dos casos es va observar el guany parcial de 18 unitats de massa (atribuïble a una hidròlisi d'un enllaç fosfat) i, en el cas de $5'dX^S\text{TTTT-Pt}(\text{NH}_3)_2$ (**ST1**), la posterior pèrdua d'una unitat d'àcid 3'-timidílic timina (Tp). Així, doncs, sembla que en el cas de **ST1** i **ST2** l'enzim va actuar com una endonucleasa, hidrolitzant un dels fosfats del cicle. El fet que, a continuació, en un cas s'eliminés una timina i en l'altre no, permet proposar que l'obertura del cicle té lloc entre les dues primeres timines de la seqüència començant per l'extrem 5' (Figura 2.18). Llegint les especificacions de l'enzim, es va constatar que les preparacions comercials de 5'-exonucleases poden contenir un petit percentatge d'endonucleases (la qual cosa indicaria que els nostres resultats poden ser deguts a la contaminació d'un altre tipus d'enzim). Tot i així, també és cert que les 5'-exonucleases són molt sensibles a l'estructura secundària i a la llargària de la cadena substrat.²⁴ Per tant, seria concebible que en no poder digerir l'oligonucleòtid per l'extrem 5', l'enzim pogués actuar excepcionalment de forma anòmla, com a endonucleasa, degut a l'estructura tridimensional de l'adducte platinat.

En el tractament amb la 3'-exonucleasa s'obtingueren els resultats esperats, de manera que l'enzim va digerir l'adducte fins a la timina que es troba coordinada a l'àtom metàl·lic. En els dos processos de digestió, l'oligonucleòtid desplatinat es va hidrolitzar rapidíssimament i de forma completa.

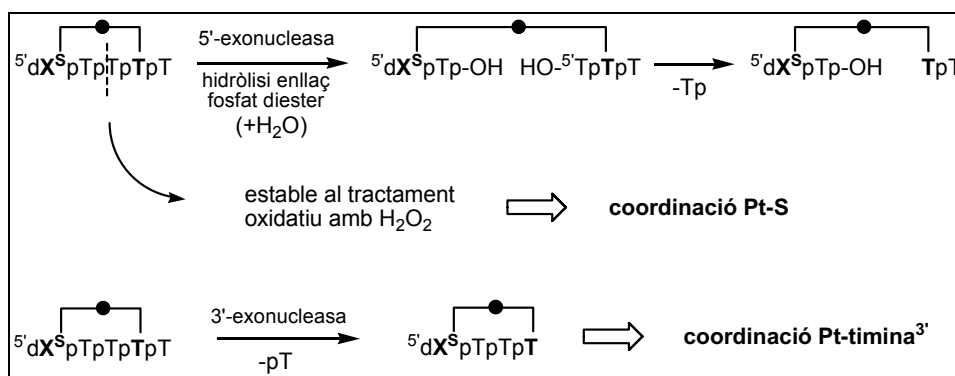


Figura 2.18. Esquema dels resultats obtinguts en la caracterització de l'adducte **ST1**, $5'dX^S\text{TTTT-Pt}(\text{NH}_3)_2$.

2.3.3 Reacció del transplatí amb $5'$ dTTX^STT

La reacció de platinació es va portar a terme en solució aquosa (0.05 mM) a 37 °C, afegint el transplatí predissolt per escalfament a 90 °C. Es van formar tres adductes majoritaris i al cap de 16 h pràcticament tot l'oligonucleòtid inicial s'havia complexat.

Com en el cas anterior, no es va aïllar cap adducte monofuncional a temps curts, de manera que altre cop se suposa que hi ha una coordinació inicial del metall al sofre i ràpidament té lloc per efecte *trans* la formació dels adductes bifuncionals, amb coordinació al N3 d'una timina. La cinètica de complexació fou relativament ràpida ($t_{1/2} \sim 1$ h a 37 °C), no essent molt diferent a la de $5'$ dX^STTTT efectuada en les mateixes condicions ($t_{1/2} \sim 2$ h a 37 °C). Tot i així, el fet que la reacció sigui més ràpida quan la modificació es troba enmig de la seqüència està en concordança amb els resultats publicats per Kjellström i Elmroth, que han observat aquest comportament tant amb fosforotioats com amb l'ús de nucleobases modificades amb una tiona.²⁵ A temps llargs, s'observà una clara preferència per a la coordinació a les dues timines de l'extrem 5', $5'$ dTTX^STT-Pt(NH₃)₂ (**ST4**) i $5'$ dTTX^STT-Pt(NH₃)₂ (**ST6**), mentre que inicialment s'havia format majoritàriament l'adducte amb la timina de l'extrem 3', $5'$ dTTX^STT-Pt(NH₃)₂ (**ST5**), que va anar disminuint amb el temps. No es va aïllar cap adducte on la T coordinant fos l'adjacent al tioèter per l'extrem 3' (la qual cosa lliga amb els resultats de complexació amb $5'$ dX^STTTT). De fet, és sorprenent que es formés l'adducte **ST6**, ja que degut a l'estereoquímica *trans* del complex metàl·lic, la molècula ha d'adoptar una estructura relativament més tensionada (cal recordar que lesions (G1,G2)-intracadena no són possibles amb transplatí, mentre que són les majoritàries amb cisplatí).

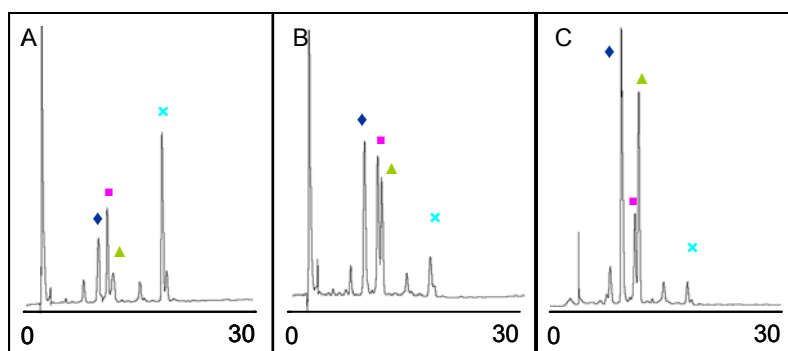


Figura 2.19. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'$ dTTX^STT i 2 eq de transplatí als 30 min (A), 2.5 h (B) i 4 dies (C).

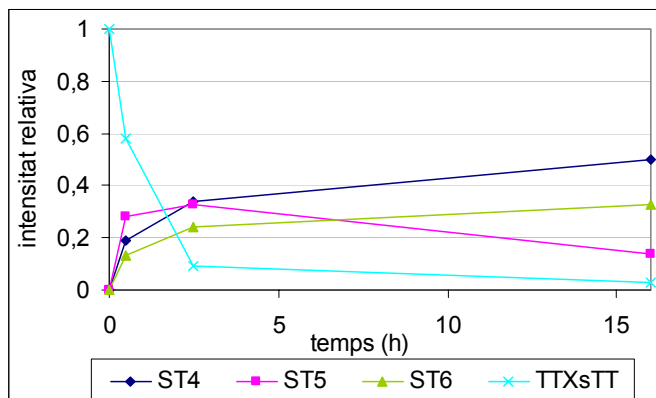


Figura 2.20. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $5'$ dTTX^STT i transplatí.

Els tres adductes es van aïllar i caracteritzar (veure Figura 2.21). En aquest cas, la 5'-exonucleasa va actuar correctament, de manera que no va degradar l'adducte majoritari **ST4**, mentre que a **ST5** va eliminar dues timines i a **ST6** només la de l'extrem 5'. La 3'-exonucleasa va permetre elucidar quina és la nucleobase de l'extrem 3' que es troba coordinant el Pt: X^S per a **ST4** i **ST6**, mentre que per a **ST5** és la T de l'extrem. Per tractament amb H₂O₂ es va confirmar la coordinació del platí al sofre del tioèter (no es va oxidar cap adducte), la qual cosa concorda amb els resultats obtinguts per digestió enzimàtica. Un cop més, aquest assaig descarta la coordinació del metall al N3 de la nucleobase modificada.

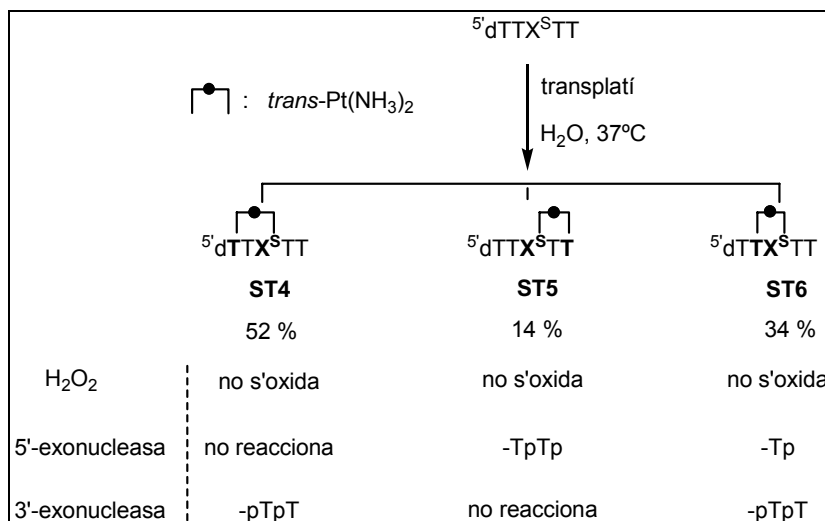


Figura 2.21. Reacció de complexació amb $5'$ dTTX^STT, amb un resum dels resultats obtinguts en la caracterització dels adductes majoritaris.

D'altra banda, l'anàlisi posterior dels adductes mitjançant HPLC va mostrar que el producte coordinat a l'extrem 3' desplatina parcialment a l'oligonucleòtid de partida (13 %), mentre que els altres dos adductes romanen estables. Aquest fet justifica la disminució de la presència del complex **ST5** al llarg de la reacció. Probablement, la formació de l'adducte **ST5** està cinèticament afavorida però **ST4** i **ST6** són més estables termodinàmicament. És sorprenent la major estabilitat dels complexos **ST4** i **ST6** respecte a la majoria de complexos estudiats, on es produeix la desplatiniació parcial amb el temps.

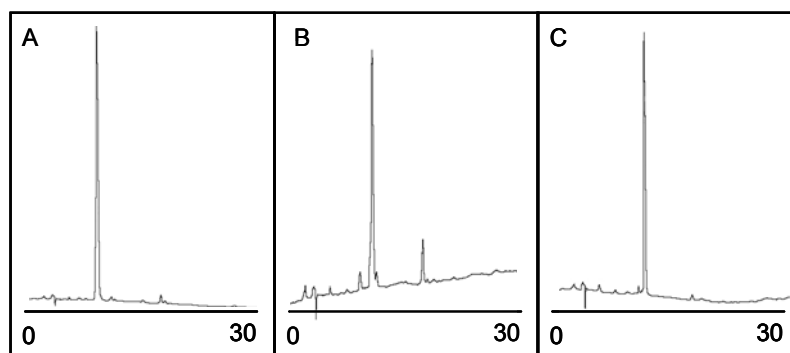


Figura 2.22. Estabilitat dels adductes platinats en solució aquosa emmagatzemats a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant un mes: **ST4** (A), **ST5** (B) i **ST6** (C).

2.3.4 Reacció del transplatí amb $5'\text{dX}^{\text{S}}\text{CCCC}$

Es dugué a terme la reacció del transplatí amb $5'\text{dX}^{\text{S}}\text{CCCC}$ (0.05 mM) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, emprant només 1 eq de transplatí, perquè ara la molècula conté diversos centres reactius. Es van formar tres adductes platinats, amb una proporció que va anar variant lleugerament al llarg de les primeres hores de reacció, fins arribar a una proporció relativa de 12:44:44. A les 10 h, pràcticament s'havia platinat tot l'oligonucleòtid inicial ($> 95\%$), estimant un $t_{1/2} \sim 1\text{ h}$ per a la reacció, que va seguir una cinètica similar a la de les platinacions dels oligonucleòtids amb X^{S} i tot timines. Els adductes es van aïllar per HPLC per tal de realitzar la caracterització estructural, que va ser força difícil perquè van resultar ser poc estables, tot i que el tractament amb H_2O_2 va permetre assegurar que el platí coordina el tioèter. L'altra posició estaria ocupada pel N3 d'una C, tal i com es mostra a la **Figura 2.26**, majoritàriament la C de l'extrem 3' (**SC3**) i la seva veïna (**SC2**). Per l'altre adducte (**SC1**), format en menor quantitat i que s'ha mostrat més inestable, els resultats no són conclouents però tot sembla indicar que la C coordinada és la que es troba adjacent a X^{S} .

Es va deixar evolucionar la reacció al llarg de més de dos dies per a determinar si hi havia migració de l'àtom metàl·lic del sofre a una altra nucleobase, però en tot moment aquest patró de coordinació es mantingué estable.

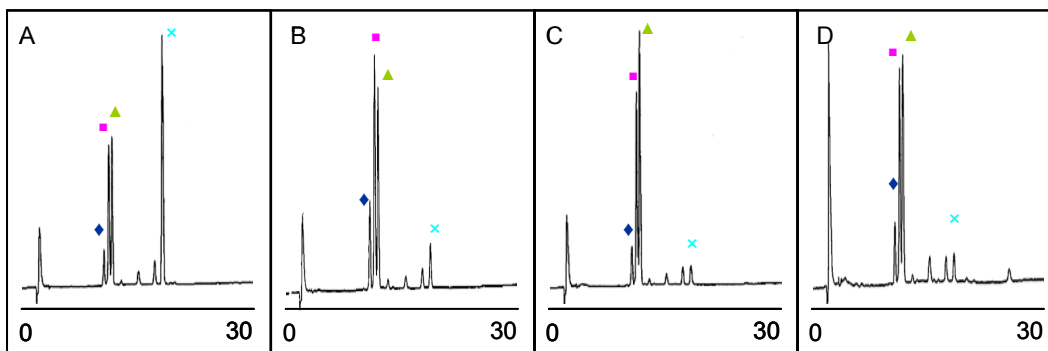


Figura 2.23. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $^5dX^S$ CCCC i transplatí a 1 h (A), 4.5 h (B), 10 h (C) i 55 h (D).

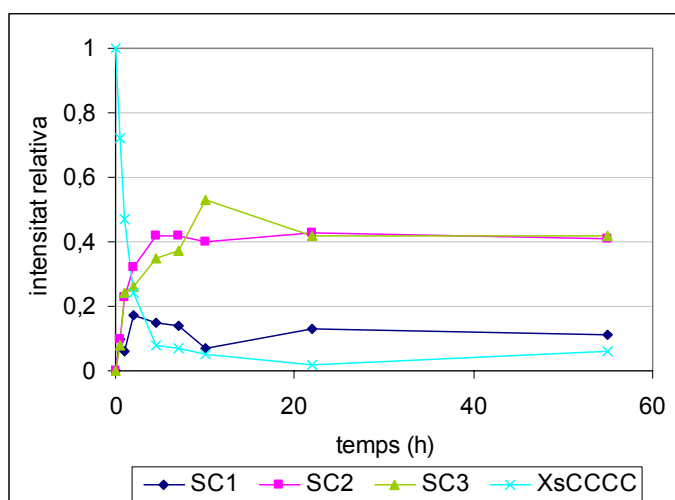


Figura 2.24. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $^5dX^S$ CCCC i transplatí.

Gran part de la dificultat de caracterització d'aquests compostos rau en el fet que el platí tendeix a migrar d'una citosina a una altra en solució aquosa, però sempre mantenint-se la coordinació al tioèter. Per exemple, es va estudiar l'estabilitat de $^5dX^S$ CCCC-Pt(NH₃)₂, **SC3**, en aigua a temperatura ambient (veure Figura 2.25-A,B). L'anàlisi per HPLC al cap de 7 h va indicar que l'adducte havia donat lloc parcialment als altres dos adductes presents a la reacció de complexació. Resultats similars es varen obtenir per a $^5dX^S$ CCCC-Pt(NH₃)₂, **SC2** (Figura 2.25-C,D), de manera que l'anàlisi d'una alíquota en solució aquosa després d'una nit a temperatura ambient va mostrar un increment de la presència dels altres adductes del medi de reacció. Per tant, es pot concloure que els adductes són poc estables en solució aquosa, pel fet que l'àtom metàl·lic tendeix a migrar d'una citosina a una altra, mantenint fixa la seva unió al grup tioèter. D'altra banda, en el propi procés d'aïllament és possible que aquesta migració tingui lloc, de manera que és necessari minimitzar el temps de manipulació dels adductes abans de la realització dels estudis de caracterització, per evitar partir de mesclades de productes.

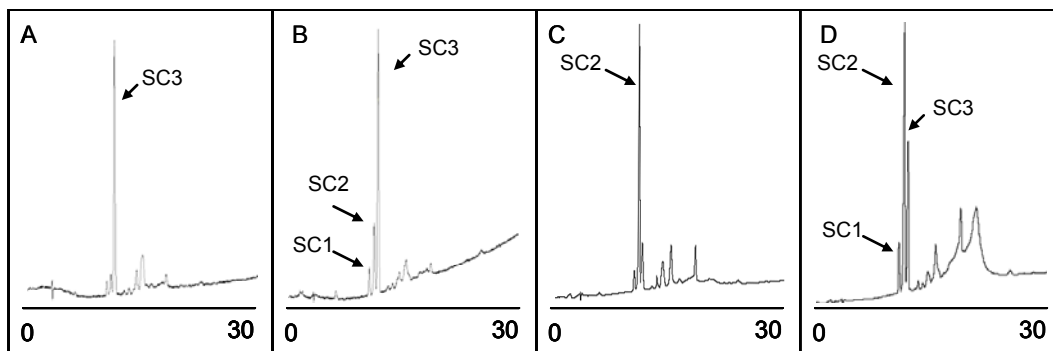


Figura 2.25. Perfils de HPLC corresponents a l'evolució de l'adducte **SC3** en solució aquosa a temperatura ambient, a temps 0 (A) i al cap de 7 h (B), i de l'adducte **SC2**, a temps 0 (C) i al cap d'una nit (D).

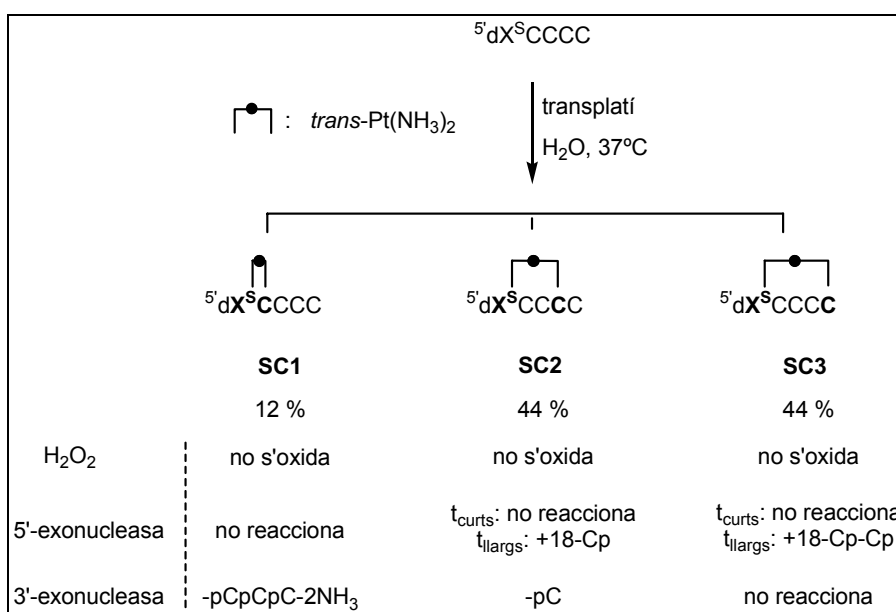


Figura 2.26. Reacció de complexació amb $5'dX^S CCCC$ i resum dels resultats de caracterització dels adductes formats.

A la Figura 2.27, es mostren els punts de coordinació de l'àtom metàl·lic als tres adductes platinats: d'una banda el sofre del grup tioèter, mentre que per l'altra se suposa que coordina el N3 de la C, el punt més reactiu d'aquesta nucleobase (tal i com s'ha comentat a l'apartat 2.1).

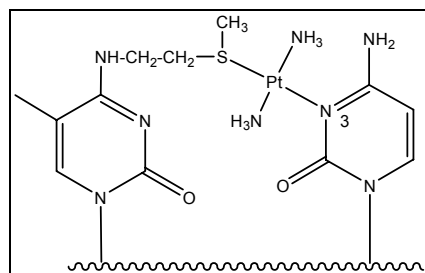


Figura 2.27. Coordinació del metall al sofre de X^S i al N3 d'una de les citosines de la seqüència.

Per a **SC2** i **SC3**, amb la 5'-exonucleasa es va observar a temps llargs un increment de massa de 18 unitats i posteriorment la pèrdua d'una unitat d'àcid 2'-desoxi-3'-citiidílic (Cp), degut a la hidròlisi d'un fosfat del cicle i posterior eliminació per part de l'enzim del nucleòtid de l'extrem 5'-OH generat (veure Figura 2.28). Per a **SC3** també es va detectar la digestió d'una segona unitat de Cp, la qual cosa permet concloure que, altre cop, l'enllaç fosfodiester que s'hidrolitza és el que es troba entre les dues primeres citosines començant per l'extrem 5'. Aquesta digestió anòmala, que en aquest cas va tenir lloc en baixa proporció, ja s'havia observat per als adductes amb $5'dX^S TTTT$. Nogensmenys, la coordinació del Pt al S del tioèter de l'extrem 5' de l'oligonucleòtid es va confirmar per tractament amb H_2O_2 , ja que l'adducte es mantingué estable.

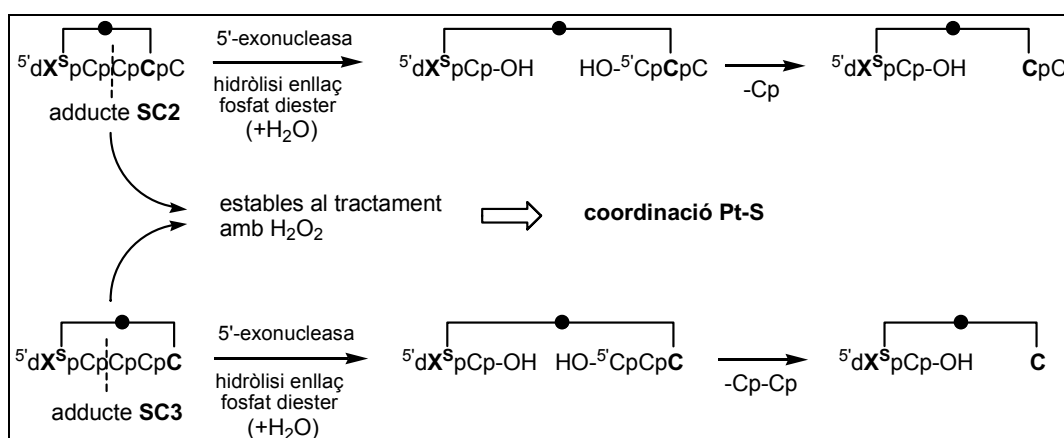


Figura 2.28. Proposta per a l'evolució de la digestió de **SC2** i **SC3** amb la 5'-exonucleasa, i resultats del tractament amb H_2O_2 .

2.3.5 Reacció del transplatí amb $5'dX^S AAAA$

La reacció de platinació es va portar a terme en solució aquosa (0.05 mM) a 37 °C, donant lloc majoritàriament a quatre adductes platinats. Tot i afegir 1 eq de transplatí no es va observar reacció quantitativa de l'oligonucleòtid de partida. De fet, a les 5 h encara quedava un 44 % d'oligonucleòtid sense reaccionar i a temps més llargs es va observar un augment d'aquest percentatge, la qual cosa indica que els adductes formats desplatinaven en el medi de reacció (Figura 2.29).

Es van aïllar els quatre adductes per HPLC per tal d'intentar elucidar quines nucleobases es coordinen al platí. Tant per tractament amb H_2O_2 com per digestió enzimàtica amb una 5'-exonucleasa, els adductes es van mostrar estables, podent concloure que el platí coordina l'àtom de sofre del nucleòsid modificat X^S . Amb la 5'-exonucleasa, i només a temps llargs, es va detectar un pic poc intens de massa corresponent a un guany de 18 unitats, que estaria relacionat amb l'actuació d'aquest enzim com a endonucleasa (resultat ja observat per a $5'dX^S TTTT$ i $5'dX^S CCCC$). Bàsicament, els problemes de caracterització foren amb les

digestions amb la 3'-exonucleasa. En general, per als quatre adductes es van obtenir majoritàriament la massa corresponent a ${}^5\text{dX}^{\text{S}}\text{AAAA-trans-Pt}(\text{NH}_3)_2$ (coordinació a la A de l'extrem 3') i la pèrdua de pA, que correspon a ${}^5\text{dX}^{\text{S}}\text{AAAA-trans-Pt}(\text{NH}_3)_2$. Tot i així, de forma minoritària es detectaren les masses corresponents a la coordinació del platí a les altres dues adenines més properes a X^{S} . Pel que fa a l'àtom que es troba coordinat al metall, per a l'adenina hi ha dos possibles candidats, el N7 i el N1, tot i que és més reactiu el N7 (veure Figura 2.1).

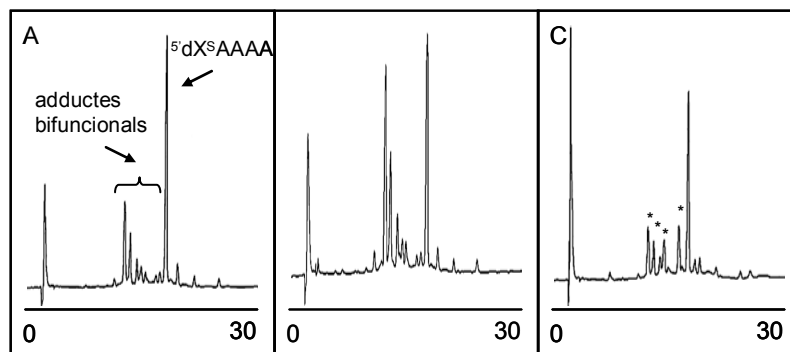


Figura 2.29. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre ${}^5\text{dX}^{\text{S}}\text{AAAA}$ i transplatí a 1 h (A), 4.5 h (B) i 55 h (C). * adductes aïllats.

Així, doncs, no s'ha aconseguit determinar la coordinació del metall per l'extrem 3' de l'oligonucleòtid, ja que probablement té lloc migració del platí en el procés d'aïllament dels productes i/o en la hidròlisi enzimàtica. Sembla que la labilitat de la unió Pt-N en *trans* a Pt-S és, en aquest cas, més gran que en els anteriors adductes, de manera que constantment s'afavoreix un procés de migració del platí d'una adenina a una altra. Tot i així, amb els resultats obtinguts amb la 3'-exonucleasa es pot considerar que majoritàriament hi ha una coordinació del tipus ${}^5\text{dX}^{\text{S}}\text{AAAA-trans-Pt}(\text{NH}_3)_2$ i ${}^5\text{dX}^{\text{S}}\text{AAAA-trans-Pt}(\text{NH}_3)_2$, tot i que amb el temps els adductes acaben desplatinant en el medi de reacció.

2.3.6 Reacció del transplatí amb ${}^5\text{dX}^{\text{S}}\text{GGGGTT}$

La reacció amb aquest oligonucleòtid va ser la més complexa de totes, com era previsible, pel fet que el platí té una gran afinitat pel N7 de la guanina. La reacció de platinació es portà a terme en dissolució aquosa (0.05 mM) a 37 °C, amb 1 eq de transplatí. L'anàlisi de la reacció mitjançant HPLC va mostrar un perfil cromatogràfic força complex, amb la presència de pics solapats (Figura 2.30). Es van analitzar per EM MALDI-TOF els pics majoritaris aïllats per HPLC al cap de 22 h de reacció, detectant en molts casos adductes doblement platinats (tot i haver afegit només 1 eq de transplatí), a més a més d'adductes monoplatinats i l'oligonucleòtid inicial. Tot i així, no es va detectar cap adducte monofuncional amb un àtom de clor a l'esfera de coordinació del platí.

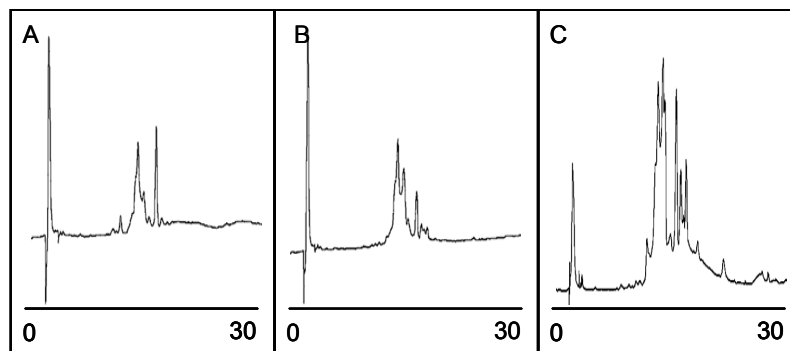


Figura 2.30. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5\text{-dX}^{\text{S}}\text{GGGTT}$ i transplatí a 1 h (A), 4.5 h (B) i 22 h (C).

La dificultat de separar cromatogràficament aquests productes pot estar relacionada, per una banda, amb la possible estructuració tant de l'oligonucleòtid de partida com dels adductes, degut a la presència de quatre guanines seguides (que poden donar lloc a estructures de tipus quàdruplex). D'altra banda, el N7 de la guanina és molt reactiu i per això es formaren molts productes platinats, on probablement juguen un paper important tant les guanines com el grup tioèter.

Per tots aquests motius, no es va aprofundir en l'estudi d'aquesta reacció de complexació.

2.3.7 Conclusions més rellevants d'aquests estudis

Així, doncs, com a resum dels resultats exposats amb oligonucleòtids model modificats amb X^{S} es pot concloure que:

- Dels tres mètodes d'activació dels transplatí assajats, la simple aquatització per escalfament en aigua és el protocol que dóna lloc a crús menys heterogenis.
- Les reaccions són molt ràpides, per la gran afinitat dels compostos de Pt(II) per lligands amb sofre ($t_{1/2} \sim 1\text{-}2$ h a 37°C). Així, doncs, el nucleòsid modificat amb el grup tioèter dirigeix la coordinació en tots els casos cap a ell, de manera ràpida i selectiva.
- No es detecten adductes monofuncionals degut a l'efecte *trans* del sofre, que labilitza el clor en posició *trans* respecte a ell. Aquest efecte *trans* tan fort deu ser el responsable del fet que es formin adductes bifuncionals en els oligonucleòtids $5\text{-dX}^{\text{S}}\text{TTTT}$ i $5\text{-dTTX}^{\text{S}}\text{TT S-Pt-N3}$ de la timina, cosa força sorprenent en un medi en el qual la timina no està desprotonada.
- Pel que fa a la grandària dels quelats formats, és difícil predir en oligonucleòtids de seqüència $5\text{-dX}^{\text{S}}\text{N}_1\text{N}_2\text{N}_3\text{N}_4$ (N = A, C o T) quin serà la segona posició de coordinació. Tot i així, sí que s'observa una tendència a la formació majoritària dels adductes $5\text{-dX}^{\text{S}}\text{N}_1\text{N}_2\text{N}_3\text{N}_4\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ i $5\text{-dX}^{\text{S}}\text{N}_1\text{N}_2\text{N}_3\text{N}_4\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$. També s'ha vist, per a $5\text{-dTTX}^{\text{S}}\text{TT}$, una

preferència termodinàmica per als adductes on la timina coordinada es troba cap a l'extrem 5' del nucleòsid modificat.

- Tot i que el N3 del nucleòsid modificat X^S podria metal·lar-se, no es detecta que tingui lloc en cap cas. La digestió enzimàtica amb la 5'-exonucleasa mostra la coordinació de X^S quan aquest es troba en la posició 5', i el tractament amb H_2O_2 confirma que el platí coordina el sofre del tioèter. El segon punt de coordinació es dedueix, per tant, dels resultats de la digestió amb la 3'-exonucleasa.
- Quan la 5'-exonucleasa no pot actuar eliminant el nucleòtid de l'extrem 5' perquè està platinat, en els quelats ${}^5dX^SN_1N_2N_3N_4-Pt(NH_3)_2$ o ${}^5dX^SN_1N_2N_3N_4-Pt(NH_3)_2$ (excepte en el cas del quelat **ST3**), acaba actuant com a endonucleasa, hidrolitzant la unió fosfat diester N_1pN_2 , i eliminant N_2p (i N_3p quan és possible).
- Respecte a l'estabilitat, per als adductes amb ${}^5dX^STTTT$ i ${}^5dTXX^STT$ depèn una mica del producte, però en general hi ha desplatinació. En la reacció amb ${}^5dX^SCCCC$ i ${}^5dX^SAAAA$, bàsicament es formen els mateixos adductes que amb ${}^5dX^STTTT$ però encara són menys estables, donant desplatinació i interconversions entre ells.

2.4 ESTUDIS DE PLATINACIÓ AMB OLIGONUCLEÒTIDS QUE INCORPOREN X^I

Un cop vista la reactivitat dels oligonucleòtids ${}^5dX^SNNNN$, es va estudiar l'efecte del grup imidazole del nucleòsid X^I en cadenes oligonucleotídiques de seqüència ${}^5dX^ITNT$, on N = A, C, G o T. En aquest cas, només es va introduir una nucleobase N diferent a la timina, pel fet que en els estudis amb ${}^5dX^SNNNN$ no es va trobar que hi hagués cap preferència molt marcada en la grandària dels adductes formats. Per tant, en els assajos amb els oligonucleòtids ${}^5dX^ITNT$ tan sols es vol obtenir informació cinètica, sobre els punts més reactius i sobre l'estabilitat dels adductes que es formen. Així es podrà avaluar quina nucleobase presenta una major afinitat per a coordinar-se al platí(II), bàsicament X^I i/o N (en aquest cas, essent N una A, C o G, ja que la T ja s'ha dit que és molt poc favorable a metal·lar-se).

Pel que fa a l'anell d'imidazole, en la seva forma neutra es troba en equilibri entre dues formes tautomèriques que corresponen a la presència del protó unit al N_τ o bé unit al N_π . En general, el tautòmer majoritari és el N_τ -H (veure Figura 2.31). Respecte a la capacitat nucleofílica de l'anell d'imidazole, aquesta depèn bàsicament del pH del medi. Així, si el pH és inferior al pKa (6.13 per a la histamina),²⁶ l'anell imidazòlic està protonat i no és un bon nucleòfil. En canvi, si el pH és superior al pKa, aquest es troba en la seva forma neutra i el nitrogen de tipus piridínic és un bon candidat per a interaccionar amb un metall. Diferents estudis de complexació de derivats d'histidina o pèptids que contenen aquest aminoàcid amb el derivat $[PtCl(dien)]Cl$ han indicat que és possible la coordinació al nitrogen piridínic de qualsevol dels dos tautòmers,

essent la preferència per l'un o per l'altre molt depenent del producte estudiat.²⁷ Les tècniques de caracterització a les quals s'ha tingut accés no permeten determinar quin nitrogen (si el N_{π} o el N_{τ}) és el que es troba coordinant el metall. Seria necessari un estudi per RMN que requereix una gran quantitat de mostra.^{9b}

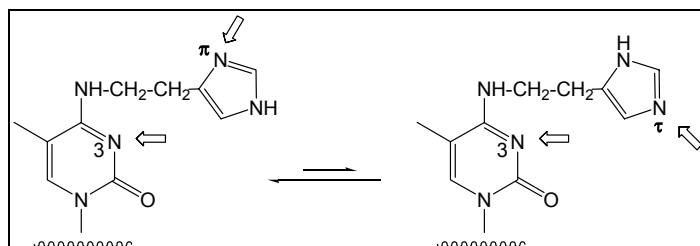


Figura 2.31. Equilibri tautomèric de l'anell d'imidazole, amb les possibles posicions reactives front a complexos de platí(II).

A part de l'anell imidazòlic, per a X^I també hi ha la possibilitat de coordinació pel $N3$ de la nucleobase. Ara bé, cal recordar que per a X^S no es va caracteritzar cap adducte on el $N3$ fos l'àtom coordinant.

2.4.1 Reacció del transplatí amb $5'dX^I$ TTTT

La reacció entre $5'dX^I$ TTTT i transplatí es va portar a terme en dissolució aquosa en les mateixes condicions que els assajos anteriors amb oligonucleòtids que contenen X^S , a pH lleugerament àcid. Mentre que la reacció amb $5'dX^S$ TTTT dóna lloc a la formació de tres adductes en menys de 5 h de reacció ($t_{1/2} \sim 2$ h a 37°C), l'oligonucleòtid $5'dX^I$ TTTT pràcticament no es va platinar després de dos dies.

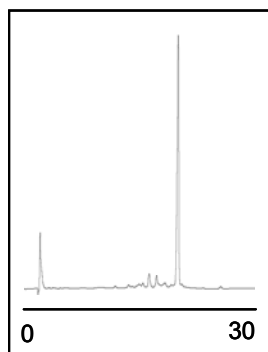


Figura 2.32. Perfil de HPLC corresponent a la reacció entre $5'dX^I$ TTTT i transplatí al cap de 2 dies.

L'anell d'imidazole del nucleòsid modificat X^I es pot coordinar al Pt(II) donant lloc a complexos intra- o intermoleculars termodinàmicament molt estables, però cinèticament la reacció no està afavorida, a diferència del que passa amb el grup tioèter de X^S , on la cinètica és ràpida però els

complexos no són tan estables. És interessant remarcar que tampoc no es va formar cap adducte per coordinació del metall al N3 de X^I. Possiblement, el fet de treballar a pH lleugerament àcid, on un 50 % (o més) dels grups imidazole estan protonats, no n'afavoreix la coordinació del metall. Ara bé, com es veurà més endavant, el fet de treballar a pH lleugerament àcid no és un impediment perquè l'imidazole es pugui platinar si la cadena oligonucleotídica conté un centre suficientment reactiu. És a dir, aquesta reacció es veu afavorida quan a l'oligonucleòtid estan presents lligands més reactius (el tioèter o el N7 de purines), que faciliten la coordinació a l'imidazole en una segona etapa de la reacció.

De tota manera, en els experiments que es descriuen a continuació es van realitzar les reaccions de complexació a dos pH diferents. En aquest sentit, és important no oblidar que el transplatí, un cop aquatitzat, tendeix a presentar-se en forma hidroxó i aquest lligand és molt menys làbil que l'aqua.¹¹ A mesura que el pH és més bàsic, disminueix la presència de les formes actives del transplatí i això repercuteix en la seva reactivitat, que és menor.

2.4.2 Reacció del transplatí amb 5'^dX^ITTCT

Primerament, es va realitzar la reacció de complexació de transplatí (2 eq) amb 5'^dX^ITTCT (0.05 mM) en solució aquosa, on el pH era lleugerament àcid (5.7). Es va observar que en anar passant el temps, el pH va baixar una mica (5.2 al cap de 16 dies). A temps curts de reacció (4 h) es va observar la formació d'un producte intermedi que es va caracteritzar com l'adducte monofuncional sobre el N3 de la citosina (5'^dX^ITTCT-Pt(NH₃)₂Cl, **ICmonof**). A partir d'aquest adducte, es van formar lentament i majoritària dos nous productes (veure Figura 2.33), que es van caracteritzar com a adductes bifuncionals coordinats a les nucleobases X^I i C, 5'^dX^ITTCT-Pt(NH₃)₂ (**IC1**) i 5'^dX^ITTCT-Pt(NH₃)₂ (**IC2**). En arribar a la situació estacionària (12-16 dies), aquests dos adductes bifuncionals estaven presents de forma molt majoritària, en una proporció **IC1/IC2** 36:64 ($t_{1/2} \sim 20$ h).

La caracterització dels diferents adductes es va realitzar, com de costum, mitjançant digestió enzimàtica amb una 5'- i 3'-exonucleasa, analitzant alíquotes per EM MALDI-TOF a diferents temps. Amb la 3'-exonucleasa es va observar en tots tres adductes l'eliminació de la timina de l'extrem 3', indicant que una de les posicions de coordinació del platí està ocupada per la citosina (pel N3, que és la posició més reactiva d'aquesta nucleobase).² En el cas de l'adducte monofuncional, la digestió amb la 5'-exonucleasa no va ser concloent, potser degut a la seva labilitat en les condicions de la reacció enzimàtica. Ara bé, en el cas dels adductes bifuncionals **IC1** i **IC2**, en l'assaig amb la 5'-exonucleasa es va observar la massa corresponent a l'adducte sense digerir, confirmant-se així la coordinació a X^I, així com també una massa que correspondria a la hidròlisi d'un enllaç fosfodiester intern del cicle (guany d'una molècula d'aigua) i posterior eliminació d'una Tp, tal i com ja s'havia observat anteriorment en adductes amb X^S. Per tant, es pot suposar que la coordinació té lloc en aquests adductes al nucleòsid modificat X^I, ja que sinó tindria lloc la digestió del complex per l'extrem 5' fins a la nucleobase

que estigués coordinada al platí. A la Figura 2.35, s'esquematitzen els resultats dels assajos enzimàtics realitzats per als adductes bifuncionals amb $5'dX^lTTCT$.

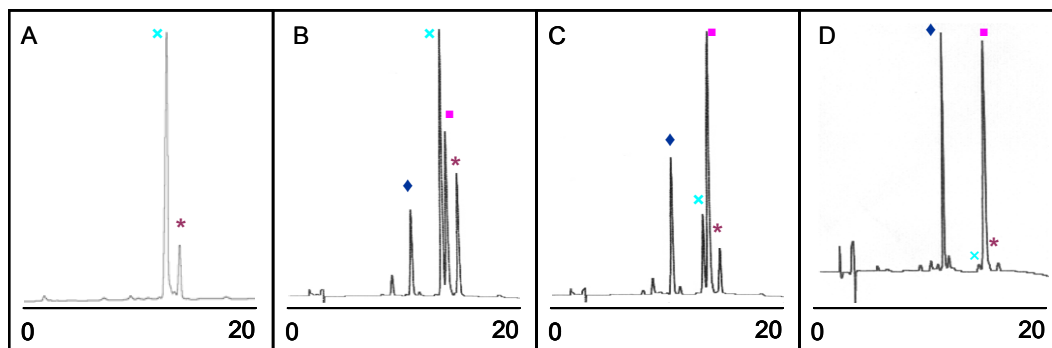


Figura 2.33. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'dX^lTTCT$ i transplatí a les 4 h (A), 30 h (B), 4 dies (C) i 12 dies (D), en solució aquosa a pH lleugerament àcid.

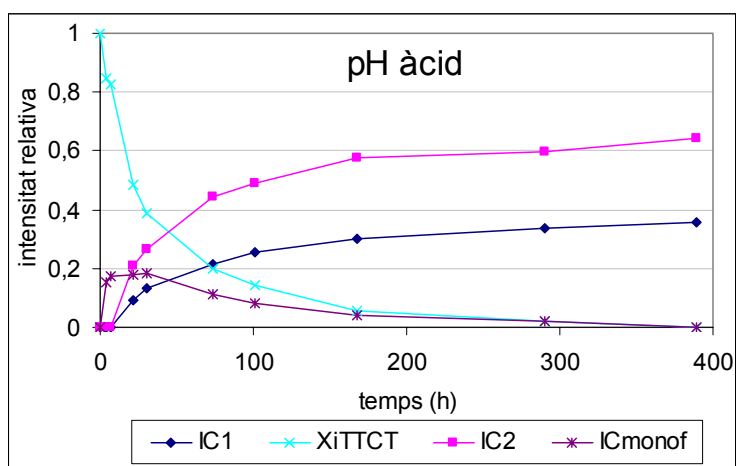


Figura 2.34. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $5'dX^lTTCT$ i transplatí a pH lleugerament àcid.

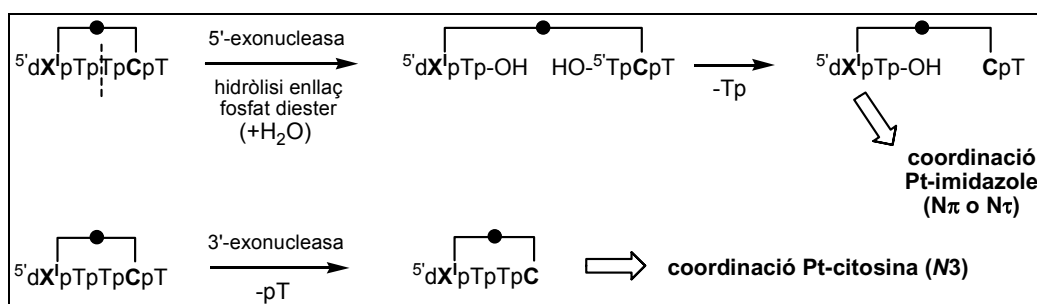


Figura 2.35. Resultats obtinguts en la digestió enzimàtica dels adductes bifuncionals de transplatí amb $5'dX^lTTCT$.

Com que els experiments de digestió enzimàtica suggereixen que en els dos adductes el platí s'uneix a X^1 i a C, i com que mai no s'ha detectat reactivitat del $N3$ de les nucleobases modificades (X^1 o X^S) en les condicions de reacció, el més lògic és pensar que els dos adductes bifuncionals corresponen als dos possibles isòmers constitucionals resultants de la coordinació al $N\tau$ i $N\pi$. Tot sembla indicar, encara que a pH àcid l'imidazole està parcialment protonat, que és possible la coordinació del platí(II) als nitrògens piridínics dels dos tautòmers en equilibri (veure Figura 2.36).

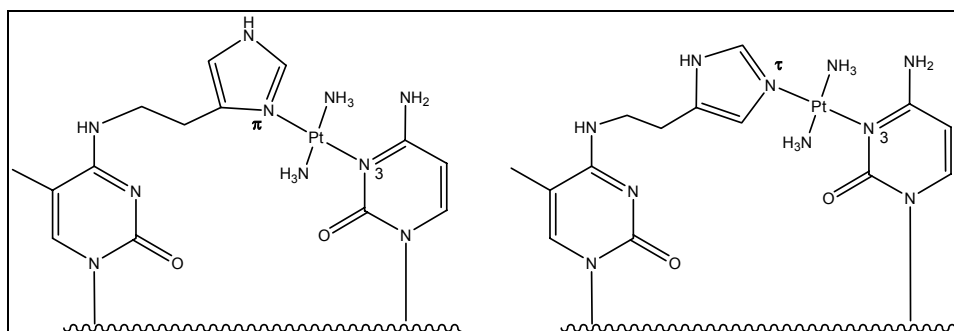


Figura 2.36. Estructures dels dos possibles adductes resultants de la coordinació del metall a cadascun dels nitrògens imidazòlics de X^1 i al $N3$ de la citosina.

Un cop estudiada la reacció a pH lleugerament àcid, es va realitzar el mateix experiment a pH lleugerament bàsic, on l'anell imidazòlic estaria majoritàriament en forma neutra. En afegir el transplatí sobre la solució d'oligonucleòtid a pH 8, el pH va baixar fins a un valor al voltant de 7.2, i amb el temps, va tendir a disminuir (al cap de 5 dies era de l'ordre de 6-7).²⁸ En general, la reacció va seguir una cinètica molt més lenta, tal i com es pot veure comparant els gràfics corresponents (Figura 2.34 i Figura 2.38). Mentre que a pH àcid al cap d'un dia quedava menys d'un 50 % d'oligonucleòtid de partida ($t_{1/2} \sim 20$ h a 37 °C), a pH bàsic van caldre 5 dies per tal d'assolir el mateix percentatge de platinació ($t_{1/2} \sim 120$ h a 37 °C). Com ja s'ha comentat, aquesta menor reactivitat és deguda al fet que el transplatí aquatitzat a pH lleugerament bàsic es presenta molt majoritàriament en les corresponents formes hidrox, lligand molt menys làbil que l'aqua (veure Figura 2.9).¹¹ Una altra diferència entre ambdues reaccions és que en aquest cas no es va detectar pràcticament presència d'adducte monofuncional coordinat a la C, la qual cosa indica que té lloc ràpidament la formació de l'adducte bifuncional (en aquest cas, com que l'anell imidazòlic es troba majoritàriament en forma neutra, és igualment possible que sigui X^1 o C la primera nucleobase a coordinar-se a l'àtom metàl·lic).

En aquest assaig, els productes majoritaris van ser altre cop $^5dX^1TTCT-Pt(NH_3)_2$ (**IC1**) i $^5dX^1TTCT-Pt(NH_3)_2$ (**IC2**) en una proporció relativa 41:59, molt similar a l'obtinguda a pH àcid. En aquest cas també es va detectar la presència (~ 14 %) d'un altre adducte bifuncional del tipus $^5dX^1TTCT-Pt(NH_3)_2$, pràcticament no detectable a pH àcid, que no es pogué caracteritzar

mitjançant digestions enzimàtiques. Podria tractar-se d'un adducte en el qual la coordinació tingui lloc a la C i al N3 de la nucleobase modificada X¹.

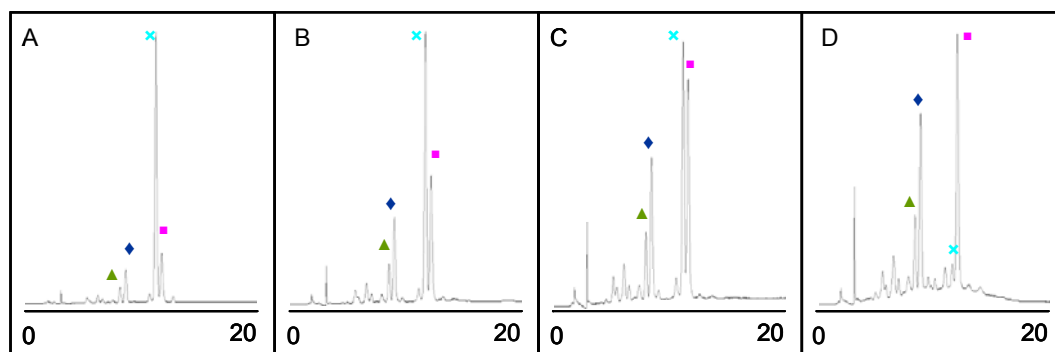


Figura 2.37. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre ⁵dX¹TTCT i transplatí als 2 dies (A), 5 dies (B), 8 dies (C) i 15 dies (D), a pH lleugerament bàsic.

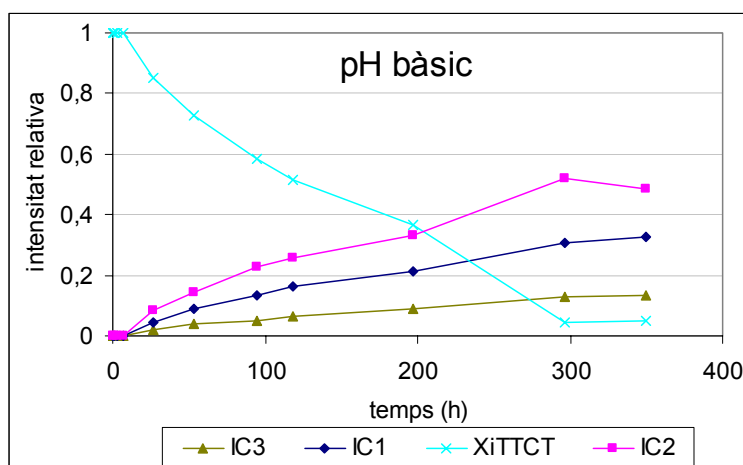


Figura 2.38. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre ⁵dX¹TTCT i transplatí a pH lleugerament bàsic.

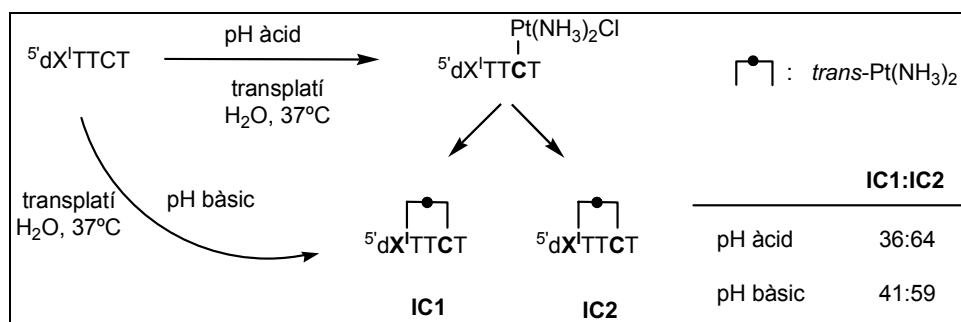


Figura 2.39. Esquema de l'evolució de la reacció de complexació amb ⁵dX¹TTCT a diferents pH, amb les proporcions entre els adductes majoritaris caracteritzats.

També es va voler avaluar l'estabilitat dels nous adductes platinats, mantenint-los 24 h en solució aquosa a temperatura ambient (veure Figura 2.40). L'anàlisi per HPLC va mostrar que els dos adductes bifuncionals **IC1** i **IC2** són estables. En canvi, l'adducte monofuncional **ICmonof**, va evolucionar cap als adductes bifuncionals **IC1** i **IC2**. El fet que en el cromatograma la proporció de **IC2** sigui més gran que la de **IC1** concorda amb el fet que en la reacció s'obté una relació **IC1/IC2** 4:6.

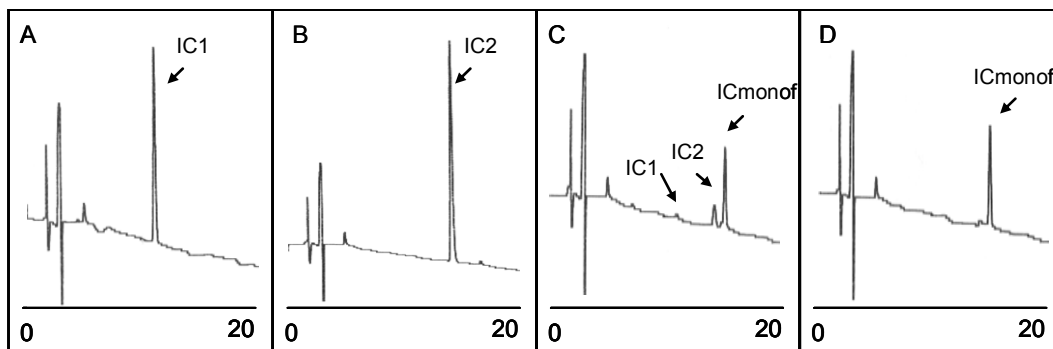


Figura 2.40. Perfils de HPLC corresponents a l'anàlisi de les solucions dels diferents adductes després de 24 h a temperatura ambient: **IC1** (A), **IC2** (B), **ICmonof** (C). D correspon a l'adducte monofuncional pur emprat per a aquest estudi.

2.4.3 Reacció del transplatí amb $5'$ dX^ITTAT

Per a $5'$ dX^ITTAT es va realitzar també la reacció amb transplatí (2 eq), primer a pH lleugerament àcid i després a pH més bàsic, per tal d'estudiar les possibles diferències.

A pH lleugerament àcid (5.3-5.0), al cap de 8 h ja s'havia platinat un 50 % d'oligonucleòtid ($t_{1/2} \sim 8$ h a 37 °C), detectant-se l'adducte monofuncional sobre l'adenina ($5'$ dX^ITTAT-Pt(NH₃)₂Cl, **IAmonof**) i dos adductes bifuncionals on el segon punt de coordinació implicaria l'imidazole del nucleòsid X^I, $5'$ dX^ITTAT-Pt(NH₃)₂ (**IA1**) i $5'$ dX^ITTAT-Pt(NH₃)₂ (**IA2**). A temps curts, la proporció entre **IA1** i **IA2** era 18:82, proporció que va anar-se invertint fins que a temps llargs l'adducte majoritari va ser **IA1**, essent la proporció relativa 75:25.

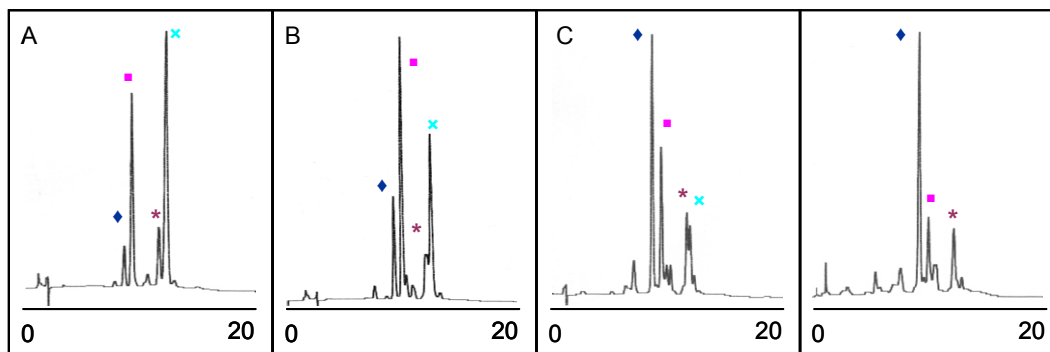


Figura 2.41. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'$ dX^ITTAT i transplatí a les 8 h (A), 22 h (B), 4 dies (C) i 16 dies (D), a pH lleugerament àcid.

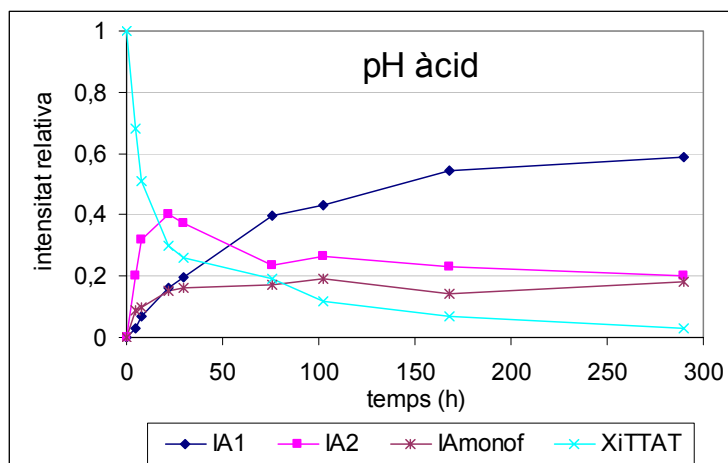


Figura 2.42. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $5'dX^{lTTAT}$ i transplatí a pH lleugerament àcid.

Per a la reacció a pH lleugerament bàsic (8.7-6.7), un cop més la cinètica va ser més lenta que a pH àcid (del mateix ordre que per $5'dX^{lTTCT}$), determinant un $t_{1/2} \sim 110$ h a $37^\circ C$ per a la desaparició d'oligonucleòtid de partida. En aquest cas no es va detectar la formació d'adducte monofuncional **IAmonof**, resultat semblant a l'obtingut en la reacció de $5'dX^{lTTCT}$ amb transplatí a pH bàsic. L'adducte majoritari va ser un altre cop **IA1**, que en aquest cas sempre va estar present en major proporció que **IA2**. A la situació estacionària es va arribar a la mateixa relació **IA1/IA2** que a pH àcid (75:25), tot i que al cap de 12 dies encara hi havia un 35 % d'oligonucleòtid sense platinar.

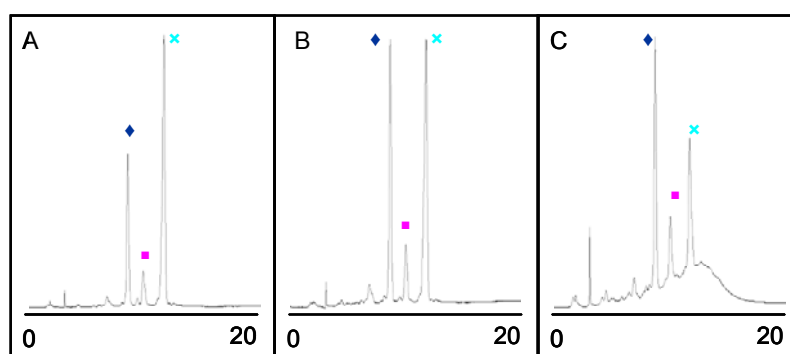


Figura 2.43. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'dX^{lTTAT}$ i transplatí, a pH lleugerament bàsic, als 2 dies (A), 4 dies (B) i 12 dies (C).

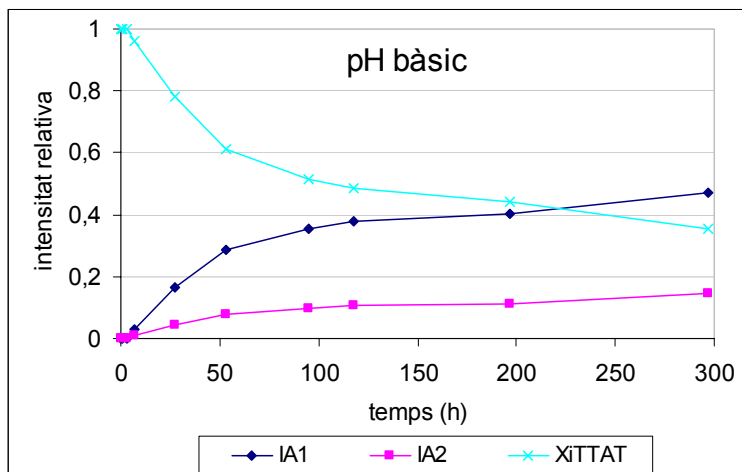


Figura 2.44. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTAT}$ i transplatí a pH lleugerament bàsic.

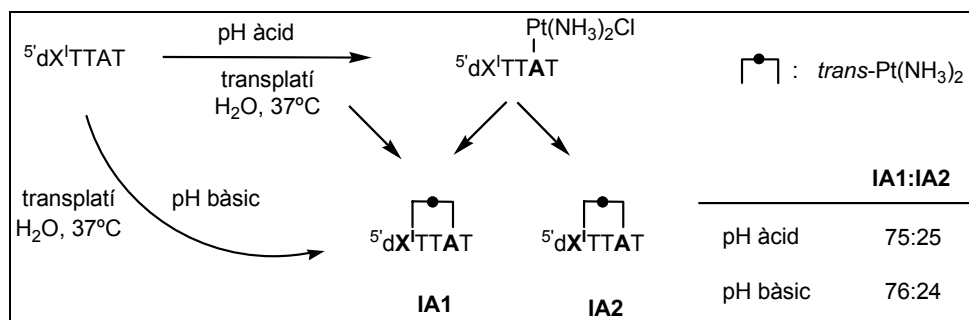


Figura 2.45. Esquema de l'evolució de la reacció de complexació amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTAT}$, a diferents pH, amb les proporcions entre els adductes majoritaris que s'han caracteritzat.

Els complexos **IA1** i **IA2**, així com l'adducte monofuncional, es van aïllar per HPLC i es va comprovar que, un cop aïllats, són essencialment estables (a diferència dels adductes formats per coordinació a X^{S} i A), de manera que van poder caracteritzar per EM MALDI-TOF i digestions enzimàtiques. Amb la 3'-exonucleasa es va observar, en tots tres adductes, l'eliminació de pT, indicant que una de les posicions de coordinació del platí està ocupada per la A (molt probablement pel N7, que és la posició més reactiva d'aquesta nucleobase, tot i que el N1 també pot metal·lar-se).² L'assaig amb la 5'-exonucleasa no va ser conclouent per a l'adducte monofuncional (com també ja havia passat per a l'adducte monofuncional amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTCT}$), que es podria relacionar amb una possible labilitat d'aquest producte en les condicions de la reacció enzimàtica. En el cas dels adductes bifuncionals **IA1** i **IA2**, amb la 5'-exonucleasa es va observar un comportament similar a l'obtingut amb els adductes amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTCT}$: es va detectar la massa corresponent a l'adducte sense digerir però també la massa que correspondria al trencament d'un enllaç fosfodièster intern del cicle (guany d'una molècula

d'aigua) i posterior eliminació d'una Tp (Figura 2.46). Aquests resultats suggereixen que el platí es coordina a X¹.

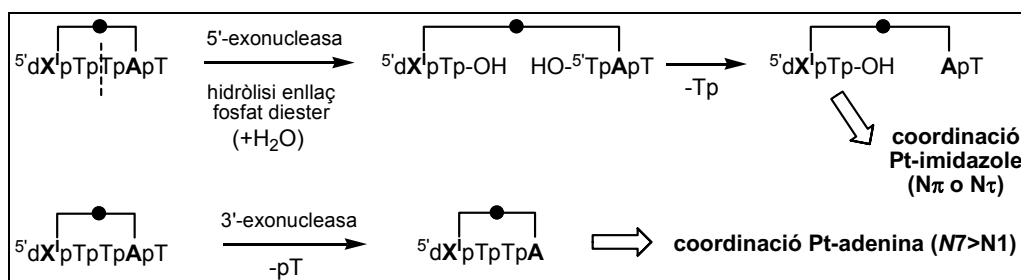


Figura 2.46. Esquema dels resultats obtinguts de digestió enzimàtica per als adductes bifuncionals de transplatí amb 5'dX¹TTAT.

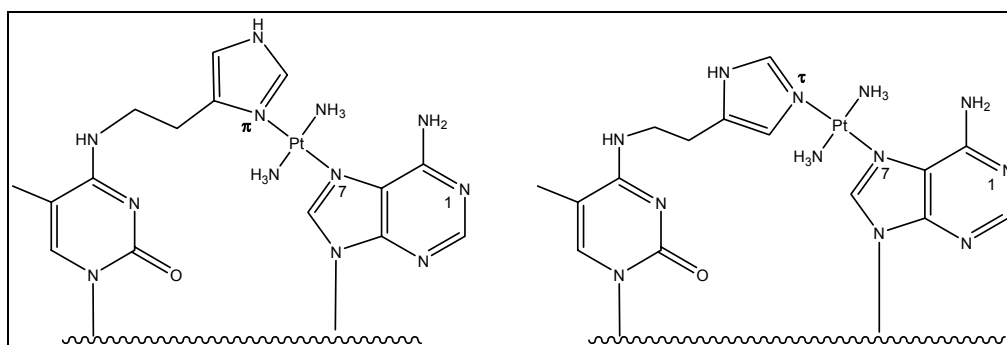


Figura 2.47. Estructura probable dels adductes bifuncionals formats en la reacció del transplatí amb 5'dX¹TTAT, amb coordinació del metall a cadascun dels nitrògens imidazòlics de X¹ i al N7 de l'adenina.

2.4.4 Reacció del transplatí amb 5'dX¹TTGT

La reacció de complexació amb 5'dX¹TTGT també es va realitzar a dos pH diferents, per tal d'establir l'efecte d'aquest paràmetre en la reactivitat i en la proporció entre els diferents adductes.

En aigua, a pH lleugerament àcid (5.3-5.1), ràpidament es va platinar l'oligonucleòtid ($t_{1/2} < 2$ h), de manera que a temps curts majoritàriament es formà l'adducte monofuncional per coordinació al N7 de la guanina (**IGmonof**), tot i que ja es detectava la presència de tres adductes bifuncionals de t_R 10.4 min (**IG1**), 11.5 min (**IG2**) i 12.6 min (**IG3**). Cal destacar que a les 5 h ja s'havia consumit tot el producte de partida, de manera que aquest oligonucleòtid es va mostrar molt més reactiu que els seus anàlegs amb C i A. En el transcurs del temps, la proporció dels adductes bifuncionals **IG2** i **IG3** va anar augmentant, alhora que el de t_R més baix (**IG1**) va anar desapareixent, tot i ser el majoritari a temps curts. Als 16 dies, es va arribar a una situació estacionària on només es trobaren els adductes bifuncionals **IG2** i **IG3** en una proporció relativa 53:47.

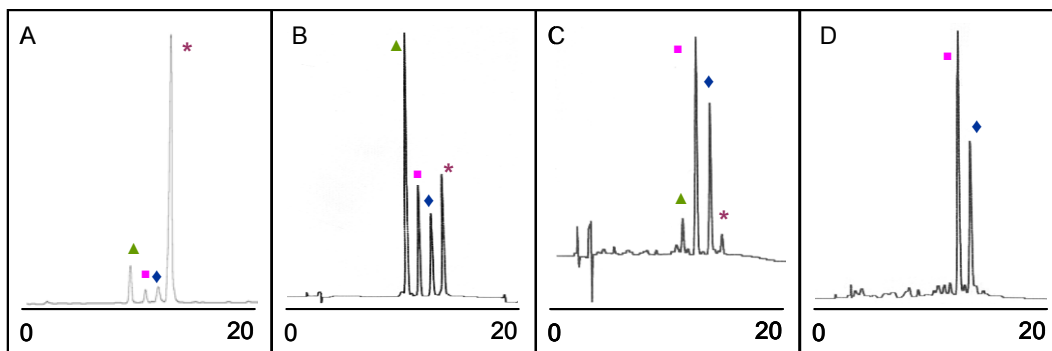


Figura 2.48. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $^5dX^1TTGT$ i transplatí a les 5 h (A), 30 h (B), 12 dies (C) i 16 dies (D).

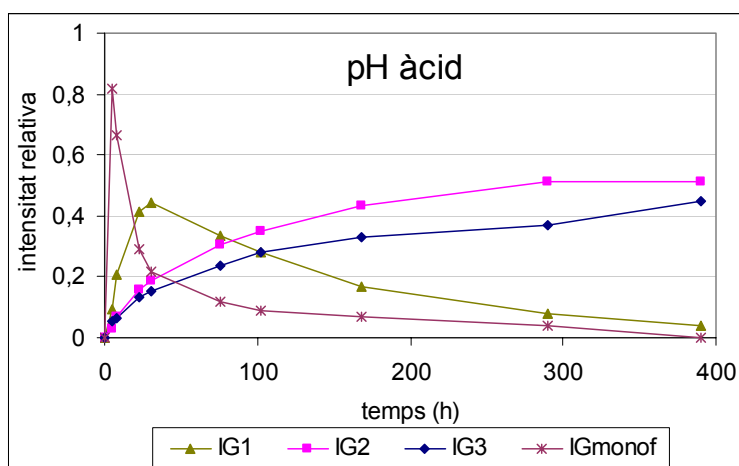


Figura 2.49. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $^5dX^1TTGT$ i transplatí a pH lleugerament àcid.

Tant els tres adductes bifuncionals detectats al llarg de la reacció (**IG1**, **IG2** i **IG3**) com l'adducte monofuncional (**IGmonof**) es van aïllar per HPLC i es comprovà la seva estabilitat després de 24 h en solució aquosa a temperatura ambient. Així, es va procedir a la caracterització dels adductes mitjançant digestions enzimàtiques amb una 3' i una 5'-exonucleasa. En el cas de **IGmonof** ($^5dX^1TTGT-Pt(NH_3)_2Cl$), la 3'-exonucleasa només va digerir una pT, de manera que la coordinació del metall té lloc al N7 de la guanina. Tal i com va passar amb els adductes monofuncionals dels oligonucleòtids anteriors, $^5dX^1TTCT$ i $^5dX^1TTAT$, l'anàlisi per EM MALDI-TOF del cru de digestió amb la 5'-exonucleasa no va mostrar cap massa, degut probablement a la poca estabilitat dels monoadductes en el medi de reacció enzimàtica. Respecte als adductes bifuncionals, tots ells van donar resultats enzimàtics similars: amb la 3'-exonucleasa es va observar la digestió d'una pT, mentre que amb la 5'-exonucleasa a temps llargs s'obtingué la "típica" eliminació d'una Tp, amb un increment de massa de 18 unitats, que s'explicaria per la hidròlisi prèvia d'un enllaç fosfodiester dins del cicle i posterior pèrdua d'una unitat d'àcid 3'-timidílic (Tp, veure Figura 2.50). De fet, però, per a **IG2** i **IG3** també es va observar a temps

llargs una reacció anòmala similar amb la 3'-exonucleasa. Això implicaria que, com en la reacció amb la 5'-exonucleasa, la 3'-exonucleasa actua com a endonucleasa, obrint el cicle i a continuació eliminant un 3'-nucleòtid a partir de l'hidroxil 5' lliure generat. Aquest tipus de reacció no s'havia observat en cap digestió amb la 3'-exonucleasa dels anteriors adductes amb els altres oligonucleòtids model. Tot i així, està descrit que les 3'-exonucleases comercials poden presentar traces d'altres enzims presents en el verí de serp, de manera que no és descartable una possible activitat endonucleasa deguda a una impuresa del producte. D'altra banda, també s'ha descrit que les 3'-exonucleases podrien presentar una capacitat intrínseca d'endonucleasa, que estaria afavorida a temps llargs de reacció.²⁹

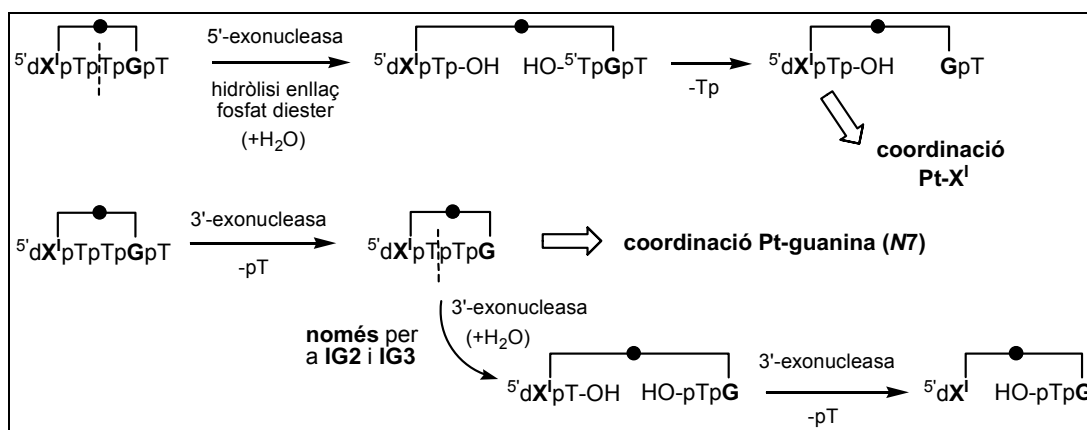


Figura 2.50. Esquema dels resultats obtinguts de digestió enzimàtica per als adductes bifuncionals de transplatí amb $5'dX^1TTGT$.

Així, doncs, es pot concloure que els tres adductes bifuncionals presenten un mateix patró de coordinació $5'dX^1TTGT-Pt(NH_3)_2$. Tenint en compte que a temps llargs els adductes majoritaris són **IG2** i **IG3**, el més probable és que en aquests dos adductes el metall es trobi coordinant un dels dos nitrògens imidazòlics i el **N7** de la guanina. Pel que fa a **IG1**, aquest podria resultar de la coordinació del metall al **N3** de la nucleobase modificada, pel fet que a pH lleugerament àcid l'anell d'imidazole es troba parcialment protonat (veure Figura 2.54 al final d'aquest apartat).

A pH lleugerament bàsic (8.2-7.1), la cinètica va ser lleugerament més lenta i el producte de partida va anar decreixent al llarg del temps, determinant un $t_{1/2} \sim 14$ h a $37^\circ C$. A diferència de les reaccions de platinació dels oligonucleòtids $5'dX^1TTCT$ i $5'dX^1TTAT$ a pH bàsic, en aquest cas sí que es va formar a temps curts l'adducte monofuncional (**IGmonof**), tot i que a percentatges molt més baixos que a pH lleugerament àcid. Tant a partir d'aquest monoadducte com a partir de l'oligonucleòtid $5'dX^1TTGT$, es van anar formant amb el temps els mateixos tres adductes bifuncionals que a pH lleugerament àcid. És interessant destacar que en aquest cas els adductes bifuncionals majoritaris van ser en tot moment **IG2** i **IG3**, mentre que a pH àcid **IG1** va

ser el majoritari a temps curts. A la situació estacionària, es va arribar a una proporció entre **IG2** i **IG3** 63:37, semblant a l'obtinguda en la reacció a pH més àcid a la fi de la reacció.

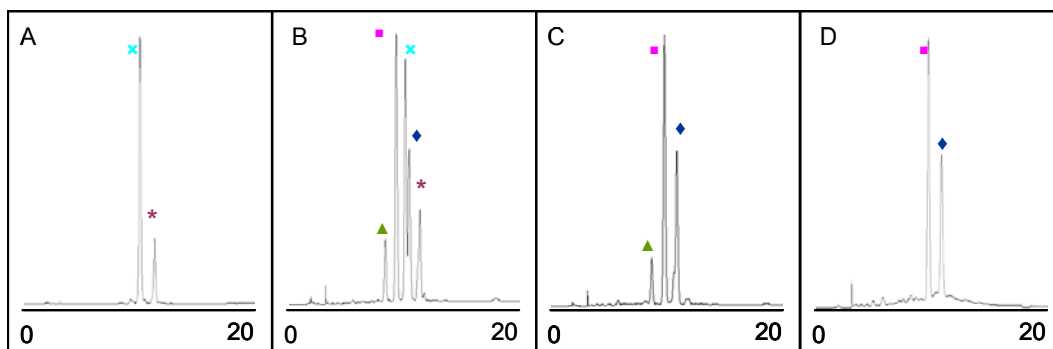


Figura 2.51. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'dX^lTTGT$ i transplatí a pH lleugerament bàsic, a les 3 h (A), 27 h (B), 4 dies (C) i 13 dies (D).

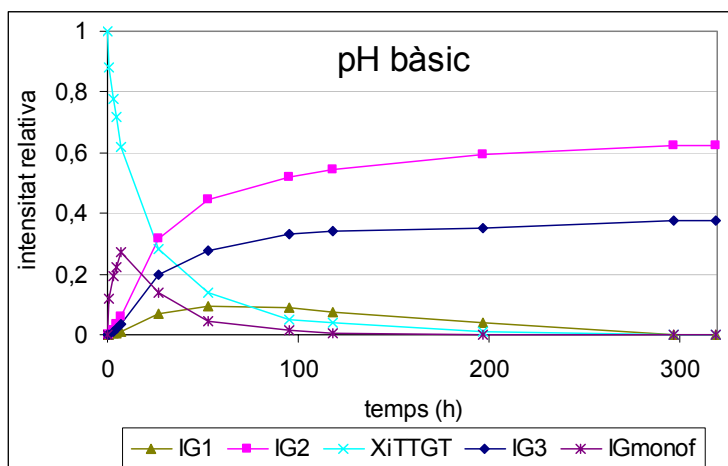


Figura 2.52. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció entre $5'dX^lTTGT$ i transplatí a pH lleugerament bàsic.

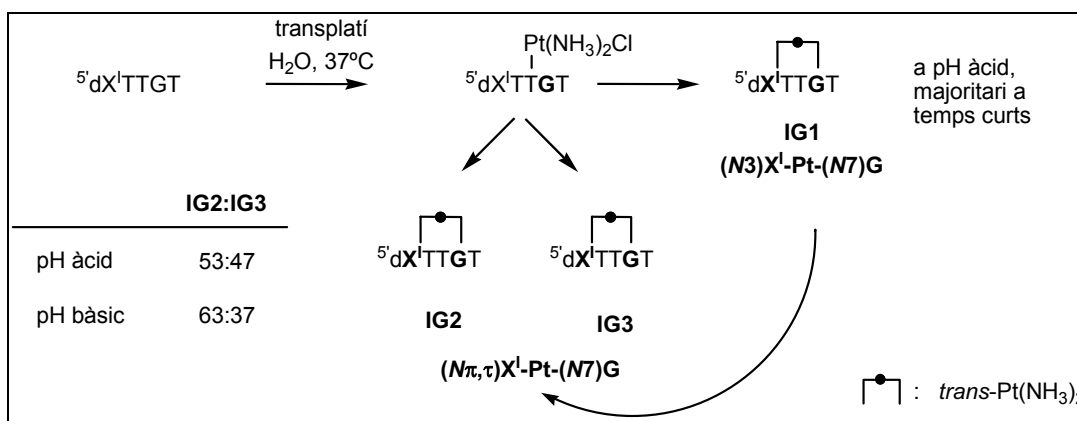


Figura 2.53. Resum de l'evolució de les reaccions de complexació amb $5'dX^lTTGT$ a pH diferents. S'indica la proporció dels adductes majoritaris formats.

El fet que a pH àcid es formi ràpidament i en una proporció important l'adducte **IG1**, mentre que a pH bàsic aquest es trobi sempre en menor proporció respecte a **IG2** i **IG3**, reforça la hipòtesi que aquest adducte podria correspondre a la coordinació del metall al N3 de X^l. Com ja s'ha comentat, a pH àcid l'anell d'imidazole està protonat i és molt menys nucleòfil. Tot i així, quan s'arriba a la situació estacionària, en ambdós pH només es detecten els adductes bifuncionals **IG2** i **IG3**, els quals deuen ser més estables termodinàmicament.

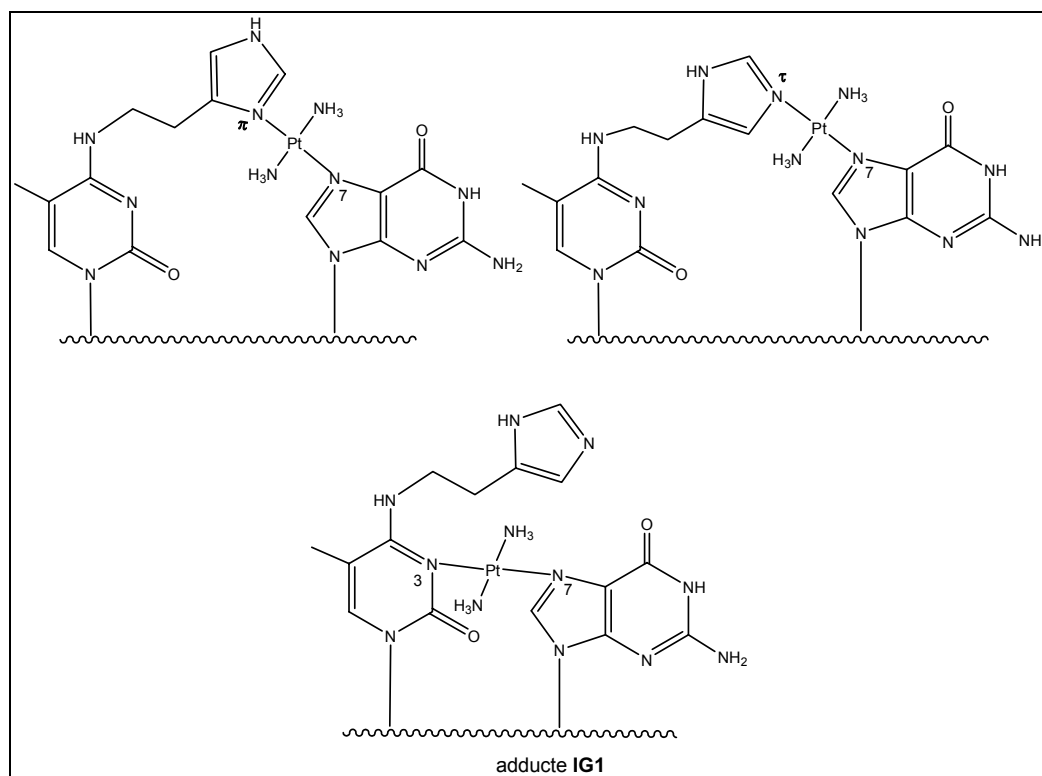


Figura 2.54. Estructures proposades pels tres adductes bifuncionals aïllats.

2.4.5 Principals conclusions dels experiments efectuats

- A pH àcid, en totes les reaccions amb oligonucleòtids $5'dX^lTTNT$ ($N \neq T$) es detecta la presència d'un adducte monofuncional, el qual té una vida mitjana relativament llarga, mentre que en els oligonucleòtids amb X^s no detecta aquest tipus d'adductes. En aquest cas, l'imidazole, majoritàriament protonat, no participa en la primera etapa de la reacció i el transplatí s'uneix d'entrada formant adductes monofuncionals a les posicions típiques de coordinació de les nucleobases (N7 de les purines A i G, N3 de la C). Aquests adductes monofuncionals, afavorits cinèticament, acaben evolucionant cap als adductes bifuncionals, termodinàmicament més estables. Amb $5'dX^lTTTT$ no hi ha reacció perquè no hi ha centres nucleòfils en la timina a pH àcid (i el N3 de X^l, igual que passava amb el de X^s, no sembla que sigui massa reactiu).

- A pH més bàsic, la cinètica de les reaccions és més lenta, pel fet que en aquatitzar-se el transplatí, el lligand aqua tendeix a passar més favorablement a la forma hidroxó, que és menys làbil i per tant menys reactiva. Per aquest motiu, els adductes que es formen al llarg del temps tendeixen a ser ja els més estables termodinàmicament. A pH bàsic, l'anell d'imidazole es troba majoritàriament en estat neutre i és, per tant, més nucleòfil; com que la reacció és més lenta perquè el transplatí està menys activat, es formen directament els adductes bifuncionals.
- Per als tres oligonucleòtids $5'dX^lTTNT$ (N = A, C, G) es detecten com a productes finals de la reacció dos adductes bifuncionals en els quals el metall està coordinat a la C (N3), A (N7) o G (N7) i als $N\pi$ i $N\tau$ de l'imidazole. Aquests productes són força estables.
- Per a $5'dX^lTTGT$, a temps curts de reacció es detecta un adducte que, d'acord amb els assaigs enzimàtics, podria implicar la coordinació del N7 de la guanina i el N3 del nucleòsid modificat X^l.
- Pel que fa a la caracterització dels adductes bifuncionals mitjançant digestions enzimàtiques, cal dir que en totes les reaccions amb la 5'-exonucleasa es detecta que l'enzim actua com a endonucleasa, hidrolitzant l'enllaç entre les dues timines adjacents i eliminant, a continuació, la que presenta l'extrem 5' lliure. Tan sols en el tractament dels adductes finals aïllats de la reacció de $5'dX^lTTGT$ amb transplatí, la 3'-exonucleasa presenta un comportament similar.

Tot seguit, es mostren els resultats de la diferent reactivitat dels oligonucleòtids en estudi, així com la proporció dels adductes majoritaris a la fi de les reaccions.

	$5'dX^lTTCT$		$5'dX^lTTAT$		$5'dX^lTTGT$	
	pH àcid	pH bàsic	pH àcid	pH bàsic	pH àcid	pH bàsic
$t_{1/2}$ (37 °C)	~ 20 h	~ 120 h	~ 5 h	~ 110 h	< 2 h	~ 14 h
proporció adductes bifuncionals finals	36:64	41:59	75:25	76:24	53:47	63:37

Taula 2.2. Resum de la reactivitat i proporció entre els dos adductes majoritaris. Per a cada oligonucleòtid, es manté el mateix ordre en la relació entre els adductes formats.

2.5 ESTUDIS DE PLATINACIÓ AMB OLIGONUCLEÒTIDS QUE INCORPOREN X^S I X^I

Un cop estudiat per separat l'efecte dels dos nucleòsids modificats en la reactivitat dels oligonucleòtids envers el transplatí, es va plantejar l'estudi de la reacció de complexació amb un oligonucleòtid que introduís les dues modificacions a l'extrem 5' d'una seqüència amb quatre timines (que, en principi, són les nucleobases menys reactives). Per tal de determinar si hi ha diferències en funció de l'ordre en què es posen les dues nucleobases modificades a l'extrem 5', es van realitzar els estudis de complexació amb ^{5'}dX^IX^STTTT i ^{5'}dX^SX^ITTTT.

Vistos els resultats anteriors, hom podia preveure una ràpida reacció amb el grup tioèter, per evolucionar donant lloc als possibles adductes bifuncionals. Estava per veure quina seria l'altra nucleobase coordinada al metall, ja que s'havia observat que en presència de X^S fins i tot el N3 de les timines podia desprotonar-se i coordinar el platí(II). D'altra banda, es volia avaluar l'estabilitat dels adductes resultants i si té lloc algun procés de migració del metall a una posició més estable termodinàmicament.

2.5.1 Reacció del transplatí amb ^{5'}dX^IX^STTTT

Es van realitzar dos assajos de complexació. En un primer assaig, la reacció es va portar a terme amb 1 eq de transplatí, a 37 °C, i una concentració 0.05 mM d'oligonucleòtid. L'anàlisi per HPLC en fase reversa (Figura 2.55) va mostrar la transformació de l'oligonucleòtid de partida ^{5'}dX^IX^STTTT (t_R : 17.9 min) en un nou producte de t_R 11.9 min. La reacció va ser molt ràpida i a les 28 h ja no quedava producte de partida i només es detectava el nou producte (92 %). En un segon experiment, es van emprar 2 eq de transplatí i una concentració 0.025 mM d'oligonucleòtid, obtenint un pH que va fluctuar entre 3.8-3.9. Com es pot comprovar (Figura 2.55), la reacció ja era pràcticament completa a les 7 h ($t_{1/2} < 3.5$ h a 37 °C), observant-se la presència del mateix producte de t_R 11.9 min.

L'adducte majoritari es va aïllar per HPLC i caracteritzar mitjançant EM MALDI-TOF, assajos enzimàtics i tractament amb H₂O₂. En aquest cas, amb la 3'-exonucleasa va ser possible la detecció de la massa corresponent a la pèrdua de les quatre timines, tot i que no sempre va ser fàcil reproduir aquest resultat, per desplatiniació de la mostra en les condicions d'anàlisi. Tot i així, es va corroborar la coordinació del platí a X^S per tractament amb H₂O₂, ja que l'adducte es va mostrar estable, concloent que un dels punts de coordinació és el tioèter. D'altra banda, el tractament amb la 5'-exonucleasa va deixar el producte inalterat, confirmant que l'altra posició de coordinació al metall està ocupada per X^I. A la Figura 2.59 s'esquemmatitzen els resultats obtinguts.

Tot i que en aquesta reacció només es va detectar un únic pic cromatogràfic molt majoritari, és probable que contingués els dos possibles isòmers constitucionals per coordinació als dos

nitrògens imidazòlics. En les condicions cromatogràfiques emprades, ambdós isòmers no se separarien (veure més endavant).

Un aspecte important a destacar és que aquest adducte, tot i presentar una unió Pt-S, va romandre estable després de 24 h en solució aquosa a temperatura ambient (veure Figura 2.55-F).

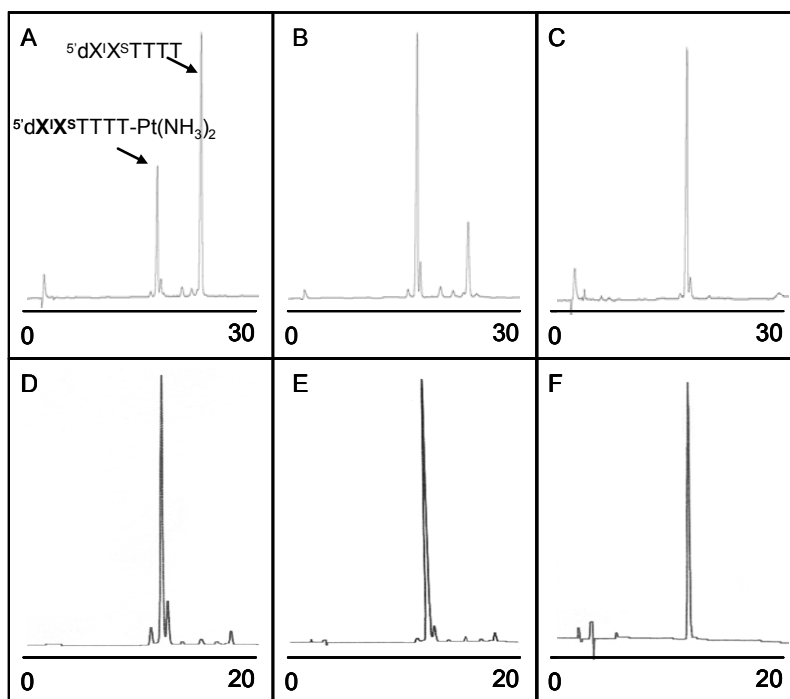


Figura 2.55. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'\text{dX}^1\text{X}^{\text{S}}\text{TTTT}$ (0.05 mM) i 1 eq de transplatí als 30 min (A), 8 h (B) i 28 h (C), i a concentració 0.025 mM d'oligonucleòtid i 2 eq de transplatí a les 7 h (D) i 24 h (E). F correspon al cromatograma de $5'\text{dX}^1\text{X}^{\text{S}}\text{TTTT-Pt}(\text{NH}_3)_2$ després de 24 h en solució aquosa i a temperatura ambient.

2.5.2 Reacció del transplatí amb $5'\text{dX}^{\text{S}}\text{X}^{\text{I}}\text{TTTT}$

La reacció es va portar a terme amb 2 eq de transplatí i una concentració d'oligonucleòtid 0.025 mM ($t_{1/2} \sim 1$ h a 37°C). Sorprenentment, en aquest cas la reacció va ser més complexa, i a temps curts (2 h), es detectaren majoritàriament dos adductes bifuncionals de t_{R} 10.7 min (**SI1**) i 12.2 min (**SI2**), juntament amb tres adductes bifuncionals minoritaris de t_{R} més baixos (que van arribar a suposar el 24 % dels adductes platinats, però que no van ser caracteritzats). Els adductes minoritaris es van transformar en **SI1** i **SI2**, així com l'oligonucleòtid de partida, i a la fi de la reacció (48 h) la relació entre els adductes majoritaris **SI1/SI2** va ser de 49:51.

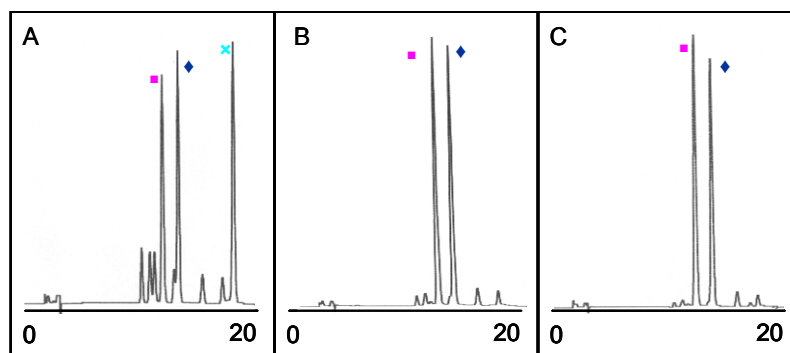


Figura 2.56. Perfils de HPLC corresponents a la reacció entre $5'dX^S X^l TTTT$ i transplatí a concentració 0.025 mM a les 2 h (A), 22 h (B) i 48 h (C).

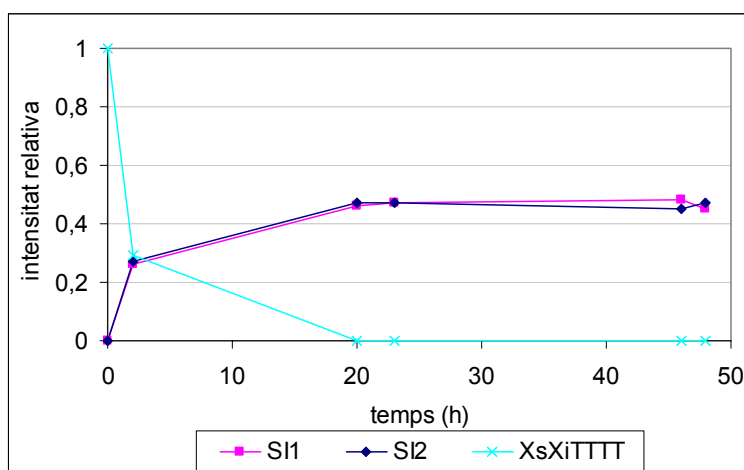


Figura 2.57. Gràfic que mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció amb 2 eq de transplatí i $5'dX^S X^l TTTT$ a una concentració 0.025 mM.

Els adductes majoritaris es van aïllar per HPLC i es van mostrar estables després d'estar 24 h en solució aquosa a temperatura ambient (Figura 2.58), per la qual cosa es va procedir a la seva caracterització. En ambdós adductes, tant per tractament amb H_2O_2 com per digestió amb la 5'-exonucleasa no va variar la massa de l'adducte, la qual cosa confirma la coordinació del platí(II) al sofre. D'altra banda, en la reacció amb la 3'-exonucleasa va ser difícil detectar cap massa, tot i que, en el cas de **SI2**, a temps curts es van poder observar les masses corresponents a la pèrdua de pTpTpT i de pTpTpTpT. Cal recordar, com ja s'ha comentat a l'apartat anterior, la dificultat d'observar per a l'adducte amb $5'dX^l X^S TTTT$ la massa corresponent a la pèrdua de les quatre timines, tot i que no és fàcil trobar-hi una explicació. En principi, doncs, tant l'adducte **SI1** com **SI2** correspondrien a la coordinació del metall al tioèter i a cadascun dels nitrògens imidazòlics de X^l (veure Figura 2.60).

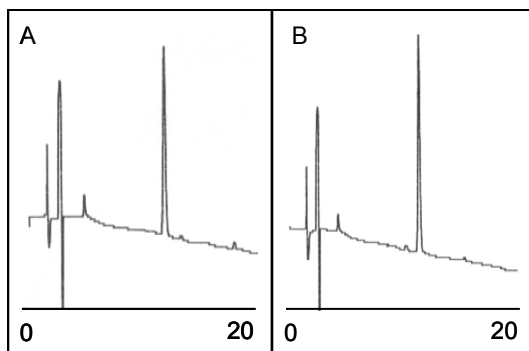


Figura 2.58. Perfils de HPLC dels adductes platinats majoritaris, després de 24 h en solució aquosa i a temperatura ambient: **SI1** (A) i **SI2** (B).

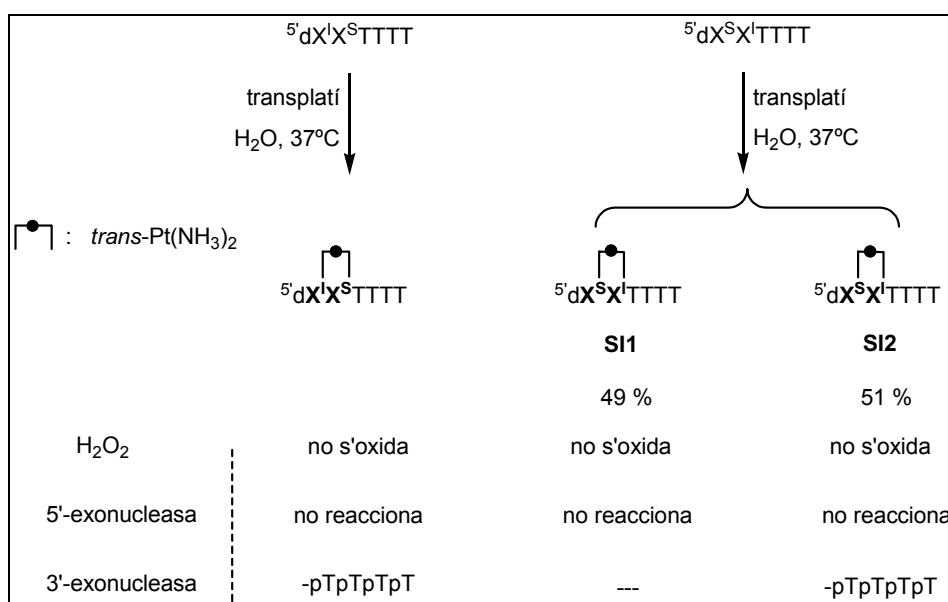


Figura 2.59. Resum dels resultats de les reaccions de complexació amb $5'dX^lX^sTTTT$ i $5'dX^sX^lTTTT$, i dels estudis de caracterització dels adductes majoritaris.

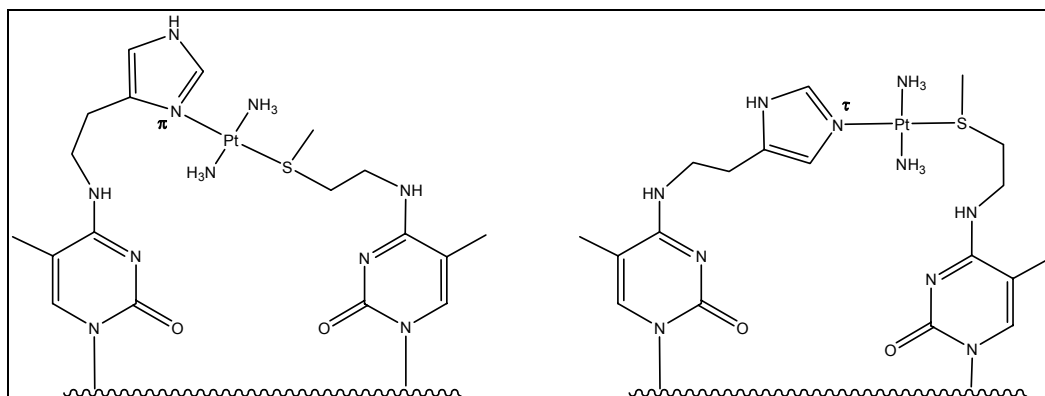


Figura 2.60. Estructures dels adductes resultants de la coordinació del metall a cadascun dels nitrògens imidazòlics de X^l i al sofre de X^s .

2.5.3 Conclusions d'aquests assajos

En el seu conjunt, doncs, les dades de caracterització dels adductes formats a partir dels dos oligonucleòtids, $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{TTTT}$ i $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{X}^{\text{L}}\text{TTTT}$, indiquen que en ambdós casos es dona la coordinació del platí al grup tioèter i als nitrògens del grup imidazole (veure l'esquema amb els resultats de caracterització a la Figura 2.59).

D'altra banda, de la mateixa manera que els adductes **SI1** i **SI2** es poden assignar als productes de coordinació del platí al tioèter de X^{S} i a cadascun dels nitrògens de l'imidazole de X^{L} , és força probable que per a la reacció amb $^5\text{dX}^{\text{L}}\text{X}^{\text{S}}\text{TTTT}$, tot i només detectar-se un únic pic cromatogràfic, aquest correspongui a una barreja d'ambdós isòmers constitucionals, que no s'haurien pogut separar.

A nivell de reactivitat, és obvi que la presència del nucleòsid modificat amb el grup tioèter accelera les reaccions de complexació amb transplatí (cal recordar, per exemple, que l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{L}}\text{TTTT}$ no es va platinar). Molt probablement, com ja s'ha proposat, en una primera etapa el transplatí coordina el tioèter però l'adducte monofuncional ràpidament reacciona amb l'imidazole (tot i estar protonat al pH de les reaccions) per donar un quelat més estable, ja que el clorur està labilitzat per l'efecte *trans*. En aquest cas, els adductes obtinguts són relativament estables, més que qualsevol dels adductes on el platí coordina el sofre i una nucleobase diferent de timina. Aquest resultat és una mica sorprenent, perquè per efecte *trans*, la unió Pt-N (imidazole) estaria favorablement labilitzada, però indica que les unions S-Pt-imidazole són molt menys làbils que les unions S-Pt-A/C.

El fet que per a $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{X}^{\text{L}}\text{TTTT}$ es detectin altres adductes a temps curts, mentre que no per a $^5\text{dX}^{\text{L}}\text{X}^{\text{S}}\text{TTTT}$, podria estar relacionat amb la preferència del transplatí per formar quelats coordinant X^{S} i una posició nitrogenada situada cap a l'extrem 5', més que no pas 3' (resultats observats en la platinació de $^5\text{dTTX}^{\text{S}}\text{TT}$, vegeu apartat 2.3.3).

La reacció de platinació dels oligonucleòtids $^5\text{dXXTTTT}$ és, doncs, ràpida i força neta. Per tant, podria ser interessant, de cara a la teràpia antisentit, preparar oligonucleòtids que tinguin les dues modificacions en un extrem de la cadena. Caldrà veure si, en presència de transplatí, el grup tioèter dirigeix la platinació per formar els adductes bifuncionals coordinats a X^{S} i X^{L} , i si és possible la migració del metall des del tioèter cap a la cadena complementària (que seria la diana terapèutica) per formar un entrecreuament que donaria lloc a una major estabilitat del dúplex. Els resultats d'aquests estudis es descriuen al capítol 3 d'aquesta Memòria.

2.6 BIBLIOGRAFIA

- ¹ Deubel, D.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5834-5842.
- ² a) Sóvágó, I.; Kiss, A.; Lippert, B. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 489-494. b) Baik, M-H.; Friesner, R.A.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14082-14092.
- ³ Reedijk, J. *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *198-200*, 873-881.
- ⁴ a) Liu, Y.; Pacifico, C.; Natile, G.; Sletten, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1226-1228. b) Liu, Y.; Vinje, J.; Pacifico, C.; Natile, G.; Sletten, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12854-12862.
- ⁵ Pearson, R.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533-3539.
- ⁶ van Boom, S.S.G.E.; Chen, B.W.; Teuben, J.M.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1450-1455.
- ⁷ a) Fröhling, C.D.W.; Sheldrick, W.S. *Chem. Commun.* **1997**, 1737-1738. b) Hahn, M.; Wolters, D.; Sheldrick, W.S.; Hulsbergen, F.B.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 412-420.
- ⁸ a) van Boom, S.S.G.E.; Reedijk, J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1397-1398. b) Barnham, K.J.; Djuran, M.I.; Murdoch, P.d.S.; Sadler, P.J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 721-722. c) Teuben, J-M.; van Boom, S.S.G.E.; Reedijk, J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 3979-3980. d) Vrana, O.; Brabec, V. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10994-10999.
- ⁹ a) Beltrán, M.; Onoa, G.B.; Pedroso, E.; Moreno, V.; Grandas, A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 701-707. b) Marchán, V.; Moreno, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Chem Eur. J.* **2001**, *7*, 808-815. c) Marchán, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1-8.
- ¹⁰ Hindmarsh, K.; House, D.A.; Turnbull, M.M. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *257*, 11-18.
- ¹¹ Martin, R.B. *Cisplatin-Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Lippert, B., Ed., Zurich: Verlag Helvetica Chimica Acta, **1999**, pp. 183-205.
- ¹² Mikola, M.; Oksman, P.; Arpalahti, J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 3101-3104.
- ¹³ a) Arpalahti, J. *Met. Ions Biol. Syst.* **1996**, *32*, 379-395. b) Schmülling, M.; Lippert, B.; van Eldik, R. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 3276-3280.
- ¹⁴ Bursova, V.; Kasparkova, J.; Hofr, C.; Brabec, V. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1207-1214.
- ¹⁵ Bancroft, D.P.; Lepre, C.A.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6860-6871.
- ¹⁶ a) Basolo, F.; Pearson, R.G. *Prog. Inorg. Chem.* **1962**, *4*, 381-453. b) Cotton, F.A.; Wilkinson, G. *Advanced Inorganic Chemistry, 4th ed.*; Wiley: New York, **1980**, p 950.
- ¹⁷ Elding, L.I.; Groning, O. *Prog. Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 1872-1880.
- ¹⁸ Eastman, A.; Barry, M.A. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3303-3307.
- ¹⁹ Chu, B.C.F.; Orgel, L.E. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 5163-5171.
- ²⁰ a) Krizanovic, O.; Sabat, M.; Beyerle-Pfnür, R.; Lippert, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5538-5548. b) Schreiber, A.; Lüth, M.; Erxleben, A.; Fusch, E.C.; Lippert, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4124-4132.

- ²¹ Schmidt, K.S.; Filippov, D.V.; Meeuwenoord, N.J.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Lippert, B.; Reedijk, J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 375-376.
- ²² a) Barnham, K.J.; Djuran, M.I.; Murdoch, P.S.; Randford, J.D.; Sadler, P.J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1995**, 3721-3726. b) Chen, Y.; Guo, Z.; Murdoch, P.S.; Zang, E.; Sadler, P.J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 1503-1508. c) Fröhling, C.D.W.; Sheldrick, W.S. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 4411-4420. d) van Boom, S.S.G.E.; Chen, B.W.; Teuben, J.M.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1450-1455. e) Wolters, D.; Sheldrick, W.S. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 1121-1129. h) Teuben, J.M.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 463-468.
- ²³ Reeder, F.; Guo, Z.; Murdoch, P.S.; Corazza, A.; Hambley, T.W.; Berners-Price, S.J.; Chottard, J-C.; Sadler, P.J. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 370-382.
- ²⁴ Bernardi, A.; Bernardi, G. *The Enzymes* (3rd edn.), Boyer, P.D., Ed., Academic Press, New York, **1971**, vol. 4, pp. 329-336.
- ²⁵ a) Elmroth, S.K. C.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3633-3634. b) Elmroth, S.K. C.; Lippard, S.J. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 5234-5243. c) Kjellström, J.; Elmroth, S.K. C. *Chem. Commun.* **1997**, 1701-1702. d) Kjellström, J.; Elmroth, S.K. C. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 6193-6199. e) Kjellström, J.; Elmroth, S.K. C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 38-44.
- ²⁶ Sundberg, R.J.; Martin, R.B. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 471-517.
- ²⁷ a) Appleton, T.G.; Pesch, F.J.; Wienken, M.; Menzer, S.; Lippert, B. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4410-4419. b) Tsiveriotis, P.; Hadjiliadis, N.; Stavropoulos, G. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *261*, 83-92.
- ²⁸ Beltrán, M. *Tesi doctoral*; Universitat de Barcelona, **1999**.
- ²⁹ a) Razzel, W.E.; Khorana, H.G. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2114-2117. b) Setlow, R.B.; Carrier, W.L.; Bollum, F.J. *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *91*, 446-461.

3 REACCIONS D'ENTRECREUAMENT ENTRE OLIGONUCLEÒTIDS MODIFICATS I LA CORRESPONENT CADENA COMPLEMENTÀRIA

3.1 INTRODUCCIÓ

Un dels primers grups d'investigació en emprar compostos de platí(II) per a entrecruar les dues cadenes d'un dúplex de DNA és el de Vlassov i col·laboradors,¹ que al 1983 fa ús d'un compost heterobifuncional de platí per a realitzar la unió entre dues guanines de cada cadena (Figura 3.1). Primer es fa reaccionar una cadena amb una única guanina central amb l'agent heterobifuncional que conté dues funcions químiques diferents en reactivitat, de manera que un dels dos platins es coordina al N7 de la G i posteriorment té lloc l'entrecreuament amb la cadena complementària ³dAGGCGG, majoritàriament per la G disposada a l'extrem 5'. En aquest experiment s'observa regioselectivitat en la platinació de la segona cadena, alhora que no es detecta platinació d'una segona cadena que no sigui complementària, la qual cosa ja posa de manifest la importància de la complementarietat en aquest tipus de reaccions. Els productes obtinguts no haurien de poder ser reparats *in vivo*, de manera que s'apunta una possible aplicació biomèdica per a aquest tipus de reaccions, ja que seria possible danyar determinades seqüències del DNA o RNA (dianes biològiques).

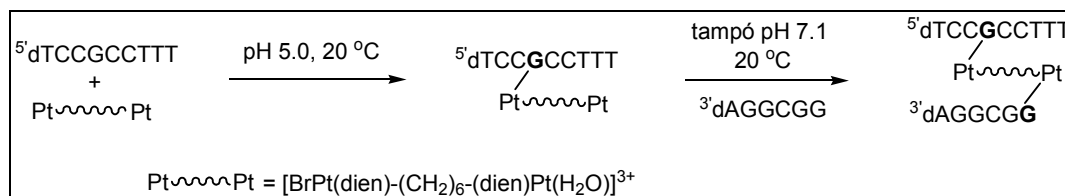


Figura 3.1. Entrecreuament mitjançant un compost heterobifuncional de platí(II).

A mitjans dels anys 70, Strothkamp i Lippard² són els primers en descriure la unió específica de complexos de Pt(II) a oligonucleòtids amb un grup fòsforotioat. Posteriorment, Chu i Orgel³ introdueixen un grup fòsforotioat en la cadena antisentit per a les reaccions d'entrecreuament. Aprofitant l'elevada afinitat dels compostos de platí(II) pel sofre, fan reaccionar amb cisplatí,

transplatí i K_2PtCl_4 , oligonucleòtids (16mers) amb un grup fòsforotioat a l'extrem 5' en presència d'una cadena més llarga (DNA o RNA, 37mers) amb un tram complementari a l'oligonucleòtid modificat. En tots els assajos, el compost platinat s'addiciona en el medi de reacció un cop ha tingut lloc la hibridació entre les dues cadenes (Figura 3.2).

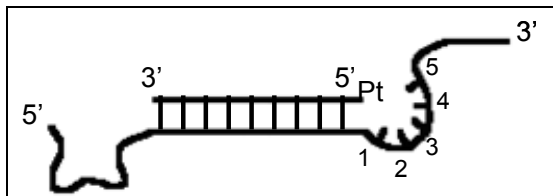


Figura 3.2. Esquema de l'estructura de l'oligonucleòtid antisentit amb un grup fòsforotioat a l'extrem 5', hibridat amb un mottle de major llargària, amb els residus òptims de l'extrem 3' no aparellats per a una coordinació a l'àtom de platí.

Un cop té lloc la hibridació, tal i com es mostra a la Figura 3.2, i quan els residus 2-5 de l'extrem 3' de la cadena llarga es troben propers a l'espai a l'àtom metàl·lic, es produeix l'entrecruament, majoritàriament amb alguna d'aquestes nucleobases, tot i que els resultats depenen tant de la seqüència d'aquesta regió com de la naturalesa del compost de platí. En la majoria de casos, transplatí i K_2PtCl_4 donen lloc a entrecruaments amb una eficiència comparable, mentre que amb cisplatí tenen lloc en menor grau. Pel que fa a l'afinitat pels residus 2-5 de l'extrem 3' de la cadena llarga complementària, en general s'observa una preferència per la coordinació a G i a A, i en menor grau a C. En absència d'aquestes nucleobases, és a dir, en seqüències amb timines, amb transplatí es produeix la coordinació a T, mentre que no s'observa entrecruament amb cisplatí o K_2PtCl_4 . Un cas similar s'ha comentat en el capítol 2, en les reaccions dels oligonucleòtids $5'dX^S TTTT$ i $5'dTTX^S TT$ amb transplatí, que donen lloc a adductes bifuncionals per coordinació del metall al sofre (en el nostre cas, d'un tioèter) i a diferents timines de la mateixa cadena. Respecte a la seqüència de l'oligonucleòtid antisentit, cal dir que Chu i Orgel treballen majoritàriament amb cadenes que no contenen cap guanina, o bé amb només una d'aquestes nucleobases situada a l'extrem 5', a la posició adjacent, o com a tercera o sisena nucleobase. En el cas de la seqüència amb una G en posició 2, veïna a l'última nucleobase de l'extrem 5' que és la que conté el grup fòsforotioat, detecten una reacció "suïcida" entre el fòsforotioat i aquesta G de la mateixa cadena, que impedeix l'entrecruament.

En el cas d'emprar un grup fòsforotioat intern (enmig de la seqüència antisentit), aquest grup funcional es troba molt lluny de les nucleobases de la cadena complementària, de manera que l'entrecruament no està afavorit. La reacció no té lloc ni amb cisplatí ni amb K_2PtCl_4 , mentre que amb transplatí sí.

Un cop fets aquests primers estudis, Orgel i col·laboradors han emprat compostos binuclears de platí que donen lloc a entrecreuaments en major extensió que el transplatí.⁴ Sembla ser que la major flexibilitat del complex biplatinat permet la interacció amb residus del "motlle" més allunyats del grup fòsforotioat de l'oligonucleòtid antisentit. És important destacar que amb aquests compostos binuclears s'obtenen barreges d'adductes d'entrecreuament i en general té lloc la coordinació a dues G del motlle que estan aparellades amb la cadena antisentit (per reacció amb transplatí només s'observa platinació a residus no aparellats). D'altra banda, quan hi ha purines a la cadena antisentit disminueix la formació de productes d'entrecreuament, degut a reaccions intracadena no desitjades de tipus "suïcida".

Poc després, el grup de recerca de Leng i col·laboradors⁵ descobreix que els adductes (G1,G3)-intracadena amb transplatí donen lloc a una reacció d'isomerització, en presència de la corresponent cadena complementària, per formar un entrecreuament entre les dues cadenes (Figura 3.3). La cinètica de la reorganització que té lloc depèn lleugerament de les bases que envolten l'adducte intracadena i de la naturalesa (púrica o pirimidínica) de la base complementària a la nucleobase que es troba entre les dues guanines, de manera que el $t_{1/2}$ per a la desaparició de l'adducte intracadena varia entre 3 i 16 h. La unió té lloc específicament per la G de l'extrem 5' i la C complementària, mostrant una major especificitat respecte als resultats de Chu i Orgel. La velocitat de la isomerització de l'enllaç és independent de la naturalesa de la sal en solució (NaCl o NaClO₄); és a dir, no hi ha passos intermedis en els que participi l'ió clorur. Per tant, proposen com a mecanisme l'atac nucleofílic a Pt-3'G per part de la C complementària a la 5'G, la qual cosa implica una distorsió de la doble hèlix per permetre una bona orientació i localització de la citosina.⁶

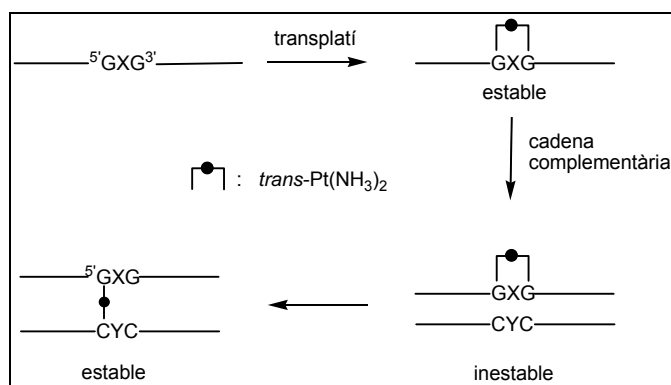


Figura 3.3. Formació d'un entrecreuament amb una unió del tipus $trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ entre dues cadenes oligonucleotídiques, a partir d'un adducte del tipus (G1,G3)-intracadena.

A partir d'aquests estudis preliminars, han realitzat nombrosos experiments per tal d'optimitzar la reacció d'isomerització.⁷ Treballant amb oligodesoxiribonucleòtids platinats, els autors observen que si la diana (cadena complementària) és un oligoribonucleòtid en comptes d'un

oligodesoxiribonucleòtid, disminueix considerablement la velocitat de migració. D'altra banda, la substitució del triplet CN'C en la cadena ribonucleòtida pel doblet 5'UA o 5'CA dóna lloc a un gran increment de la velocitat. En aquests casos, la migració és completa en pocs minuts i l'entrecreuament s'estableix entre 5'G i la A en posició oposada (pel N1). No té lloc reacció si en comptes d'un d'aquests doblets s'introdueix 5'AU o 5'AC.⁸ També s'observa una millora en la velocitat de migració quan l'oligonucleòtid antisentit platinat es troba en forma de 2'-O-Me-RNA. El que conclouen de tots aquests resultats és que la reacció d'isomerització depèn de manera crucial de la correcta disposició de les dues espècies reactives, estant afavorida per la tensió que genera el macrocicle platinat dins de la doble hèlix. Sembla ser que no es detecta entrecreuament quan l'adducte 1,3-intracadena es troba a l'extrem 3' o 5' de la cadena.

Aquesta nova metodologia, que permet entrecreuar dues cadenes oligonucleotídiques de manera específica i relativament irreversible, s'ha pogut emprar *in vitro* en diferents sistemes així com en cèl·lules, donant lloc a un bloqueig estèric de la maquinària de traducció que obre les portes a una nova eina per tal de modular l'expressió gènica.^{6,8} Tot i així, aquesta metodologia presenta greus limitacions de cara a una possible aplicació universal en teràpia, com és el fet que la cadena antisentit platinada només pot presentar una única unitat GXG al llarg de la seqüència. D'altra banda, la síntesi de l'adducte (G1,G3)-intracadena és complexa i requereix, en certs casos, de més d'una etapa de purificació, la qual cosa implica rendiments molt baixos. A més, la presència d'altres purines a la cadena antisentit a platinar dificulta o fins i tot fa inviable l'obtenció de l'adducte desitjat. Cal dir que en algun cas s'ha aplicat a una seqüència rica en adenines, tot i que no es donen gaires detalls d'aquesta primera etapa de la reacció.⁹

És interessant destacar que l'adducte (G1,G3)-intracadena és en general estable quan es troba en forma de cadena senzilla.* Tanmateix, en presència de la seva cadena complementària, té lloc la hibridació i es desencadena la reacció d'isomerització per formar l'entrecreuament entre ambdues cadenes. Per tant, l'adducte (G1,G3)-intracadena és en general cinèticament inert mentre no hi ha hibridació amb la possible diana terapèutica, essent un fet molt interessant per a una possible aplicació en teràpia (ja que no interaccionaria amb altres possibles nucleòfils del medi, com serien glutatí o proteïnes, els quals sí que poden inactivar adductes de tipus monofuncional).

Una altra alternativa per entrecreuar un oligonucleòtid platinat i la seva corresponent cadena complementària ha estat desenvolupada per Lippert i col·laboradors,¹⁰ partint d'un oligonucleòtid amb una única guanina a la seqüència antisentit. En aquest cas, es genera

* Només s'ha descrit un cas en què aquest adducte no és estable i té lloc una lenta reacció d'isomerització amb una citosina situada en 5' al fragment GXG, de manera que el platí passa a estar coordinat a la C i a la G en 3'.

l'adducte monofuncional per coordinació del transplatí al N7 de la guanina i a continuació, en hibridar-se a la cadena complementària, té lloc l'entrecreuament, establint-se un nou enllaç amb una G en posició oposada. A partir dels seus resultats estableixen que cal una llargària mínima per tal que es doni el reconeixement de la cadena complementària¹¹ i que és més recomanable la introducció de l'àtom de platí a un extrem de la seqüència antisentit, sobretot en cadenes relativament curtes, per tal d'interferir el mínim en el procés de reconeixement molecular.

Cal remarcar la limitació que presenta aquesta metodologia pel fet que només pot haver-hi una guanina a la cadena antisentit, per tal de minimitzar els possibles problemes de no regioselectivitat i de multiplatinació. A més a més, la reacció es realitza a un pH suficientment àcid per desafavorir la platinació de les citosines. Com que aquestes condicions poden afectar a la unió glicosídica a les purines, intenten evitar la seva presència en la cadena a platinar. El fet que l'oligonucleòtid antisentit es trobi en forma d'adducte monofuncional fa que sigui una molècula poc idònia per a ser aplicada en teràpia, ja que podria interaccionar més fàcilment amb nucleòfils del medi cel·lular, inactivant-la abans d'arribar a la diana terapèutica.

Més recentment, s'ha assolit la síntesi d'un adducte monofuncional de transplatí amb PNA mitjançant la incorporació d'un sintó prèviament platinat,¹² el qual s'ha demostrat plenament compatible amb els protocols de síntesi de PNA. Posteriorment, aquest adducte s'ha vist que dona lloc a un únic producte d'entrecreuament per hibridació amb la corresponent cadena complementària. Ara bé, la reacció té lloc lentament i en baix rendiment, fet que s'atribueix a la baixa solubilitat del PNA i a la consegüent baixa concentració d'aquest en el medi. És important remarcar que en aquest cas la cadena antisentit no presenta restriccions seqüencials, ja que el monòmer de PNA de guanina platinat es pot introduir a qualsevol punt de l'oligòmer.

A nivell d'oligodesoxiribonucleòtids, s'han dedicat molts esforços per tal d'assolir la síntesi de sintons platinats capaços d'incorporar-se a cadenes oligonucleotídiques, per així obtenir oligonucleòtids platinats en una posició específica i sense restriccions de seqüència.¹³ Ha estat possible la introducció d'un sintó platinat, protegit mitjançant un lligand de tipus timinat a l'extrem 5' d'una seqüència homopirimidínica, prèvia fosfilitació de l'hidroxil lliure de la cadena oligonucleotídica (o sigui, emprant una estratègia d'acoblament inversa).^{13c} Per tal que el platí recuperi el lligand cloro que ha de permetre la reacció amb la cadena complementària (veure Figura 3.4), l'eliminació del grup protector té lloc per tractament amb HCl a pH 2.3, de manera que la metodologia no és vàlida per a seqüències mixtes amb pirimidines i purines (degut a la despurinació¹⁴ de les bases en aquest pH). No ha estat possible, però, la preparació d'un derivat fosforamidit estable de 2'-desoxiguanosina N7-platinada, probablement per incompatibilitat de la funció amidit amb el complex de platí. Sembla ser que la utilització de la química del H-fosfonat dona millors resultats que la del fosfit triester, però s'obtenen crús oligonucleotídics molt bruts.^{13a,b}

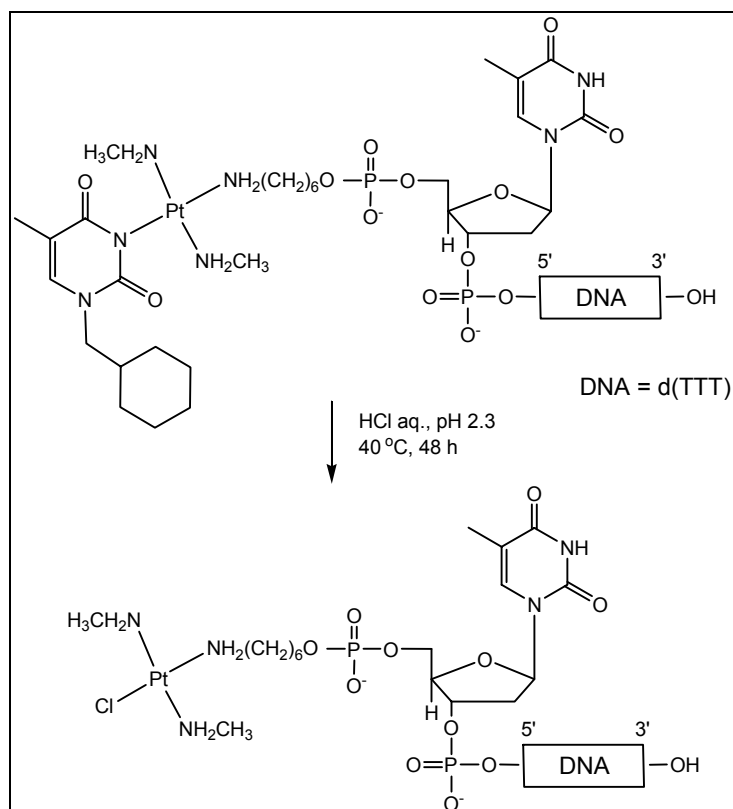


Figura 3.4. Reacció d'eliminació del grup protector de l'àtom metàl·lic, per a l'obtenció de l'oligonucleòtid en forma d'adducte monofuncional de platí amb un lligand làbil. Aquesta etapa té lloc un cop finalitzada la síntesi, desprotecció i escissió de l'oligonucleòtid.

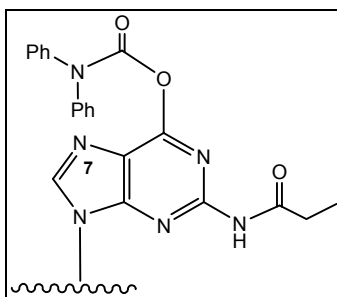


Figura 3.5. Guanina protegida amb els grups O^6 -difenilcarbamoil i N^2 -propionil.

Una altra estratègia en estudi, que no implica la preparació de sintons platinats, es basa en la síntesi oligonucleotídica mitjançant l'aplicació d'una combinació de diferents grups protectors per a les nucleobases, per tal de dirigir la platinació exclusivament a unes determinades posicions.¹⁵ D'aquesta manera, s'han platinat regioselectivament dues guanines d'una cadena que en conté varies, perquè les guanines estan diferentment protegides. Les guanines protegides amb el grup convencional N^2 -isobutiril són susceptibles de platinar-se al $N7$, mentre que la platinació és més difícil en les que presenten el grup protector difenilcarbamoil (DPC) en posició $O6$, per impediment estèric (Figura 3.5). De moment, aquesta estratègia només s'ha

aplicat per a seqüències $5'$ dGGBGGT (on B = A, C, T) amb $[Pt(en)]^{2+}$, tot i que els autors consideren que en un futur es podria aplicar per a la platinació específica d'altres seqüències d'interès.

Recapitulant, en els darrers 15 anys s'han dedicat molts esforços a l'obtenció d'oligonucleòtids platinats capaços de generar entrecreuaments entre les dues cadenes d'un dúplex. Es tracta d'una estratègia elegant i en algun cas s'han obtingut resultats biològics rellevants. Tot i així, el principal problema rau en el fet que no s'ha trobat un mètode que permeti l'obtenció d'oligonucleòtids platinats regioselectivament i sense restricció de seqüència, de manera que això limita el nombre de possibles dianes biològiques. Així, calen esforços per ampliar i explorar aquesta estratègia, essent un punt clau disposar d'una metodologia que permeti platinar oligonucleòtids sense restriccions seqüencials. Òbviament, en una segona etapa cal que es formi l'entrecreuament de forma eficaç i selectiva.

La nostra alternativa és la de platinar cadenes oligonucleotídiques que incorporin els nucleòsids X^S i X^I a l'extrem $5'$ d'una seqüència mixta. Dels estudis amb oligonucleòtids model descrits al capítol anterior s'ha conclòs que la combinació de les dues modificacions permet reaccions de platinació ràpides, gràcies al tioèter de X^S , alhora que aquest grup dirigeix la formació d'adductes bifuncionals estables per coordinació a X^I . Per tant, en aquest punt es vol estudiar si també és possible la formació d'adductes intracadena estables que evolucionin als productes d'entrecreuament en formar-se el dúplex entre un oligonucleòtid antisentit i la seva diana terapèutica (Figura 3.6).

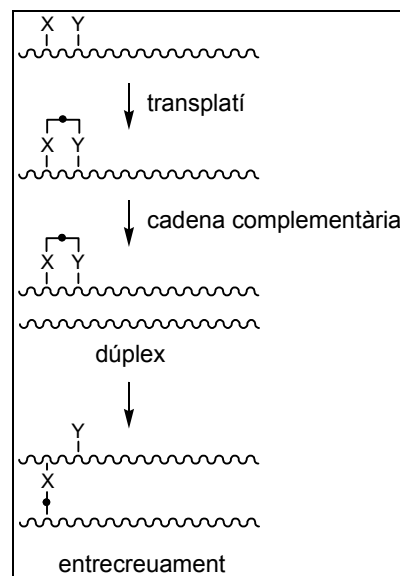


Figura 3.6. Esquema general de la possible formació d'entrecreuaments intercadena a partir de la hibridació entre un oligonucleòtid modificat platinat i la seva seqüència complementària. X, Y: X^S o X^I .

Per a dur a terme aquests estudis, es va modificar una seqüència que forma part d'un oligonucleòtid que està en estudi com a possible fàrmac antisentit (ja comentat al capítol 1), que conté tres guanines, dues de les quals es troben en una disposició 1,3 (veure Taula 3.1). Per tal de minimitzar l'efecte negatiu de les bases modificades a la formació de la doble cadena, es van introduir a l'extrem 5' de la seqüència (en el capítol 1 ja s'ha descrit la menor disminució de la T_m quan els nucleòsids modificats es troben en un extrem).

En primer lloc, es va estudiar què li passa a l'oligonucleòtid modificat en presència de transplatí. En el cas de $5'dX^S TTTT$ i $5'dX^S X^I TTTT$ els quelats X^I-Pt-X^S són estables, però en una seqüència oligonucleotídica que conté les quatre nucleobases naturals calia veure si aquests quelats es formen, a part que hi ha el risc que es doni una migració del platí des de la posició més reactiva (el sofre) cap a una altra posició de la cadena oligonucleotídica amb la qual es formaria una unió més estable (per exemple, alguna de les guanines). En aquest sentit, també es va considerar interessant comparar aquests resultats amb els estudis de platinació de les cadenes S i I, que només presenten una de les dues nucleobases modificades (Taula 3.1).

Respecte als estudis d'entrecruament, es va assajar la formació dels adductes intercadena per dues vies diferents: per platinació *in situ* i per platinació prèvia de l'oligonucleòtid modificat. Es va estudiar la reacció d'entrecruament tant amb les cadenes doblement modificades com amb cadenes control (sense modificar o només amb una nucleobase modificada), per determinar si podia tenir lloc l'entrecruament en absència de la combinació de X^S i X^I . Es va treballar amb cadenes complementàries de seqüència lleugerament diferent, o bé de seqüència aleatòria, per establir la possible aplicabilitat d'aquesta metodologia en teràpia antisentit. Tots aquests resultats que s'exposen en aquest capítol, s'acompanyen dels estudis comparatius d'estabilitat tèrmica d'una doble hèlix amb i sense una unió de *trans*-Pt(NH₃)₂, alhora que es presenten els resultats de l'estudi estructural per RMN d'un dels dúplexs entrecruats.

3.2 ESTUDIS DE PLATINACIÓ DE CADENES LLARGUES MODIFICADES

Prèviament als estudis d'entrecruament, es va estudiar la platinació de les cadenes modificades amb X^S i/o X^I , per tal d'establir quin tipus d'adductes es formen i avaluar la seva estabilitat. A la Taula 3.1 s'indiquen les cadenes emprades, amb el corresponent nom abreujat.

nom	seqüència
oligonucleòtid S	$5'dX^S ACGTTGAG$
oligonucleòtid I	$5'dX^I ACGTTGAG$
oligonucleòtid IS	$5'dX^I X^S ACGTTGAG$
oligonucleòtid SI	$5'dX^S X^I ACGTTGAG$

Taula 3.1. Oligonucleòtids antisentit modificats a l'extrem 5', emprats en els estudis de platinació i entrecruament.

3.2.1 Reacció del transplatí amb $5'dX^SACGTTGAG$

Es va realitzar un primer assaig de complexació de transplatí (1 eq) amb $5'dX^SACGTTGAG$ (oligonucleòtid S) a una concentració 4 μM en aigua, i es va seguir la reacció per HPLC al llarg de 4 dies. Tot i que a temps curts es va formar un adducte majoritari (**S-Pt**), a mesura que va transcórrer el temps el perfil de HPLC es va anar complicant, donant lloc a una mescla molt complexa de productes (veure Figura 3.7). Es van intentar optimitzar les condicions d'anàlisi per HPLC, però no s'obtingué cap millora.

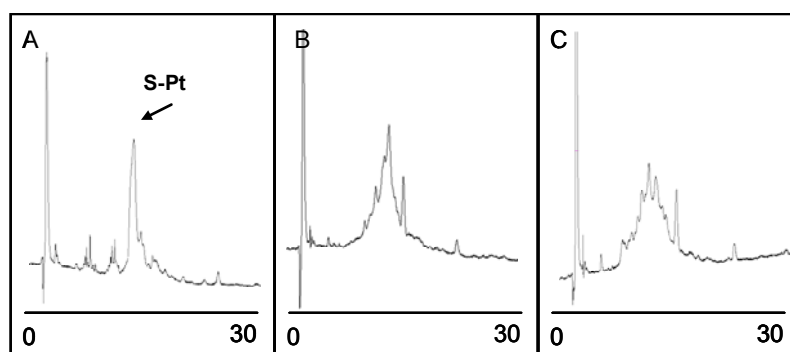


Figura 3.7. Perfils de HPLC de la reacció entre $5'dX^SACGTTGAG$ i 1 eq de transplatí a 1.5 h (A), 7 h (B) i 20 h (C).

Com que a temps curts es formava majoritàriament un producte, es va repetir el mateix experiment aturant la reacció als 40 min, per així poder caracteritzar aquest adducte. Un cop aïllat, aquest compost es va analitzar per HPLC a mig procés de liofilització, un cop liofilitzat i després d'haver-lo manipulat per a realitzar els estudis de caracterització. En els tres casos es va observar que el producte aïllat no era del tot estable, detectant-se la presència d'un altre adducte que ja s'havia observat en el medi de reacció (Figura 3.8).

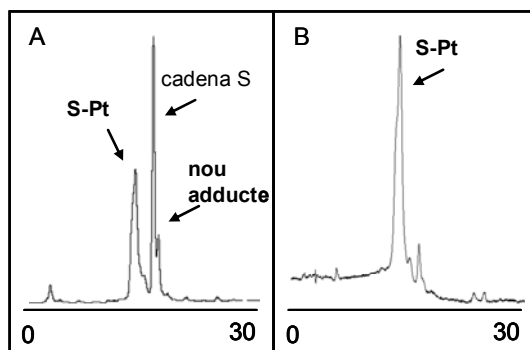


Figura 3.8. Perfil de HPLC corresponent a la repetició de la reacció entre $5'dX^SACGTTGAG$ i 1 eq de transplatí als 40 min (A), i l'anàlisi de l'adducte majoritari **S-Pt** immediatament després de ser aïllat, un cop liofilitzat (B).

L'anàlisi per EM MALDI-TOF de l'adducte majoritari **S-Pt** va mostrar la massa corresponent a un adducte bifuncional. Es va comprovar que no tenia lloc oxidació en el tractament amb H_2O_2 i no es detectà cap producte de digestió amb la 5'-exonucleasa, de manera que es pogué concloure que el platí coordina per una banda el sofre del tioèter. Amb la 3'-exonucleasa, al cap de 1 h encara s'observava la massa corresponent a l'adducte no digerit, així com també les masses dels fragments de digestió de la G de l'extrem 3' i de la A veïna. Les possibles estructures es mostren a la Figura 3.9. Aquests resultats, que semblaven indicar la presència de més d'un producte, són coherents amb l'observat en la platinació dels oligonucleòtids model $5'dX^SNNNN$ (on N = A, C, G): la unió Pt-N està molt labilitzada degut a la presència del sofre en *trans*, de manera que els possibles adductes són inestables i de difícil caracterització. Per tant, tot i que majoritàriament sembla que es formava un producte amb coordinació del platí al grup tioèter i a la segona G de l'oligonucleòtid començant per l'extrem 3' (Figura 3.9), la inestabilitat del propi complex no permet confirmar aquesta estructura, ja que durant el procés de caracterització podia tenir lloc la migració de l'àtom metàl·lic a una altra posició. Per aquest motiu no es va aprofundir en la caracterització dels diferents productes formats.

Com es mostra a la Figura 3.9, per a aquesta reacció de platinació es podria esperar com a mínim la formació de tres adductes majoritaris, per coordinació del metall al grup tioèter i a les tres guanines de la seqüència (les posicions més reactives).

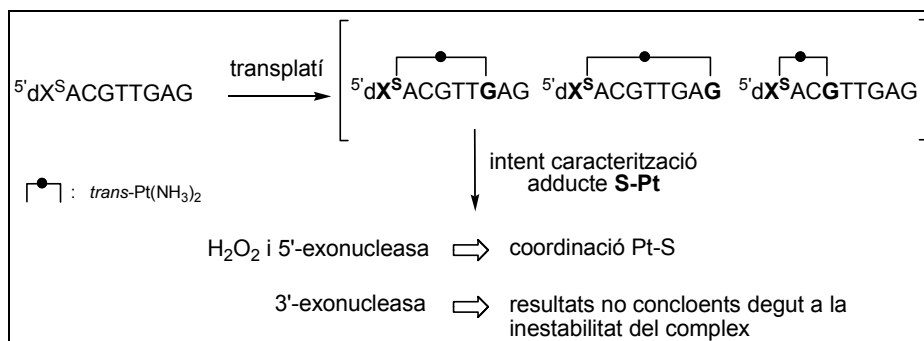


Figura 3.9. Resultats obtinguts en intentar esbrinar l'estructura de l'adducte **S-Pt** que es forma, majoritàriament, al principi de la reacció del transplatí amb l'oligonucleòtid S.

Abans d'abandonar la reacció de $5'dX^SACGTTGAG$ amb transplatí, es va realitzar el mateix experiment en un medi tamponat contenint 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0, 200 mM NaCl i 5 mM MgCl₂. L'elevada concentració de sals fa disminuir la presència de les formes aquatitzades del complex metàl·lic (veure Figura 2.9, capítol 2)¹⁶ i, per tant, el procés va seguir una cinètica més lenta que en aigua, tot i emprar 5 eq de transplatí. A les 20 h, es van formar més adductes que en la reacció en aigua a temps curts, i al cap de 2 dies es va arribar a una situació molt complexa similar a l'obtinguda en el primer assaig amb aigua.

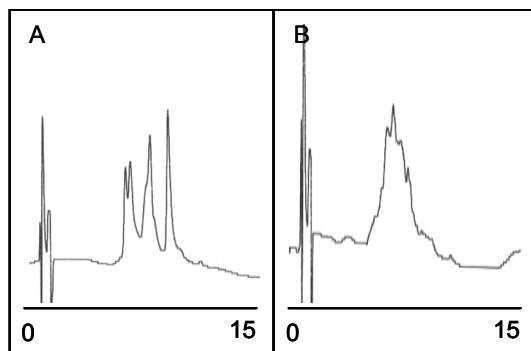


Figura 3.10. Perfils de HPLC de la reacció entre $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{S}}\text{ACGTTGAG}$ i 1 eq de transplatí en medi tamponat 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.0, 200 mM NaCl i 5 mM MgCl_2 , a les 20 h (A) i als 2 dies de reacció (B).

Així, doncs, no sembla possible obtenir un producte, ni majoritari ni estable, en tractar amb transplatí els oligonucleòtids modificats amb X^{S} . Les reaccions són molt ràpides, pel fet que el grup tioèter dirigeix la platinació. No es detecten adductes monofuncionals, sinó que ràpidament es tanca el quelat per donar lloc a adductes bifuncionals poc estables, probablement degut a la labilització de la posició de coordinació en *trans* a la unió Pt-S.

3.2.2 Reacció del transplatí amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{I}}\text{ACGTTGAG}$

Primerament es va assajar la reacció de complexació amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{I}}\text{ACGTTGAG}$ en aigua, a una concentració 3 μM . En aquest cas es van emprar 5 eq de transplatí, perquè en els estudis amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{I}}\text{TTNT}$ (N = T, C, A i G) s'havien obtingut cinètiques molt lentes en emprar 2 eq. En aquest assaig, a les 4 h ja es va observar la formació de múltiples adductes platinats amb una resolució cromatogràfica molt dolenta. A temps llargs de reacció, per EM MALDI-TOF es detectà la presència majoritària d'adductes amb 2 i 3 unitats de *trans*-Pt(NH_3)₂. Així, doncs, per a oligonucleòtids amb X^{I} i més d'una posició reactiva (tres guanines entre d'altres), s'observa una elevada reactivitat del transplatí en aigua, possiblement relacionada amb l'excés de compost platinat afegit.

Un cop realitzat aquest assaig preliminar en aigua, es va estudiar la reacció en dos medis tamponats diferents:

-10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7, 200 mM NaCl i 5 mM MgCl_2 .

-10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.

Com s'ha vist amb l'oligonucleòtid S, la reacció de complexació en el primer medi tamponat va seguir una cinètica més lenta que en aigua i donà lloc a una menor complexitat dels perfils cromatogràfics a temps relativament curts de reacció. Amb l'oligonucleòtid I, doncs, es considerarà oportú provar dos medis tamponats diferents (amb i sense clorurs) però al mateix pH.

Les reaccions es van portar a terme a una concentració d'oligonucleòtid I i amb un excés de transplatí idèntics a l'assaig en aigua. L'anàlisi de les reaccions es realitzà mitjançant HPLC, essent necessari optimitzar el gradient d'elució (fent-lo més pla i doblant el temps d'anàlisi). Aquest canvi va permetre avaluar millor la complexitat dels sistemes en estudi (Figura 3.11).

Tal i com es mostra a la Figura 3.11, per a la reacció en medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7, als 8 dies es formaren tres adductes bifuncionals amb una unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂, de t_R 22.1 min, 25.3 min i 28.7 min (23:17:60), alhora que encara quedava oligonucleòtid inicial (~50 %, t_R: 23.4 min).

Per a la reacció en presència de NaCl i MgCl₂, als 8 dies pràcticament no es van detectar adductes platinats, probablement degut a la dificultat del transplatí de donar lloc a les formes actives en presència d'un elevat contingut en ions clorur (veure Figura 3.11-D).

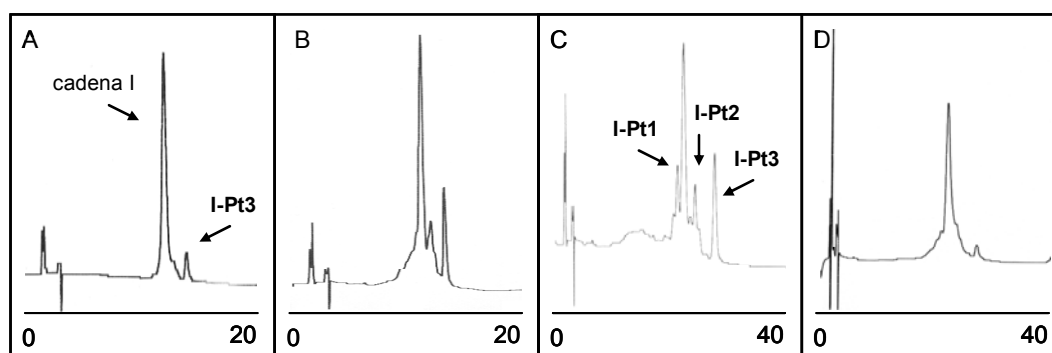


Figura 3.11. Perfils de HPLC de la reacció amb l'oligonucleòtid I i 5 eq de transplatí, en medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0, al cap de 1 dia (A) i de 8 dies (B), amb un gradient lineal de 5 a 35 % de B en 20 min. Utilitzant un gradient de 5 a 25 % de B en 40 min, es mostra l'anàlisi de la mescla de reacció als 8 dies (C) i, al mateix temps, en el medi que conté clorurs (D), 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0, 200 mM NaCl i 5 mM MgCl₂.

Per tenir una idea de com es comparen aquests resultats amb l'evolució de la reacció en altres condicions descrites a la bibliografia, es va decidir treballar en condicions de reacció semblants a les que utilitzen Leng i cols. per a l'obtenció d'adductes bifuncionals (G1,G3)-intracadena. Aquests autors empenen una concentració d'oligonucleòtid 30 μM en un tampó àcid (10 mM NaClO₄/4 mM NH₄OAc pH 3.6), per tal que les citosines estiguin protonades i assegurar que no reaccionin. En el nostre cas, no es va voler utilitzar un pH tan àcid i es va treballar amb mostres tres vegades més diluïdes, la qual cosa podia afectar a la velocitat de la reacció més que a la formació d'adductes de coordinació diferent. Leng i cols. fan ús de 1.1 eq de transplatí, sense especificar quin mètode empenen per a activar-lo.¹⁷ En el nostre cas, sempre es va activar el transplatí mitjançant aquatització per escalfament.

Així, doncs, per tal de comparar el resultat de la reacció en funció del medi emprat, es van realitzar en paral·lel dos assajos de complexació amb l'oligonucleòtid I (concentració 10 μM) i 1 eq de transplatí, en els següents medis:

-10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7 (medi fosfat)

-10 mM $\text{NaClO}_4/4$ mM NH_4OAc pH 5.3 (medi perclorat)

Les reaccions es van seguir per HPLC i al cap d'un dia es va detectar un baix percentatge de platinació ($\sim 30\%$) en la reacció en medi fosfat, de manera que s'afegí 1 eq més de transplatí per tal d'afavorir la complexació a pH neutre. D'aquesta manera, en ambdós casos es van obtenir perfils cromatogràfics similars al cap de dos dies, detectant-se la formació de tres adductes bifuncionals majoritaris amb una unitat de *trans*-Pt(NH_3)₂, de t_R 22.1 min (**I-Pt1**), 25.3 min (**I-Pt2**) i 28.7 min (**I-Pt3**) amb una relació 3:2:5, i restant encara oligonucleòtid de partida (t_R : 23.4 min, ~ 25 -35 %). També es va detectar una incipient presència en ambdós medis d'adductes doblement platinats, amb una unitat de *trans*-Pt(NH_3)₂ i una altra de *trans*-PtCl(NH_3)₂, de manera que es va decidir aturar les reaccions per evitar incrementar la complexitat del sistema en estudi.

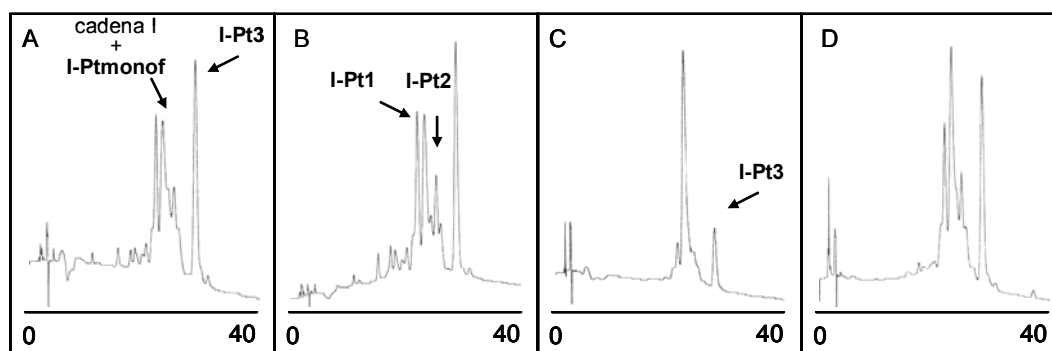


Figura 3.12. Perfils de HPLC de la reacció entre l'oligonucleòtid I i 1 eq de transplatí, en medi 10 mM $\text{NaClO}_4/4$ mM NH_4OAc pH 5.3, al cap d'un dia (A) i 2 dies (B), i en medi 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.0, també al cap d'un dia (C) i als 2 dies (D), després d'haver afegit 1 eq més de transplatí a les 24 h.

La reacció en medi fosfat va reproduir els resultats previs. En aquest cas la cinètica fou més ràpida, fenomen atribuïble al fet que es va treballar a una concentració 10 μM en comptes de 3 μM . Cal dir que en tots els medis assajats es va arribar a la mateixa distribució d'adductes i que, per tant, el medi emprat no sembla afectar al tipus de coordinació però sí a la velocitat de la reacció, essent molt més ràpida a pH lleugerament àcid (veure Figura 2.9, capítol 2).

Així, doncs, en totes les reaccions assajades es van obtenir tres adductes majoritaris de tipus bifuncional. Tot i que en un principi no semblava detectar-se la formació de cap adducte monofuncional, l'anàlisi per EM MALDI-TOF del pic corresponent a oligonucleòtid inicial va mostrar la presència, també, de la massa d'oligonucleòtid amb una unitat de *trans*-PtCl(NH_3)₂

(de menor intensitat). Per tant, sí que s'havia format algun tipus d'adducte monofuncional, però aquest va coeluir amb la cadena I inicial.

Els tres adductes bifuncionals es van aïllar per HPLC i es detectà per EM MALDI-TOF la mateixa massa per a tots ells. La caracterització mitjançant digestió enzimàtica amb una 3'- i una 5'-exonucleasa només es va realitzar per als dos compostos més majoritaris (**I-Pt1** i **I-Pt3**). Per a **I-Pt1**, amb la 3'-exonucleasa no es va detectar cap producte de digestió a temps curts. Tot i així, a temps relativament llargs, es va observar una massa corresponent a un guany d'una molècula d'aigua i posterior pèrdua d'una timina, que s'explicaria per l'actuació de la 3'-exonucleasa com a endonucleasa, hidrolitzant un enllaç fosfodiester del cicle i eliminant pT (aquest tipus de reacció "anòmala" ja s'havia vist per a dos adductes derivats de $5'dX^lTTGT$, **IG2** i **IG3**). Amb la 5'-exonucleasa, ràpidament es va detectar la pèrdua de $X^l pAp$, i no fou fins al cap de 1 h que es va observar l'eliminació del següent nucleòtid de la seqüència, la citosina de l'extrem 5'. Es pot suposar que, tot i la dificultat de digerir la citosina, la coordinació del metall estaria ubicada al *N7* de la guanina més propera a l'extrem 5'. Sovint els enzims tenen dificultat per digerir les nucleobases més properes a una posició platinada,¹⁸ sobretot en el cas particular de les 5'-exonucleases, que són molt sensibles a l'estructura secundària i a la llargària de la cadena substrat.¹⁹

Per a **I-Pt3**, l'adducte majoritari de t_R 28.7 min, amb la 3'-exonucleasa es va detectar inicialment la digestió dels dos nucleòtids de l'extrem 3' (pApG) i, com en el cas de **I-Pt1**, amb el temps es va observar el guany de 18 unitats per després donar lloc a la pèrdua d'una timina (actuació com a endonucleasa, en no poder digerir el nucleòtid platinat). Això indicaria que la coordinació del platí, per l'extrem 3' del quelat, té lloc al *N7* de la guanina central de la seqüència. Amb la 5'-exonucleasa, ràpidament va tenir lloc la digestió de X^l i de la A veïna, detectant també el fragment corresponent a la pèrdua de la C següent. Aquesta massa va ser majoritària amb el temps, la qual cosa implica que l'altre punt de coordinació és la G més propera a l'extrem 5' (Figura 3.14).

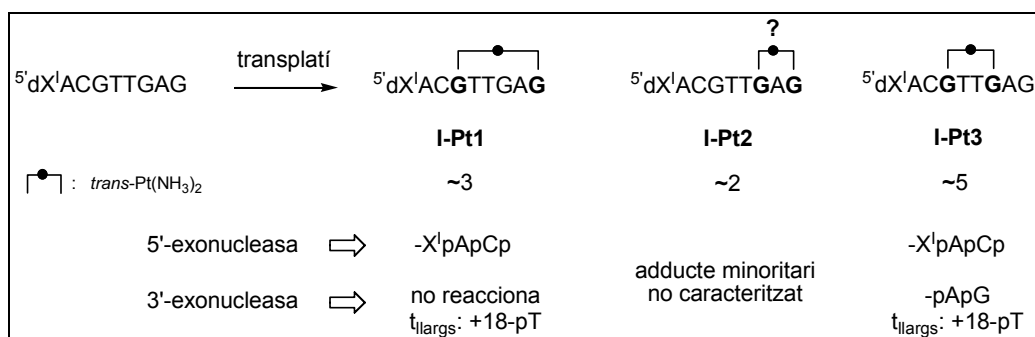


Figura 3.13. Adductes formats en la reacció del transplatí amb l'oligonucleòtid I. S'indica la proporció en què es formen i es resumeixen els resultats de caracterització dels adductes majoritaris.

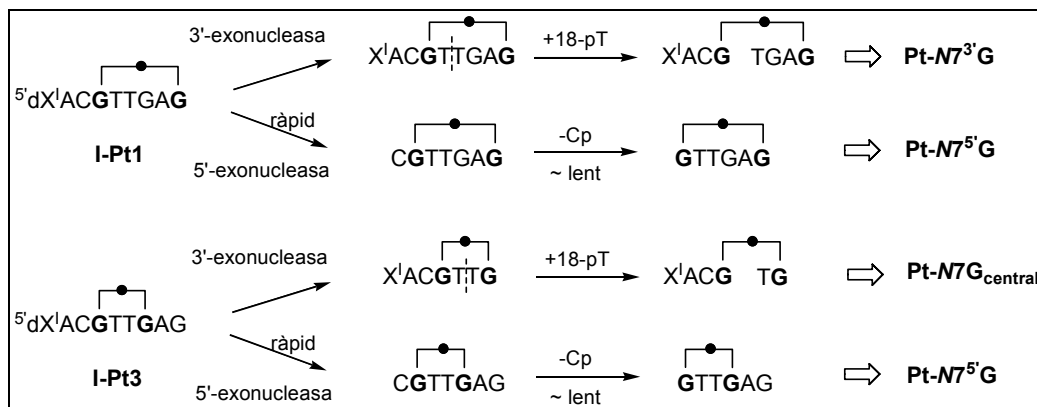


Figura 3.14. Estructura dels productes de digestió detectats per EM MALDI-TOF per a **I-Pt1** i **I-Pt3**.

Ni els possibles adductes monofuncionals ni l'adducte bifuncional **I-Pt2** es van caracteritzar, perquè eren minoritaris i no podien ser aïllats purs. Pel que fa als adductes monofuncionals, és d'esperar que aquests fossin els productes de coordinació del transplatí al *N7* d'alguna de les tres guanines presents a la seqüència. Respecte a **I-Pt2**, es podria pensar, tal i com s'ha dibuixat a la Figura 3.13, que la coordinació del platí tingués lloc a les dues guanines més properes a l'extrem 3'.

Així, en les reaccions de platinació de l'oligonucleòtid amb un nucleòsid modificat amb un grup imidazole, X^1 no juga cap paper fonamental durant el procés de complexació, ni a pH àcid ni neutre. Aquest resultat contrasta amb els obtinguts amb els oligonucleòtids model (capítol 2), on l'anell d'imidazole és un punt de coordinació en tots els adductes formats. Cal dir, no obstant, que en els oligonucleòtids $5'dX^1TTNT$ (N: C, A, G) només hi ha dues nucleobases reactives i, per tant, els adductes monofuncionals Pt-A/C/G evolucionen a quelats X^1 -Pt-A/C/G. En el cas de l'oligonucleòtid I, inicialment es formarien adductes monofuncionals per coordinació del platí a les guanines, per donar lloc amb el temps a tres adductes bifuncionals, on s'estableix preferentment una unió Pt-G més que no pas Pt- X^1 . A pH lleugerament àcid la reacció és més ràpida que a pH neutre, però en ambdós medis s'obtenen els tres adductes bifuncionals amb una proporció similar, els dos majoritaris dels quals s'ha vist que corresponen a $5'dX^1ACGTTGAG$ -Pt(NH₃)₂ i $5'dX^1ACGTTGAG$ -Pt(NH₃)₂. Tot i que en general es considera l'adducte (G1,G3)-intracadena un dels adductes majoritaris en la reacció del transplatí amb DNA monocatenari, amb aquesta seqüència els majoritaris resulten ser adductes del tipus (G1,G4) i (G1,G6).

3.2.3 Reacció del transplatí amb $5'dX^1X^SACGTTGAG$ i $5'dX^S X^1ACGTTGAG$

Una vegada estudiades les reaccions de complexació entre transplatí i els oligonucleòtids $5'dXACGTTGAG$ ($X = X^S$ o X^1), es va passar a treballar amb els oligonucleòtids que presenten els dos nucleòsids modificats a l'extrem 5' de la cadena. Altre cop es van realitzar els estudis

situant les dues modificacions en un sentit o en l'altre, per avaluar la diferent reactivitat en funció de la seva disposició en la seqüència. Com ja s'ha vist en el capítol 2, en el sistema model $5'dX^S X^L TTTT$ i $5'dX^L X^S TTTT$, el platí coordina les dues nucleobases modificades, a través del grup tioèter i cadascun dels nitrògens de l'anell d'imidazole.

Es va considerar oportú portar a terme les reaccions emprant dos medis diferents, un medi amb perclorat i acetat a pH lleugerament àcid, i un medi fosfat a pH neutre.

3.2.3.1 Reacció del transplatí amb $5'dX^L X^S ACGTTGAG$

Es va dur a terme la reacció amb $5'dX^L X^S ACGTTGAG$ (oligonucleòtid IS) i 1 eq de transplatí, emprant els següents medis aquosos:

-10 mM $NaClO_4$ /4 mM NH_4OAc pH 5.3 (medi perclorat)

-10 mM NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 pH 7.0 (medi fosfat)

També en aquest cas, en medi perclorat a pH relativament àcid es va detectar un major percentatge de platinació a temps relativament curts ($t_{1/2} \sim 5$ h a $37^\circ C$). En ambdós casos, inicialment es va formar un adducte bifuncional majoritari (**IS-Pt1**, t_R : 20.5 min), que al cap de dos dies va anar evolucionant per donar lloc a diferents adductes bifuncionals, molts d'ells solapats amb el producte de partida (Figura 3.15). Tan sols es pogueren aïllar i caracteritzar **IS-Pt1** i l'adducte **IS-Pt2** (t_R : 24.0 min), que presenten uns punts de coordinació de naturalesa diferent. En medi fosfat, la reacció va transcórrer més lentament, de manera que al cap de 2 dies encara hi havia un 73 % d'oligonucleòtid inicial ($t_{1/2} > 2$ dies a $37^\circ C$). En medi perclorat es van obtenir uns crús més heterogenis, amb els pics cromatogràfics més amples i menys ben resolts. En cap cas no es van detectar adductes monofuncionals.

Cal dir que aquestes reaccions es van portar a terme amb una mostra d'oligonucleòtid IS que contenia un 7 % d'oligonucleòtid en forma oxidada, el qual es va mantenir inalterat gràcies a la major reactivitat del nucleòsid X^S amb el grup tioèter en forma reduïda.

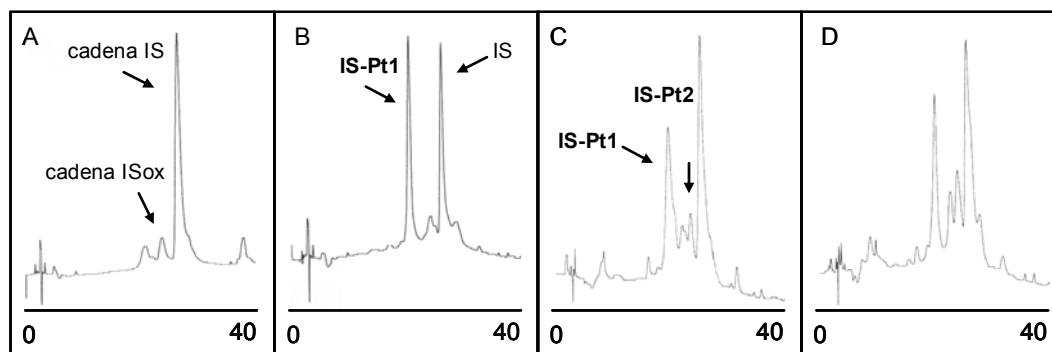


Figura 3.15. Perfils de HPLC de la reacció de complexació amb IS en medi perclorat als 30 min (A), 5 h (B), 1 dia (C) i 2 dies (D).

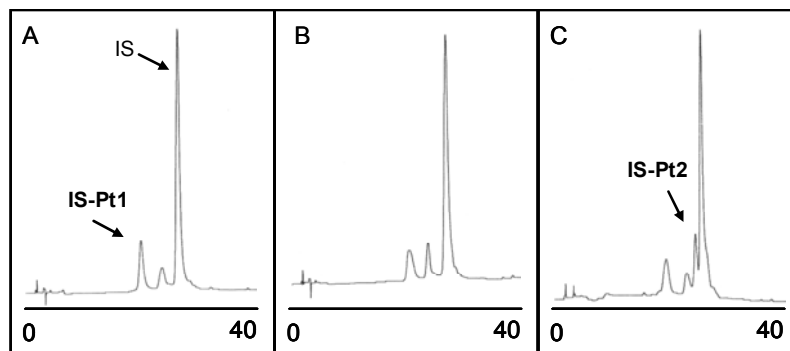


Figura 3.16. Perfils de HPLC de la reacció de complexació amb IS en medi fosfat a les 3 h (A), 6 h (B) i 2 dies (C).

La caracterització dels adductes es va realitzar, com sempre, per tractament oxidatiu i digestions enzimàtiques. **IS-Pt1** es va mantenir estable durant el tractament amb H_2O_2 , de manera que el sofre està coordinat al platí(II). Amb la 5'-exonucleasa no es va detectar cap fragment de digestió, excepte a temps força llargs (> 1 h) en què es va iniciar un procés de digestió per l'extrem 3'. En el tractament amb la 3'-exonucleasa, es van anar detectant els diferents fragments de digestió, essent l'última massa que es pogué detectar la que correspon a la pèrdua de pCpGpTpTpGpApG. Així, doncs, **IS-Pt1** resulta de la coordinació del metall als dos nucleòsids modificats X^I i X^S .

En el cas de l'adducte **IS-Pt2**, per tractament oxidatiu va tenir lloc l'oxidació del grup tioèter a sulfòxid, posant de manifest que en aquest cas no hi ha una unió Pt-S. Mitjançant la 5'-exonucleasa, inicialment no es va obtenir cap fragment de digestió, però a temps més llargs es va detectar bàsicament un increment de 18 unitats i la pèrdua del nucleòsid X^S , resultat sorprenent que no s'ha sabut explicar. Amb la 3'-exonucleasa es va detectar la pèrdua de pTpTpGpApG, la qual cosa indica la coordinació del metall a la G més propera a l'extrem 5' de la seqüència.

Per tant, inicialment té lloc la formació d'un adducte bifuncional cinèticament molt afavorit, per coordinació del platí(II) al grup tioèter i a l'imidazole. Aquest producte amb el temps evoluciona, donant lloc, entre d'altres, a un quelat termodinàmicament més estable, amb coordinació a dues posicions nitrogenades, X^I i el N7 de la guanina. En la reacció amb $5'dX^I X^S TTTT$, aquesta migració no està afavorida, donada la baixa reactivitat de les timines, i per això la vida mitjana de l'adducte, tot i estar coordinat per les mateixes posicions, és més gran.

Com ja s'ha comentat anteriorment (capítol 2), és lògic que no es detectés cap adducte monofuncional. La coordinació Pt-S afavoreix la labilització del clorur en *trans*, per donar lloc ràpidament a l'adducte bifuncional **IS-Pt1**.

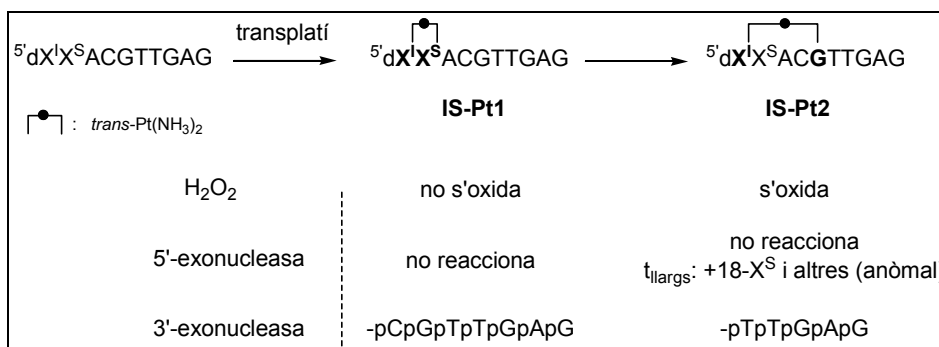


Figura 3.17. Esquema de la reacció de transplatí i l'oligonucleòtid IS, amb un resum dels resultats de caracterització.

Finalment, es va realitzar la reacció amb l'oligonucleòtid IS a major escala, per tal d'aïllar en quantitat més gran l'adducte majoritari a temps curts (**IS-Pt1**). Es va dur a terme en medi perclorat, pel fet que la platinació té lloc més ràpidament. D'aquesta manera, després d'un dia a temperatura ambient es va obtenir un 60 % de platinació i es va aïllar l'adducte **IS-Pt1** amb un rendiment global del 19 % (Figura 3.18). Aquest producte platinat s'emprà posteriorment (apartat 3.3.1) per als estudis d'entrecreuament amb la cadena complementària G1.

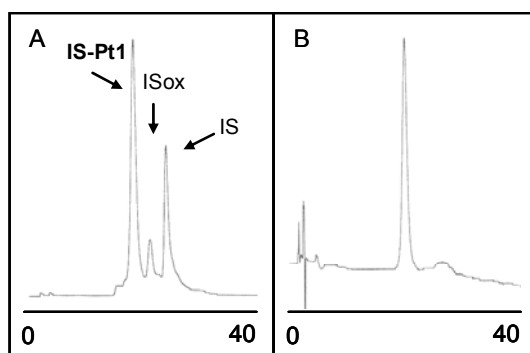


Figura 3.18. Perfils de HPLC de la reacció de platinació a gran escala de IS al cap de 24 h (A), i de l'adducte **IS-Pt1** aïllat (B).

3.2.3.2 Reacció del transplatí amb $5'\text{dX}^{\text{S}}\text{X}^{\text{I}}\text{ACGTTGAG}$

Com en el cas anterior, es va realitzar la reacció entre $5'\text{dX}^{\text{S}}\text{X}^{\text{I}}\text{ACGTTGAG}$ (oligonucleòtid SI) i 1 eq de transplatí, emprant dos medis tamponats diferents, el tampó fosfat i el tampó perclorat.

En aquest cas també es va observar un major percentatge de platinació a temps curts en medi perclorat. En ambdues reaccions es formà inicialment un adducte bifuncional (**SI-Pt1**) que amb el temps va donar lloc a la formació, entre d'altres, a **SI-Pt2**, adducte bifuncional que va coeluir amb l'oligonucleòtid de partida. Tot i que l'evolució de les dues reaccions va ser similar, en medi fosfat es pogué veure clarament la disminució amb el temps de l'adducte **SI-Pt1**, majoritari a temps curts, per donar lloc a un increment del pic que correspondria a oligonucleòtid inicial. Tot

i així, l'anàlisi per EM MALDI-TOF de l'esquena d'aquest pic cromatogràfic va mostrar bàsicament la presència del nou adducte platinat **SI-Pt2** (veure Figura 3.19-C).

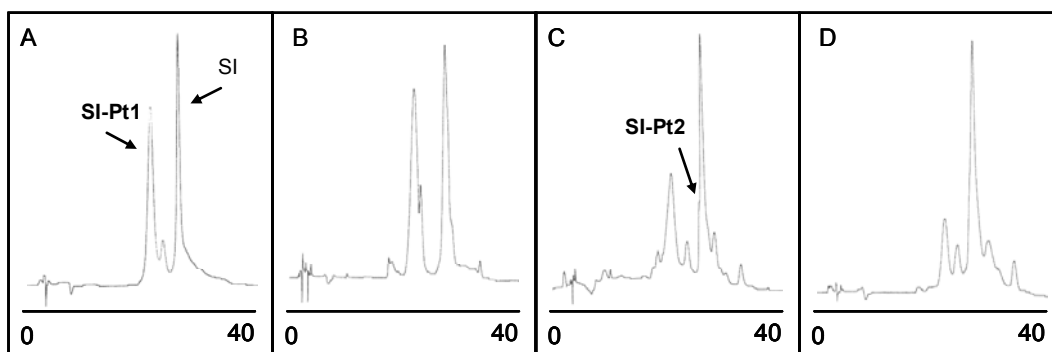


Figura 3.19. Perfils de HPLC de la reacció de platinació de SI en medi perclorat a les 1.5 h (A), 6 h (B), 1 dia (C) i 2 dies (D).

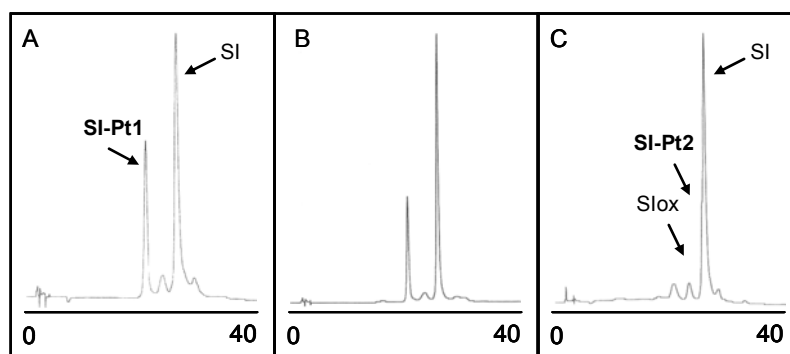


Figura 3.20. Perfils de HPLC de la reacció de platinació de SI en medi fosfat a les 6 h (A), 1 dia (B) i 2 dies (C).

Un cop aïllats per HPLC els dos adductes **SI-Pt1** i **SI-Pt2**, es realitzà la corresponent caracterització (Figura 3.21). Per a **SI-Pt1**, l'adducte es va mostrar estable al tractament oxidatiu amb H_2O_2 , alhora que amb la 5'-exonucleasa no es va detectar cap fragment de digestió. Amb la 3'-exonucleasa es va observar la pèrdua dels diferents nucleòtids i, en aquest cas, es pogué detectar la massa corresponent a $X^S X^L-Pt(NH_3)_2$, tot i que en baixa intensitat, confirmant la coordinació del transplatí a les dues nucleobases modificades.

Per a **SI-Pt2**, l'adducte va donar lloc a la massa amb un increment de 16 unitats per tractament amb H_2O_2 , posant de manifest que el grup tioèter no es troba coordinant l'ió metàl·lic. Aquest resultat es va confirmar amb la 5'-exonucleasa pel fet que es va detectar la digestió del nucleòtid X^S . A temps més llargs, també es va observar un increment de 18 unitats i altres masses "anòmales", corresponents a la hidròlisi d'un enllaç fosfodiester i a la possible digestió d'algun nou nucleòtid. En cap cas es va detectar la pèrdua de X^L , indicant la coordinació del metall a aquesta nucleobase. Amb la 3'-exonucleasa es va poder observar correctament la

digestió de pTpTpGpApG, indicant la coordinació del metall a la guanina més propera a l'extrem 5'.

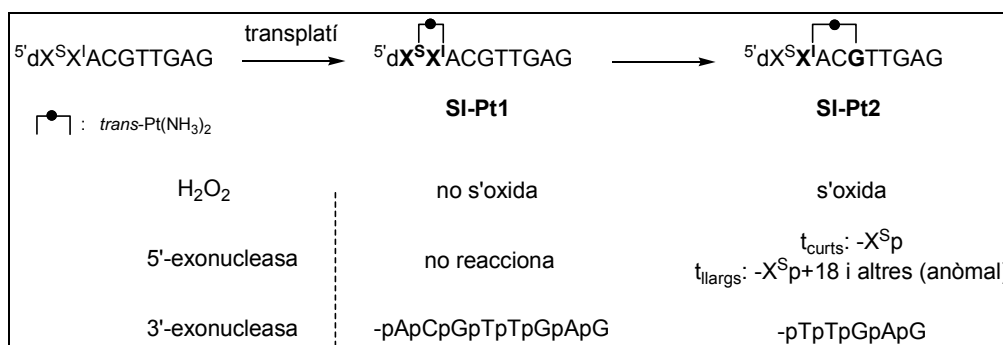


Figura 3.21. Resum dels resultats de la reacció entre transplatí i l'oligonucleòtid SI.

En aquest cas, també es realitzà la reacció amb l'oligonucleòtid SI a major escala, per tal d'aïllar l'adducte majoritari a temps curts (**SI-Pt1**). Es duqué a terme en medi fosfat, pel fet que els perfils de HPLC en aquest medi havien presentat pics menys amples que en medi perclorat, alhora que no s'havia detectat una gran diferència en el grau de platinació. D'aquesta manera, després d'un dia a temperatura ambient, s'obtingué un 41 % de platinació i es va aïllar l'adducte **SI-Pt1** amb un rendiment global del 27 %.

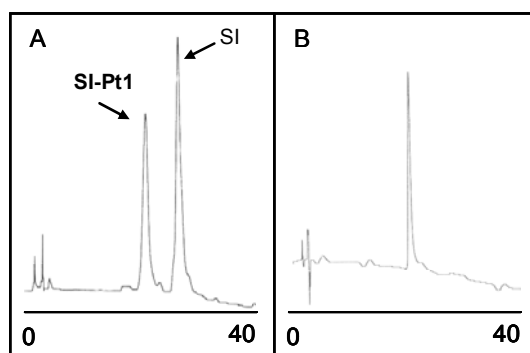


Figura 3.22. Perfils de HPLC de la reacció de platinació de SI al cap de 24 h (A), i de l'adducte **SI-Pt1** aïllat (B).

Comparant aquestes reaccions amb les de l'oligonucleòtid IS, es posà de manifest que en ambdós casos es forma inicialment un adducte en el que el metall coordina el grup tioèter i l'imidazole, el qual evoluciona per migració del platí del tioèter a una posició nitrogenada per donar lloc a un nou adducte més estable termodinàmicament. En tots dos casos, el nou adducte majoritari presenta la coordinació del metall a la guanina més propera a l'extrem 5' i a l'imidazole. És important destacar que, tot i que en les condicions d'anàlisi es detectés un únic

pic cromatogràfic, cal pensar que correspon a una barreja dels dos isòmers constitucionals resultants de la coordinació tant al $N\pi$ com al $N\tau$ de l'anell d'imidazole de X^I .

Els resultats obtinguts amb ambdós oligonucleòtids, IS i SI, presenten un cert paral·lelisme amb els resultats previs obtinguts en el grup de treball amb l'híbrid PhacHisGlyMet-espaiador- $5'$ dCATGGCT i transplatí.²⁰ En aquell cas, inicialment té lloc la formació d'adductes bifuncionals per coordinació del metall al sofre de la metionina i al $N7$ de la guanina de l'extrem $5'$, que posteriorment evolucionen cap a adductes de major estabilitat termodinàmica per migració del platí de la metionina a la histidina, mantenint-se la coordinació a la guanina. Així, doncs, els adductes cinètics S-Pt-N evolucionen per donar els adductes termodinàmicament més estables N-Pt-N, com en molts d'altres experiments amb complexos de platí(II).²¹ L'única diferència és que tant amb l'oligonucleòtid IS com SI, els adductes inicials impliquen la coordinació al tioèter i a l'anell d'imidazole, mentre que per a l'híbrid la interacció té lloc pel tioèter i la guanina de l'extrem $5'$. Aquests fets diferencials probablement responen a la disposició espacial de les molècules, ja que en els oligonucleòtids IS i SI la proximitat del grup tioèter a X^I afavoreix la interacció amb l'anell d'imidazole. D'altra banda, la superior estabilitat dels complexos X^S -Pt- X^I respecte a la dels adductes metionina-Pt-guanina dels estudis amb conjugats podria estar relacionada amb el fet que provoquen una menor distorsió en la molècula, en estar unit el metall a posicions properes en l'espai. És possible que la unió a punts més allunyats en la seqüència obligui a plegaments que impliquen major repulsió electrostàtica entre els fosfats.

Un aspecte positiu important en aquests experiments és que, en un oligonucleòtid que conté totes les bases, la combinació de les dues nucleobases modificades és la que dona lloc a mesclades de productes de platinació menys complexes, essent més fàcil l'aïllament dels productes majoritaris.

3.3 REACCIONS D'ENTRECREUAMENT

Un cop analitzada l'evolució de les reaccions de platinació de les cadenes modificades de tipus antisentit, es va passar a estudiar les reaccions d'entrecreuament d'aquestes en presència de la cadena complementària. Com s'ha comentat en els objectius de la Tesi, la formació d'entrecreuaments es va abordar de dues maneres diferents: d'una banda la reacció entre transplatí i l'oligonucleòtid modificat en presència de la cadena complementària, o bé fent reaccionar un oligonucleòtid platinat amb la cadena complementària. Tal i com es mostra a la Figura 3.23, s'hi referirà com a via A o via B, respectivament.

Pel que fa a la primera alternativa, es va assajar la reacció d'entrecreuament amb diferents cadenes modificades (vegeu la Taula 3.4 a l'apartat 3.3.3). Per a la segona alternativa, tan sols es va treballar amb els adductes intracadena X^I -Pt- X^S generats en la reacció del transplatí amb els oligonucleòtids SI i IS, donat que són adductes estables que es formen en proporció important al llarg del procés. Cal recordar que en la reacció de l'oligonucleòtid S no es van obtenir adductes estables i que els que es formen a partir de l'oligonucleòtid I no representen

Com es veurà més endavant, un fet que va sorprendre en l'anàlisi dels crús de reacció mitjançant HPLC de bescanvi aniònic és la detecció d'un pic ample de t_R 15-20 min. En aquest pic, que en certs casos es va eixamplar molt o va aparèixer com a doble pic, coel·luïen la cadena complementària G1 (3 dGTTTGTGCAACTC) i mescles de cadenes modificades reduïda i/o oxidada, així com l'adducte intracadena, tal i com es va comprovar per EM MALDI-TOF. Per intentar entendre el que estava passant, es van analitzar per HPLC de bescanvi aniònic la cadena control C i la complementària G1, i posteriorment es van coinjectar ambdues, tal i com mostra la Figura 3.25.

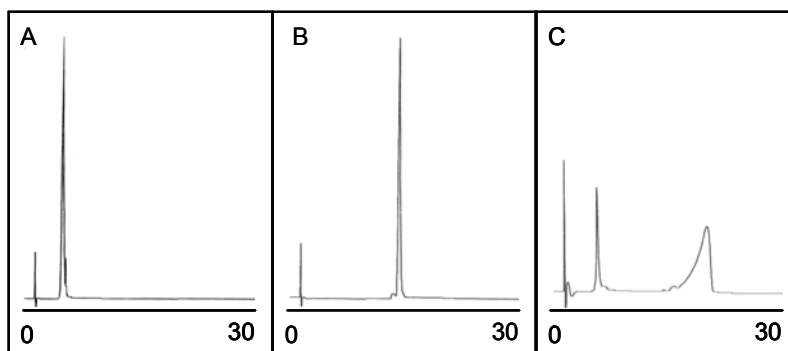


Figura 3.25. Perfils de HPLC de bescanvi aniònic dels oligonucleòtids C (A) i G1 (B), i coinjecció dels dos (mateixa quantitat).

Es va observar que el pic corresponent a la cadena C va disminuir d'intensitat i va aparèixer un nou pic ample de t_R més gran que el de G1, que va correspondre a una mescla de C i G1. Aquests resultats fan pensar que degut a l'elevat contingut en sals dels eluents de HPLC en condicions de bescanvi aniònic (quantitats creixents de NaCl, 0.25-0.50 M), les cadenes oligonucleotídiques complementàries tendeixen a estructurar-se en forma de doble cadena (tal i com es veurà a l'apartat 3.3.4, les cadenes no complementàries es detecten en el t_R esperat). La desnaturalització prèvia de la mostra (per escalfament o per addició de DMF) no va permetre millorar el perfil cromatogràfic. L'aïllament dels productes, en aquests casos, va requerir una etapa prèvia de dessalatge mitjançant columnes Sep-Pak.

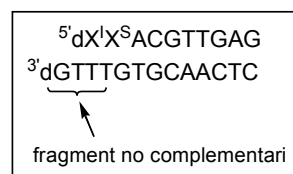
L'electroforesi en gel de poliacrilamida al 20 % (en condicions desnaturalitzants amb urea 7 M) va permetre visualitzar i confirmar la formació d'entrecreuaments entre cadenes oligonucleotídiques, pel fet que aquests adductes presenten una menor mobilitat electroforètica que les cadenes senzilles. Les cadenes modificades amb un grup tioèter i amb un grup imidazole presenten una menor mobilitat del que s'esperaria per a oligonucleòtids de la seva talla, fins al punt que presenten una lleugera major mobilitat els oligonucleòtids complementaris de 13 nucleòtids que els oligonucleòtids modificats amb X^S i X^I (de 10 nucleòtids de llargària). D'altra banda, els adductes intracadena **IS-Pt1** i **SI-Pt1** són relativament inestables a les condicions d'electroforesi, i això està probablement relacionat amb la coordinació del platí a

l'àtom de sofre que pot donar lloc, en aquestes condicions, a una desplatiniació de les mostres. En canvi, els adductes platinats amb unions N-Pt-N (adductes intercadena o d'entrecruament) són completament estables, de la mateixa manera que ho són els adductes (G1,G3)-intracadena descrits per Leng i col·laboradors.

Pel que fa a l'anàlisi directa del cru de reacció mitjançant EM MALDI-TOF, la detecció es va veure dificultada degut a l'elevat contingut salí de la mostra. Tot i que es podia observar la massa corresponent a producte d'entrecruament, no era prou clara com per assegurar la seva existència real en el medi de reacció, ja que podia ser un artefacte de la pròpia tècnica. D'altra banda, per a l'anàlisi dels productes col·lectats de HPLC de bescanvi aniónic, va ser necessari l'ús de puntes Zip Tip, per tal de dessalar i concentrar el producte (per a mostres analítiques). La caracterització dels adductes formats es va realitzar seguint els mateixos procediments que per als casos anteriors, mitjançant tractaments amb 3'- i 5'-exonucleases i amb H₂O₂.

3.3.1 Reaccions d'entrecruament entre l'oligonucleòtid IS i G1

Les dues possibles vies de formació d'entrecruaments, de les que ja s'ha parlat a l'apartat 3.3, es mostren a la Figura 3.23. Les reaccions es van realitzar a la mateixa concentració de dúplex (10 µM), en un medi tamponat 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0, 100 mM NaCl. En el cas de la via A es va emprar 1 eq de transplatí. Les reaccions es van deixar evolucionar a 16 °C, de manera que a aquesta temperatura s'assegurava la formació de la doble cadena ($T_{m(IS+G1)} = 32.0\text{ °C}$, capítol 1).



El seguiment de les reaccions per HPLC de bescanvi aniónic (veure Figura 3.26) va permetre la separació cromatogràfica dels diferents productes de reacció. Als 9 dies, es va detectar en ambdós casos la formació del mateix adducte bifuncional intercadena (**IS-Pt-G1**, t_R : 20.9 min), producte d'entrecruament que no havia pogut ser aïllat en condicions de fase reversa.

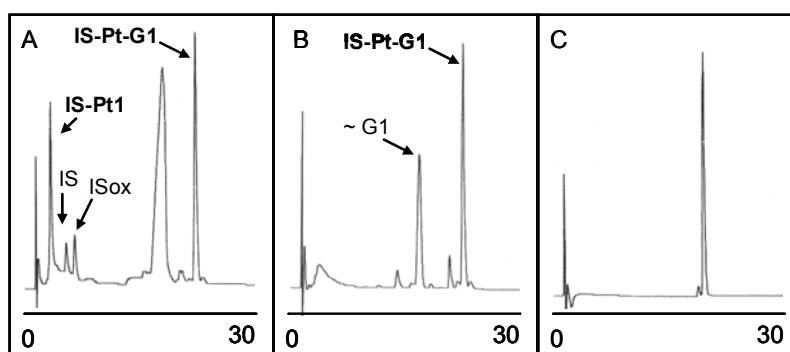


Figura 3.26. Perfils de HPLC de bescanvi aniónic al cap de 9 dies de les reaccions IS + G1 + transplatí (A) i **IS-Pt1** + G1 (B), i del producte d'entrecruament **IS-Pt-G1** aïllat (C).

Tal i com mostra a la Figura 3.26, a la reacció seguint la via B, on es partia de l'adducte **IS-Pt1**, s'observà la seva desaparició per donar lloc al producte d'entrecreuament amb G1. D'altra banda, a la reacció seguint la via A es va detectar la presència de l'adducte bifuncional intracadena **IS-Pt1**, on el platí coordina les dues nucleobases modificades, a més a més del producte d'entrecreuament **IS-Pt-G1**. Sembla, per tant, que primer es platinà la cadena IS, i que després reacciona amb l'oligonucleòtid G1; és a dir, que la seqüència de passos quan es barregen els tres components és la mateixa que quan es defineix l'ordre del procés mitjançant platinació prèvia (Figura 3.27). Tot i així, la reacció *in situ* (via A) dóna lloc més lentament a la formació de l'adducte final, pel fet que hi ha l'etapa adicional de platinació de l'oligonucleòtid IS (hibridat a G1) abans de formar-se l'entrecreuament.

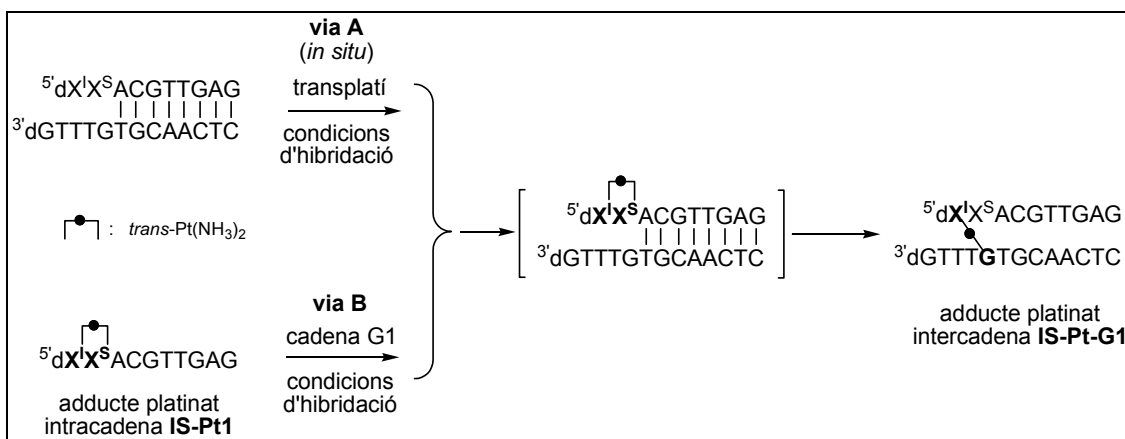


Figura 3.27. Proposta per l'evolució de la reacció per a les dues vies emprades.

Mitjançant PAGE es pogué visualitzar també la formació d'aquests adductes d'entrecreuament. Tal i com s'observa a la Figura 3.28, el carril 3 correspon a la reacció seguint la via A (reacció *in situ*) i el carril 2 és la reacció seguint la via B (partint de l'adducte **IS-Pt1**), als 12 dies de reacció. Tot i que per HPLC es va detectar la presència de l'adducte bifuncional intracadena **IS-Pt1** en el medi de reacció seguint la via A, per PAGE pràcticament no es va visualitzar. El producte no fou estable en les condicions d'anàlisi, donant lloc majoritàriament a la banda que correspon a oligonucleòtid IS.

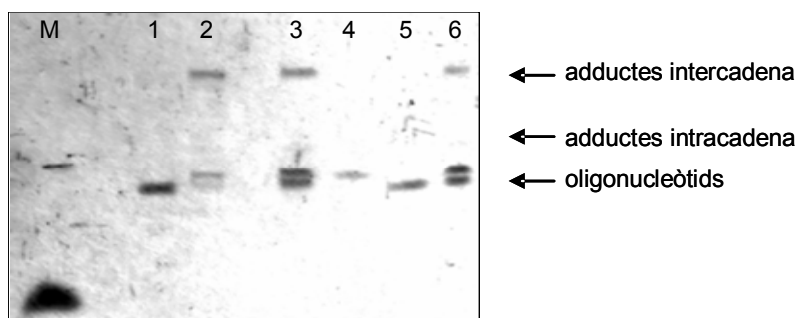


Figura 3.28. Gel de poliacrilamida als 12 dies de reacció: oligonucleòtid IS (1), reacció **IS-Pt1** + G1, via B (2), reacció IS + G1 + transplatí, via A (3), oligonucleòtid G1 (4), oligonucleòtid SI (5), reacció SI + G1 + transplatí, via A (6).

Tant **IS-Pt1** com **IS-Pt-G1** es van aïllar per HPLC de bescanvi aniònic i es van dessalar amb una columna Sep-Pak. La caracterització del producte intracadena aïllat de la reacció seguint la via A, que va eluir amb el mateix temps de reacció que **IS-Pt1** emprat com a reactiu de la via B, va corroborar que es tracta del mateix adducte, on el platí coordina X^S i X^I (apartat 3.2.3.1). A la Figura 3.26-C es mostra el perfil cromatogràfic de l'adducte **IS-Pt-G1** pur, detectant-se una esquena (4 %) que correspon a l'adducte en forma oxidada (el tioèter s'oxida amb l'oxigen atmosfèric durant el seu aïllament). Aquesta impuresa no va impedir la correcta caracterització de l'adducte, alhora que ja posava de manifest que el tioèter no intervé en la coordinació al metall. En l'anàlisi de **IS-Pt-G1**, per EM MALDI-TOF es va detectar la massa corresponent a les dues cadenes oligonucleotídiques i una unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂. Per tractament oxidatiu, la massa de l'adducte va incrementar en 16 unitats, indicant que el grup tioèter no es troba a l'esfera de coordinació del platí. Tot i que els crús de digestió no van ser fàcils d'interpretar, pel fet que en aquest cas els enzims poden actuar alhora fragmentant les dues cadenes, la 3'-exonucleasa va anar digerint la doble cadena fins a l'obtenció del fragment que es mostra a la Figura 3.29, la qual cosa indica que el platí coordina el nucleòsid X^I i la segona guanina de la cadena complementària començant per l'extrem 3'. Així, doncs, només amb la digestió amb aquest enzim ja es pogueren elucidar les dues posicions de coordinació del platí. D'altra banda, l'assaig amb la 5'-exonucleasa va permetre detectar la pèrdua dels nucleòtids de l'extrem 5' de la cadena complementària (ja que la cadena IS presenta l'àtom de platí coordinant la nucleobase modificada de l'extrem). En aquest cas el fragment final de digestió fou el que es mostra a la Figura 3.29, no observant-se l'eliminació de la timina veïna a la guanina platinada. En algun altre cas ja s'havia observat que els nucleòtids propers a la posició de platinació poden ser més difícils de digerir per part de les 5'-exonucleases (apartat 3.2.2).¹⁹ Aquests resultats van ser idèntics independentment de la via sintètica per la qual s'arribà a **IS-Pt-G1**, indicant per tant que s'obté el mateix producte platinat per ambdós camins.

En aquest punt ja es pot avançar que, posteriorment, es va estudiar l'estructura de **IS-Pt-G1** mitjançant RMN (apartat 3.3.3.2) i es va confirmar que el platí es troba coordinant les nucleobases esmentades. També es va veure que **IS-Pt-G1** és, de fet, una mescla dels dos isòmers constitucionals que resulten de la coordinació del metall als dos nitrògens imidazòlics.

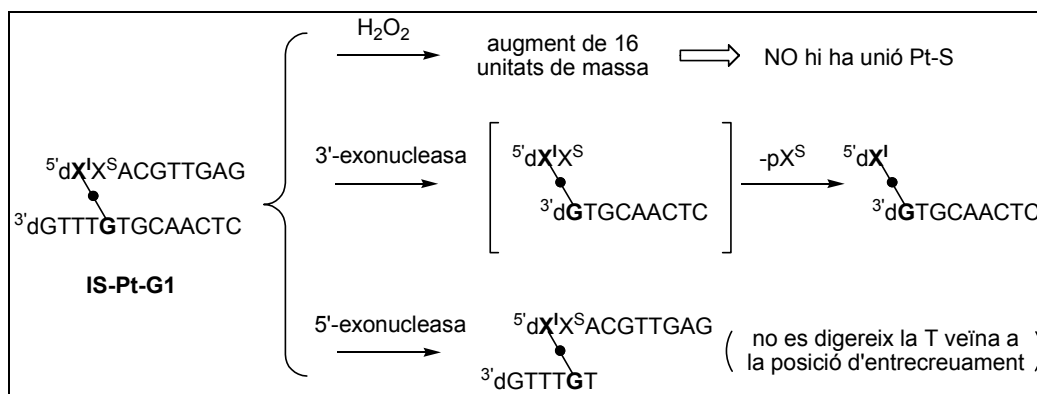


Figura 3.29. Esquema dels resultats de caracterització de l'adducte **IS-Pt-G1**.

És interessant comparar aquests resultats amb els obtinguts amb la metodologia de Leng.⁵ En aquell cas, realitzen la reacció d'entrecreuament seguint la via B, és a dir, partint de l'adducte (G1,G3)-intracadena prèviament aïllat (veure Figura 3.3). En posar en contacte aquest adducte amb la corresponent cadena complementària, té lloc la hibridació i seguidament es dona la reacció d'isomerització, que consideren que deu tenir lloc per atac directe de la citosina (complementària a la 5'G) sobre l'enllaç Pt-3'G. No sembla possible que la reacció transcorri mitjançant la formació d'un intermedi de tipus adducte monofuncional, pel fet que és independent de la concentració de sals en el medi. Ara bé, quan fan la reacció d'entrecreuament partint d'una mescla d'adductes monofuncionals (per coordinació del transplatí a cadascuna de les guanines de la seva seqüència), no observen la formació de l'adducte bifuncional (G1,G3)-intracadena, sinó que directament té lloc la formació d'adductes d'entrecreuament (Figura 3.30). Això els fa suposar, per tant, que la formació de l'adducte (G1,G3)-intracadena ha de ser més lenta que la reacció d'entrecreuament, en les condicions del seu assaig. Lògicament, en estar la cadena amb l'adducte monofuncional hibridada, té una flexibilitat més limitada i els quelats intracadena es formen menys fàcilment. En canvi, en el nostre cas, en realitzar la reacció d'entrecreuament partint de les dues cadenes oligonucleotídiques sense platinar, la coordinació inicial i ràpida al sofre dona lloc a la formació del quelat intracadena **IS-Pt1** a l'extrem de la cadena modificada, poc implicat en la formació del dúplex. Posteriorment, té lloc la migració del platí del tioèter a una posició nitrogenada de l'altra cadena del dúplex, concretament a la guanina que es troba en posició complementària a X^S.

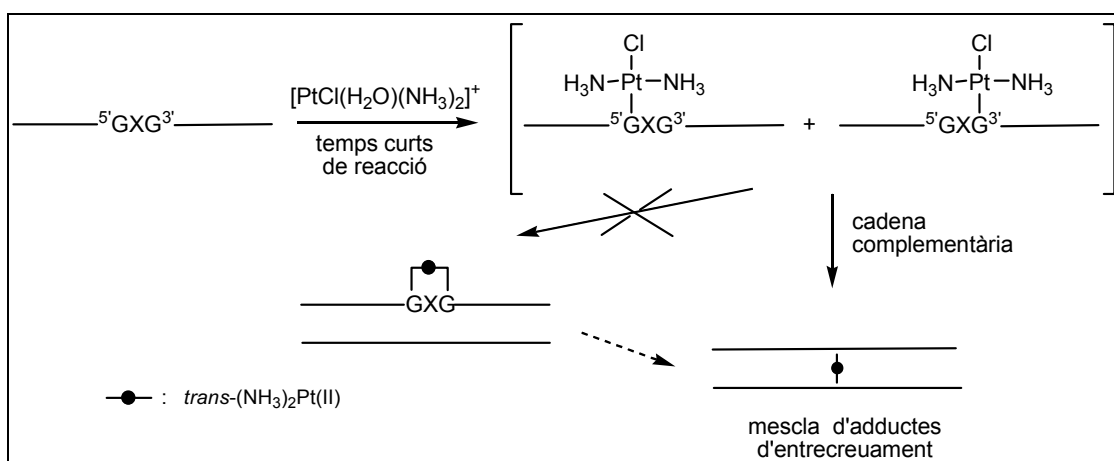
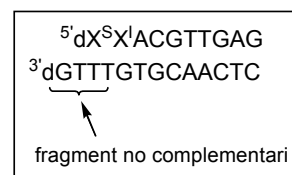


Figura 3.30. Formació d'una mescla de productes d'entrecreuament a partir dels adductes monofuncionals de la cadena antisentit (Leng i cols.).^{5b}

3.3.2 Reaccions d'entrecreuament entre l'oligonucleòtid SI i G1

Un cop comprovada la formació eficient d'adductes d'entrecreuament amb l'oligonucleòtid IS seguint les dues vies, el següent pas va ser realitzar el mateix estudi amb l'oligonucleòtid SI seguint les mateixes condicions experimentals (Figura 3.23).



Les reaccions d'entrecreuament es van dur a terme també a 16 °C per tal d'afavorir la hibridació de la doble cadena. Tot i que no es va determinar el valor de T_m en aquest cas concret, cal suposar que ha de ser pràcticament idèntic al del dúplex format per IS i G1.

S'obtingueren uns perfils cromatogràfics similars als de la reacció amb IS, de manera que partint de l'adducte intracadena **SI-Pt1** es va formar l'adducte **SI-Pt-G1** (veure Figura 3.31-B, t_R : 20.5 min), que en aquest cas sortí en forma de doble pic. A la reacció *in situ* partint de l'oligonucleòtid SI (via A), la presència d'adducte entrecruat **SI-Pt-G1** fou menor que per a la reacció amb IS. A més a més, es va detectar la formació de l'intermedi **SI-Pt1**, t_R : 2.9 min, la qual cosa indicava que també en aquest cas l'obtenció de l'entrecreuament passa pel mateix intermedi **SI-Pt1**. En la reacció amb l'adducte **SI-Pt1** preformat (via B), l'obtenció de l'adducte d'entrecreuament va ser més eficient que per a la via A, tant cinèticament com pel que fa al percentatge de producte generat. Tot i així, seguint la via B, la formació de l'adducte d'entrecreuament va tenir lloc en menor proporció que per a la reacció amb **IS-Pt1** en les mateixes condicions experimentals.

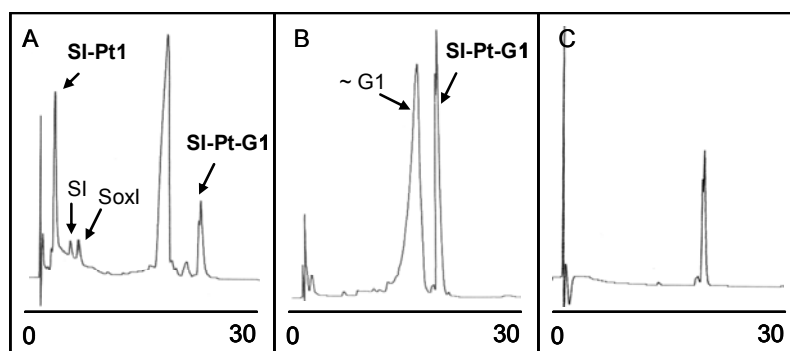


Figura 3.31. Perfils de HPLC de bescanvi aniónic al cap de 9 dies, de les reaccions SI + G1 + transplatí (A) i **SI-Pt1** + G1 (B).

En l'anàlisi per PAGE es pogué comparar, qualitativament, la diferent proporció d'adducte d'entrecreuament en les reaccions amb IS i amb SI (partint de les cadenes sense platinar, via A). Tal i com es mostra a la Figura 3.28, als 12 dies de reacció es detectava una banda menys intensa de l'adducte **SI-Pt-G1** (carril 6) que de **IS-Pt-G1** (carril 3), la qual cosa també s'havia observat per HPLC. L'adducte **SI-Pt1** tampoc es va mostrar estable a les condicions d'electroforesi, detectant-se majoritàriament la banda corresponent a l'oligonucleòtid SI sense platinar.

A la Figura 3.32 es resumeix el camí que es creu que segueix la formació de l'adducte d'entrecreuament **SI-Pt-G1**. Tot indica que es pot proposar una explicació del procés similar a la de la reacció anàloga amb la cadena IS, passant per un intermedi on el platí estaria coordinat a les dues modificacions, tot formant un dúplex amb la cadena complementària G1.

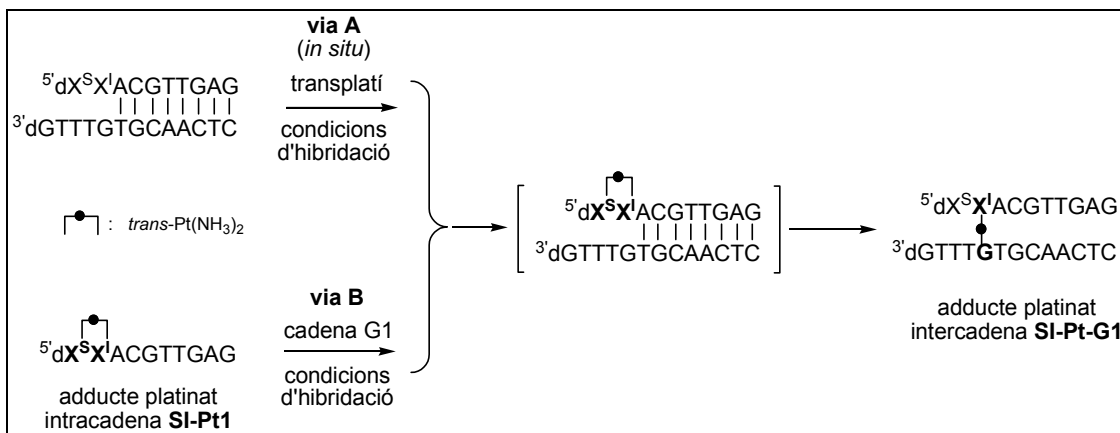


Figura 3.32. Esquema dels resultats obtinguts per a les dues vies de reacció emprades.

Els adductes **SI-Pt1** i **SI-Pt-G1** d'ambdues reaccions es van aïllar per HPLC de bescanvi aniònic, es van dessalar amb una columna Sep-Pak i liofilitzar, per tal de procedir a la seva caracterització. L'adducte amb el mateix temps de retenció que **SI-Pt1**, aïllat de la reacció d'entrecreuament seguint la via A, es va caracteritzar, posant-se de manifest que els resultats concorden amb els de l'adducte format inicialment en la reacció de platinació en presència exclusiva de la cadena SI, apartat 3.2.3.2). Altre cop, l'anàlisi de **SI-Pt-G1**, independentment de la via d'obtenció, va donar lloc a un doble pic, alhora que es va detectar un ~ 4 % d'adducte en forma oxidada (Figura 3.31-C).

Per a l'adducte d'entrecreuament **SI-Pt-G1**, per EM MALDI-TOF es va detectar la massa corresponent a les dues cadenes oligonucleotídiques i una unitat de $trans-Pt(NH_3)_2$, confirmant-se que es tracta d'un adducte bifuncional de tipus intercatenari. Per tractament oxidatiu, aquest adducte incrementà la seva massa en 16 unitats, indicant que el grup tioèter no es troba a l'esfera de coordinació del platí. Amb la 3'-exonucleasa, s'obtingué el fragment de digestió que es mostra a la Figura 3.33, de manera que el platí està coordinant X^I i la segona G de la cadena complementària, començant per l'extrem 3'. Amb la 5'-exonucleasa, es va detectar el fragment que es mostra a la mateixa figura, així com la pèrdua de X^S i de la T, en allargar el temps de digestió. Cal dir, però, que aquest resultat no va ser fàcil de reproduir. Per tant, es pot concloure que, a l'adducte **SI-Pt-G1**, el metall presenta les mateixes posicions de coordinació que al **IS-Pt-G1**.

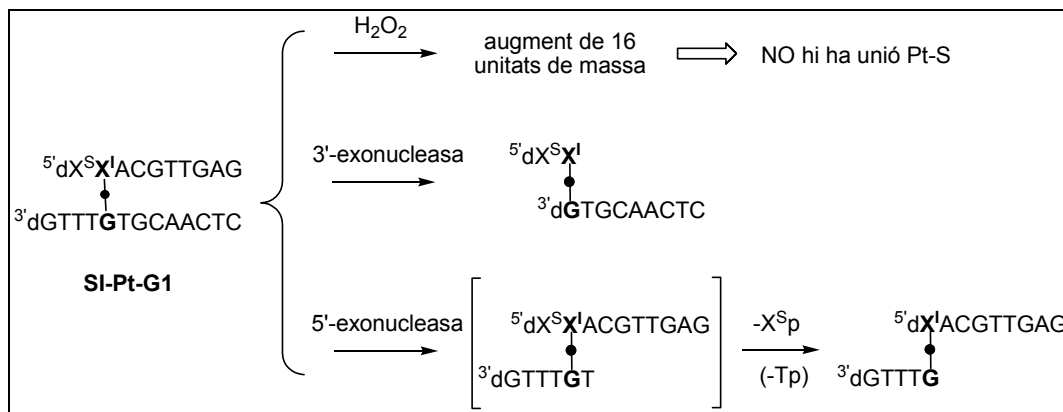


Figura 3.33. Esquema dels resultats de caracterització de l'adducte **SI-Pt-G1**.

En general, doncs, les reaccions d'entrecruament (tant per a IS com per a SI) tenen lloc més ràpidament partint de l'adducte intracadena preformat (veure Taula 3.2). Com ja s'ha dit, s'estableix l'entrecruament amb la cadena complementària G1, per coordinació a l'imidazole i a la guanina en posició "complementària" a la nucleobase platinada. De fet, per a SI la guanina està situada enfront de X^I , mentre que per a IS està enfrontada a X^S . A la vista dels resultats, s'obté més percentatge d'entrecruament quan la migració de l'àtom metàl·lic té lloc entre les dues nucleobases enfrontades (és a dir, per a la cadena IS, on X^S i G es troben en posició "complementària"). Quan es van aturar les reaccions d'entrecruament, encara es detectà adducte intracadena per a les reaccions seguint la via A, la qual cosa permet concloure que la menor formació d'entrecruament per a SI no té a veure amb un baix percentatge de platinació, sinó amb una major dificultat de migració de l'àtom metàl·lic.

reacció	via	% àrea pic d'entrecruament (12 dies)
IS + G1	A	21 %
IS-Pt1 + G1	B	41 %
SI + G1	A	11 %
SI-Pt1 + G1	B	26 %

Taula 3.2. Resum dels resultats de les reaccions d'entrecruament amb els oligonucleòtids SI i IS per a les dues vies assajades.

Tornant a les comparacions amb la metodologia de Leng i cols., ells no obtenen entrecruament quan l'adducte (G1,G3)-intracadena està en un extrem de la cadena antisentit.⁶ En el nostre cas, es demostra que la presència de les dues modificacions a l'extrem 5' de la cadena antisentit no impedeix que la reacció tingui lloc, tot i que aquesta presenta una cinètica molt més lenta. D'altra banda, la reacció d'entrecruament sempre dóna lloc al mateix adducte

entrecreuat final, prèvia coordinació als dos nucleòtids modificats, sigui quina sigui la via assajada.

Tot i que queda demostrat que les dues vies A i B donen lloc als mateixos adductes d'entrecreuament, cal remarcar que seguint la via A les reaccions són lògicament més lentes i incompletes. Tot i així, en els estudis posteriors es va treballar realitzant les reaccions *in situ* (via A), partint de les cadenes sense platinar i afegint el transplatí un cop té lloc la hibridació, ja que és un mètode més còmode i requereix una menor manipulació dels adductes platinats.

3.3.3 Reacció d'entrecreuament entre IS i G1 a gran escala

Es realitzà una síntesi a gran escala de l'adducte **IS-Pt-G1** per tal de dur a terme un estudi estructural mitjançant RMN. Tenint en compte els inconvenients de treballar amb HPLC en condicions de bescanvi aniònic, es van aconseguir optimitzar unes condicions en fase reversa que permeteren separar cromatogràficament el producte d'entrecreuament.

El seguiment de la reacció es va portar a terme mitjançant l'anàlisi d'alíquotes per HPLC en condicions optimitzades de fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: TEAAc 0.05 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 15 a 30 % de B en 30 min). A la Figura 3.34, es mostra el perfil del cru a la fi de la reacció i de l'adducte d'entrecreuament **IS-Pt-G1** aïllat (t_R : 24.5 min, 25.1 min). En aquestes condicions d'anàlisi, l'adducte **IS-Pt-G1** es detectà en forma de doble pic (mentre que per bescanvi aniònic no). Tal i com ja s'ha comentat, amb l'estudi estructural per RMN es pogué determinar que **IS-Pt-G1** està format per una mescla de dos isòmers constitucionals, ja que l'anell d'imidazole presenta dos nitrògens susceptibles de ser coordinats per l'àtom metàl·lic (el N τ i el N π).

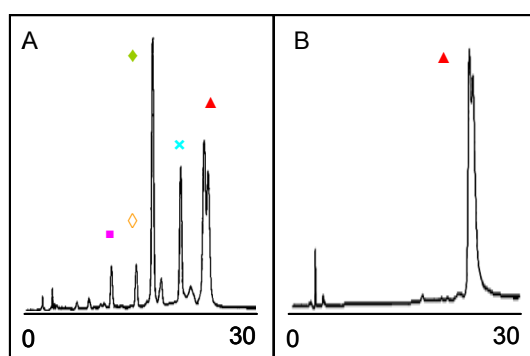


Figura 3.34. Perfils de HPLC en fase reversa del cru de la reacció d'entrecreuament entre IS i G1 a la fi de la reacció (A) i del producte d'entrecreuament purificat (B).

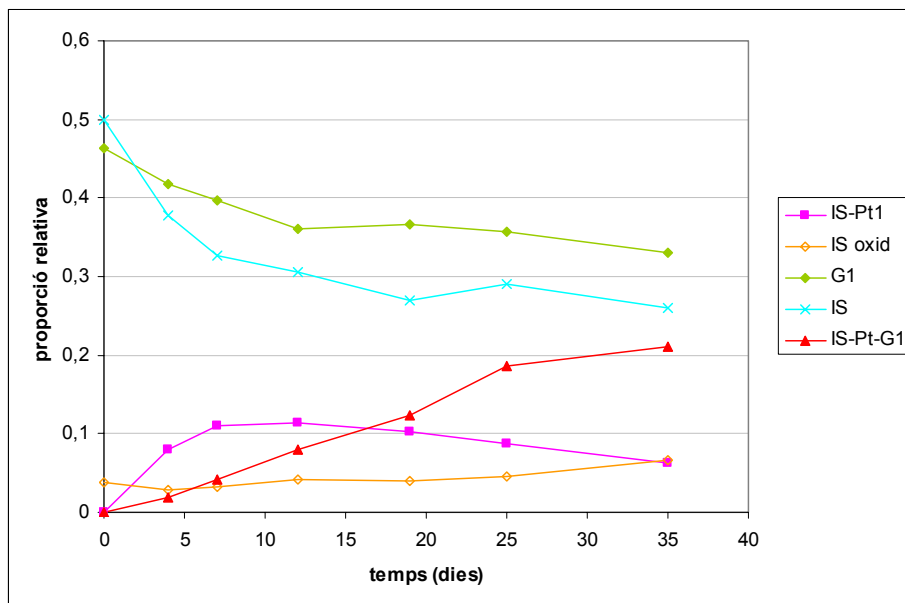


Figura 3.35. Gràfic que mostra la proporció relativa aproximada dels diferents productes detectats al llarg de la reacció d'entrecreuament entre IS i G1 a gran escala.

A la Figura 3.35 es mostra la proporció relativa dels diferents productes detectats al llarg de la reacció. Inicialment es detectà **IS-Pt1** (t_R : 12.5 min), el qual en el medi de reacció es trobaria hibridat amb la cadena complementària G1 (t_R : 16.5 min). La proporció relativa del pic de l'adducte intracadena no augmentà gaire al llarg de la reacció, pel fet que el producte es va anar consumint a mesura que el platí migrava del tioèter a la guanina "complementària". Als 35 dies es va aturar la reacció. Es va aïllar el producte entrecruat i es dessalà, obtenint 12.1 OD₂₆₀ de **IS-Pt-G1** (rendiment global del 31 %). Cal destacar que no es va detectar la formació de cap adducte intracadena que no fos **IS-Pt1** en quantitats apreciables. La possible formació d'adductes intracadena per coordinació a dues posicions nitrogenades sembla que no estaria afavorida en aquestes condicions experimentals, probablement pel fet que la cadena IS està hibridada a G1 i no presenta la mateixa flexibilitat que quan està sola.

Com ja s'ha comentat, les condicions emprades en aquest treball per obtenir oligonucleòtids antisentit units a la cadena complementària a través del platí són molt diferents de les posades a punt al grup de Leng. Les condicions que ells empraven per a la reacció d'entrecreuament són força variades, i depenen de la naturalesa de les cadenes oligonucleotídiques.^{5a} En general treballen a diferents concentracions de dúplex, dins de l'interval 2-20 μ M, en un medi tamponat de pH 7.5 (fosfat o Tris·HCl, 10 mM). Tot i que consideren que la presència de sals no afecta al curs de la reacció, empraven una concentració salina força més elevada que la nostra (500 mM de NaCl). La temperatura varia dels 15 als 37 °C.

Malgrat que Leng i cols. realitzen les reaccions d'entrecreuament partint de l'adducte intracadena GXG platinat, és interessant comparar els nostres resultats amb els que ells obtenen en un cas similar al nostre, és a dir, emprant dues cadenes d'àcid desoxiribonucleic

sense *mismatches* (desaparellaments). Tal i com es mostra a la Figura 3.36, obtenen una conversió superior al 95 % en dues setmanes de reacció. La velocitat de reacció no és gaire elevada, però la conversió és molt bona. Ja s'ha comentat que variant la naturalesa de les cadenes han arribat a obtenir conversions quantitatives en qüestió de minuts, emprant oligonucleòtids antisentit del tipus 2'-O-Me-ribo i un àcid ribonucleic com a cadena complementària.

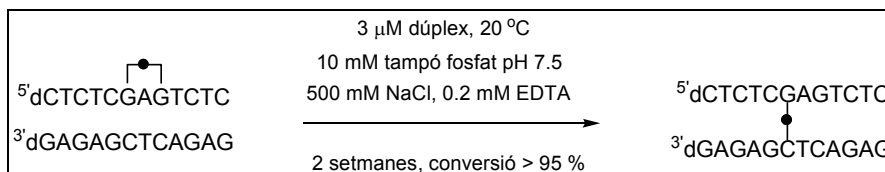


Figura 3.36. Reacció d'entrecreuament realitzada per Leng i cols.²²

En el nostre cas, es va obtenir poc més d'un 30 % d'entrecreuament després d'un mes de reacció, resultat pitjor però no menyspreable tenint en compte que tant la formació de l'adducte intracadena com l'entrecreuament tenen lloc *in situ*, i que el procés d'entrecreuament és més ràpid si es parteix de l'adducte intracadena preformat.

Seria interessant poder fer assajos emprant, per exemple, cadenes de naturalesa ribonucleotídica i complexos de platí amb estereoquímica *trans* més solubles, però aquests experiments queden ja fora de l'abast d'aquesta Tesi.

3.3.3.1 Estudi de l'estabilitat tèrmica de l'adducte IS-Pt-G1

En el capítol 1 s'ha descrit l'estudi de l'efecte de la incorporació dels nucleòsids modificats X^S i X^I en l'estabilitat d'una doble hèlix. Concretament, a l'apartat 1.5.2.2 s'han exposat els resultats obtinguts en comparar la temperatura de fusió (T_m) del díplex format pels oligonucleòtids IS i G1 respecte a diferents cadenes control. Es va considerar oportú, en aquest punt, comparar la T_m del díplex IS+G1 amb la de l'adducte d'entrecreuament **IS-Pt-G1**, per tal d'establir l'efecte de la unió a través d'una unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂ a l'estabilitat tèrmica de la doble cadena.

Es van determinar les dues temperatures de fusió, realitzant la desnaturalització tèrmica en una solució tampó 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7, 100 mM NaCl, i seguint el procediment experimental de l'apartat 4 de Materials i Mètodes. Les corbes obtingudes es mostren a la Figura 3.36, així com el valor de la temperatura de fusió (T_m) trobada per a cada díplex. A la Taula 3.3 es resumeixen els resultats experimentals.

codi	Dúplex	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
IS+G1	$[^5'dX^lX^sACGTTGAG] \cdot [^3'dGTTTGTGCAACTC]$	32.0	-
IS-Pt-G1	$[^5'dX^lX^sACGTTGAG] \cdot [^3'dGTTTGTGCAACTC]$ <i>trans</i> -Pt(NH ₃) ₂	72.0	+ 40.0

Taula 3.3. Valors de les T_m per als dos dúplexs en estudi. ΔT_m fa referència a la diferència en el valor de T_m de l'adducte **IS-Pt-G1** respecte al dúplex IS+G1 sense platinar.

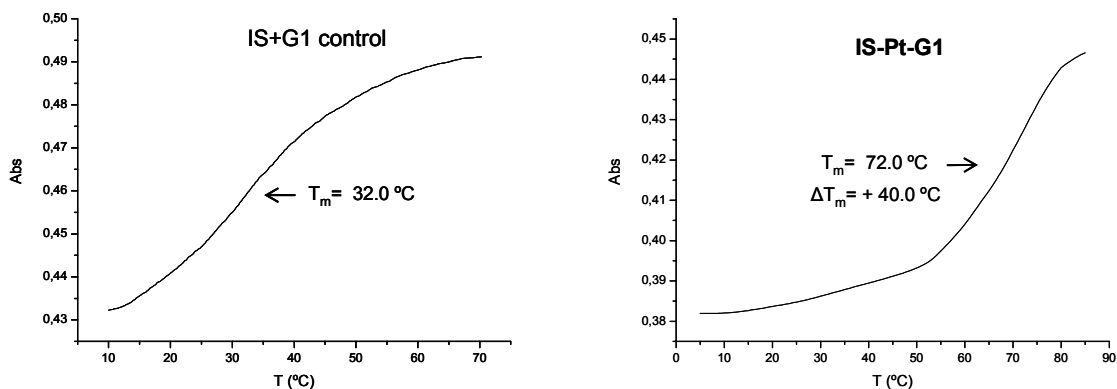


Figura 3.37. Corbes de fusió de l'adducte **IS-Pt-G1** i de la doble cadena IS+G1 sense platinar.

resultats bibliografia	resultats experimentals
_____ par	X ^l -X ^s _____ par
_____ ΔT _m = +11 °C	_____ ΔT _m = +40 °C
_____ ΔT _m = +14 °C	

Taula 3.4. Comparació esquemàtica dels resultats experimentals obtinguts en aquest treball i els publicats a la bibliografia per a un dúplex 15mer.²³

Tal i com es pot observar, l'entrecreuament amb una unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂ dóna lloc a un gran increment en la temperatura de fusió del dúplex, de +40 °C. A la literatura hi ha publicades les T_m de dos dúplexs (20mer²⁴ i 15mer²³) entrecreuats també amb una unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂. En ambdós casos, la coordinació del platí té lloc entre una guanina i la seva citosina complementària. En el cas del 20mer, la unió intercadena es troba en posició central, mentre que en el 15mer no està igual de lluny dels dos extrems (es troba al quart parell de bases començant per un dels extrems del dúplex). L'augment en l'estabilitat tèrmica en aquests dos exemples no és pas tan notori com en el nostre, i és de +5 °C i +11 °C, respectivament. Per al 15mer també s'ha descrit, a més a més, la T_m del mateix dúplex incorporat a una estructura

amb un fragment de cinc timines unint les dues cadenes per un extrem ($\Delta T_m + 14^\circ\text{C}$, Taula 3.4). Els autors han comprovat que la T_m del dúplex entrecreuat és molt similar a la del dúplex de tipus forqueta, de manera que conclouen que bàsicament l'increment d'estabilitat tèrmica és degut al fet que la separació de les dues cadenes és un procés bimolecular per al dúplex control i monomolecular per als altres. És a dir, en el cas del dúplex control, la fusió comporta passar d'una única espècie (el dúplex) a dues cadenes per separat, mentre que tant en el dúplex entrecreuat amb la unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂ com en el del dúplex de tipus forqueta, la separació de les dues cadenes no provoca un augment de molècules en solució. En el nostre cas, la gran diferència en T_m pot ser en gran part deguda al fet que el dúplex IS+G1 de referència conté un extrem més obert, conseqüència del no aparellament de les dues bases modificades X^I i X^S amb les nucleobases en posició complementària (tal i com s'ha posat de manifest en els estudis per RMN).

3.3.3.2 Estudi estructural per RMN de l'adducte IS-Pt-G1

La ressonància magnètica nuclear (RMN) és una tècnica que proporciona un elevat grau de detall sobre l'estructura dels àcids nucleics, similar a la difracció de raigs X, però amb la diferència que la RMN dóna informació de l'estructura que es té en solució i no en estat cristal·lí. A més a més, permet obtenir informació dinàmica, aspecte especialment important en el cas dels àcids nucleics, que solen presentar regions d'elevada flexibilitat conformacional.

A nivell d'estudi estructural per RMN d'oligonucleòtids platinats i, concretament, en el cas de dúplex amb un entrecreament del tipus *trans*-Pt(NH₃)₂, hi ha publicats dos treballs. En el primer,²² es tracta de la resolució de l'estructura d'un dúplex de dotze parells de bases amb una unió entre una guanina i una citosina en posició pràcticament central, que és un bon exemple de l'adducte majoritari que es forma quan el transplatí reacciona amb DNA de doble cadena (veure Figura 3.36). L'altre cas correspon a l'entrecreament d'un dúplex 12/11-mer de DNA, on el metall es coordina al N7 d'una guanina i, excepcionalment, al N1 d'una adenina en posició "complementària".²⁵ De fet, es tracta d'un cas estudiat per Leng i col·laboradors ja comentat, on en posició complementària al triplet 5'dGXG se situa exclusivament un doblet 3'dAT perquè s'ha vist que dóna lloc més ràpidament a la formació de l'adducte intercadena.

En el nostre cas, es volgué comparar l'estructura del dúplex format per la cadena IS i la complementària G1 amb i sense la unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂ fent de pont entre les dues. Tot seguit es resumeixen els resultats més rellevants d'aquest estudi, realitzat pel Sr. Jaime López de la Osa sota la direcció del Dr. Carlos González al "Instituto de Química Física Rocasolano" (CSIC, Madrid). A l'annex 2, es mostren dos fragments d'un espectre bidimensional NOESY de l'adducte **IS-Pt-G1**. A la Figura 3.38, s'especifica la numeració de les nucleobases emprada per a aquest treball concret.

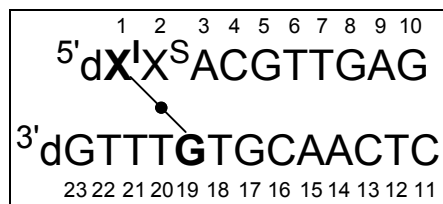


Figura 3.38. Numeració de les bases del dúplex entrecreuat per a l'estudi per RMN. La mateixa numeració s'ha utilitzat per al dúplex control. X^I i X^S s'anomenen I1 i S2, respectivament.

La formació de l'entrecreuant amb una unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂ es reflecteix en una variació força gran dels desplaçaments químics de G19 i, en menor grau, de I1, S2, A3, C4 (força menor), T18 i T20. En tots aquests nucleòtids s'observa, a més a més, duplictat de senyals. Aquesta duplictat de senyals no és deguda a un bescanvi químic entre les dues formes, perquè no s'observa coalescència dels senyals en escalfar. Sens dubte, es tracta dels dos isòmers constitucionals derivats de les dues possibles unions del platí als nitrògens de l'anell d'imidazole de I1. El protó H4/5 de l'anell d'imidazole de l'estructura no platinada ressona a 6.95 ppm, i la coordinació del metall a cadascun dels nitrògens provoca un corriment a camps més alts (6.66 i 6.75 ppm). D'altra banda, els senyals que més es desplacen, respecte a l'espectre del dúplex control IS+G1, són els H8 de G19, que passen de δ 7.79 ppm a 8.40 i 8.54 ppm. Aquest desplaçament a camps més baixos és un indicador molt clar de la coordinació del platí al N7 d'aquesta guanina.²⁶ Per tant, es pot concloure que l'adducte **IS-Pt-G1** està composta per una mescla dels dos isòmers constitucionals que resulten de la coordinació del platí(II) a cadascun dels nitrògens de l'anell d'imidazole i al N7 de la guanina "enfrentada" a X^S (G19). Aquests resultats confirmen, doncs, l'elucidació estructural efectuada mitjançant digestions enzimàtiques i tractament oxidatiu (veure Figura 3.39).

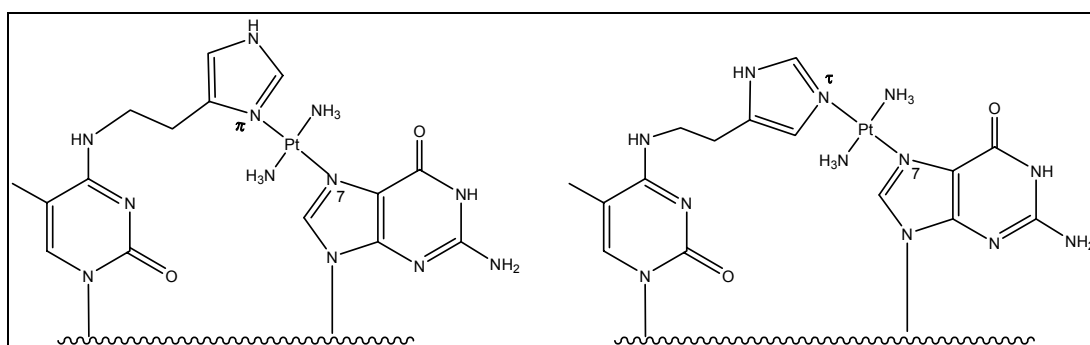


Figura 3.39. Coordinació del platí(II) a cadascun dels nitrògens imidazòlics i al N7 de la guanina G19.

A partir d'aquest estudi estructural per RMN, també s'ha pogut determinar que els parells de bases a partir dels nucleòsids 3-18 i fins al 10-11, estan formats (tant en l'estructura control com en el producte d'entrecreuant). S'observen alguns NOEs entre l'imidazole i protons de

la T18, però en general no hi ha NOEs suficients com per intentar calcular i refinar l'estructura. En qualsevol cas, sembla que la regió de l'extrem 3' monocatenari no presenta una estructura gaire definida. Respecte als lligands ammina del platí, ressonen a 4.06 i 4.20 ppm, i es veuen pics de correlació amb el protó aromàtic de G19 en H₂O.

3.3.4 Reaccions d'entrecreuament entre G1 i diferents cadenes modificades

En aquest punt, es va voler comparar a nivell qualitatiu la diferent capacitat de formació d'entrecreuaments en funció de la cadena modificada utilitzada. Per aquest motiu, emprant altre cop la cadena complementària G1, es realitzaren en paral·lel les reaccions amb les cadenes modificades que es mostren a la Taula 3.5. Es volia avaluar la capacitat de formar adductes d'entrecreuament en absència d'una de les dues nucleobases modificades o quan X^S es troba en forma oxidada, essent l'experiment control (CLC) aquell en què la cadena antisentit no presenta cap modificació. Els assajos de platinació es van realitzar per addició del transplatí un cop havia tingut lloc la hibridació de les dues cadenes, tal i com s'explica al protocol general a la part experimental.

reacció	oligonucleòtid modificat	% àrea pic d'entrecreuament (15 dies)
CLS	5'dX ^S ACGTTGAG	29 %
CLI*	5'dX ^I ACGTTGAG	2 %
CLIS	5'dX ^I X ^S ACGTTGAG	22 %
CLSI*	5'dX ^S X ^I ACGTTGAG	7 %
CLC*	5'dCACGTTGAG	no es detecta
CLSox*	5'dX ^{Soxid} ACGTTGAG	1 %
CLISox*	5'dX ^I X ^{Soxid} ACGTTGAG	2 %
CLSoxI*	5'dX ^{Soxid} X ^I ACGTTGAG	5 %

Taula 3.5. Resultats de les reaccions d'entrecreuament entre diferents cadenes antisentit modificades i l'oligonucleòtid complementari G1. * Es va addicionar un total de 2 eq de transplatí.

Les reaccions es van seguir per HPLC de bescanvi aniònic, per poder comparar els corresponents perfils cromatogràfics entre sí i amb els dels experiments anteriors (Figura 3.37). Per a la majoria d'assajos que es recullen a la taula, als 9 dies es va addicionar un segon equivalent de transplatí, degut al baix percentatge de producte d'entrecreuament detectat. Només per a CLS i per a CLIS no fou necessari aquest excés de platí. Tal i com es mostra a la Taula 3.5, les tres cadenes modificades que presenten el nucleòsid X^S van donar lloc, en major o menor grau, a adductes d'entrecreuament, mentre que amb la resta de cadenes antisentit

pràcticament no se'n va formar. Això posa de manifest que en presència del medi tamponat (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.0), que conté NaCl en concentració 100 mM, el transplatí no és gaire reactiu. Com ja s'ha discutit anteriorment, això és degut a la concentració de clorurs i al pH del medi (predominen les formes amb els lligands hidroxó i cloro, vegeu Taula 2.1 del capítol 2). Quan la cadena oligonucleotídica presenta un grup tioèter, la reacció pot tenir lloc gràcies a l'elevada reactivitat d'aquest per donar lloc a una unió Pt-S que, per efecte *trans*, afavoreix la immediata formació d'un adducte bifuncional. Com s'ha vist a l'apartat anterior, en el cas de les cadenes IS i SI, inicialment es forma un adducte intracadena sobre l'oligonucleòtid modificat per després donar lloc als adductes termodinàmicament més estables, de tipus intercadena. Per a l'assaig amb CLI, la pràcticament nul·la participació de l'imidazole fa pensar que el tipus d'adductes obtinguts serien els típics que es formen per reacció del transplatí amb un DNA de doble cadena.^{17,27} Així, doncs, en una primera etapa hi hauria la coordinació del metall a una guanina (en aquest cas, n'hi ha sis en total) i, a continuació, aquests adductes monofuncionals evolucionarien per donar lloc a entrecreuaments (en principi, entre cada G i la seva corresponent C complementària). En les condicions experimentals emprades, la quantitat d'adductes d'entrecreuament va ser mínima, inferior a la detectada en d'altres experiments, i per això no es van caracteritzar.

El cas de la reacció amb l'oligonucleòtid que només presenta la modificació X^{S} (CLS) és molt sorprenent. Tot i que per HPLC es va detectar un elevat percentatge d'adductes d'entrecreuament (Figura 3.37-A), en l'anàlisi del cru per electroforesi pràcticament no es visualitzà cap banda d'adducte intercadena (Figura 3.38, carril 2). En el procés d'aïllament per HPLC i dessalatge, els productes no van resultar ser gaire estables, la qual cosa concorda amb la baixa intensitat de la banda corresponent a adducte intercadena. Per tractament amb H_2O_2 , els adductes no es van oxidar, posant de manifest que el tioèter es troba coordinant al metall, i possiblement per aquest motiu no són estables al procés d'aïllament i dessalatge. La nostra hipòtesi és que, en aquest cas, en presència del dúplex, el transplatí reacciona molt favorablement amb el tioèter situat a l'extrem 5' de la cadena antisentit i podria ser que ràpidament es formés un adducte intercadena per coordinació a la guanina en la posició "complementària", que és la que està més a prop, i també pel fet que això suposaria una mínima distorsió de la doble hèlix. La ràpida detecció d'un adducte d'entrecreuament per HPLC i la seva baixa estabilitat durant l'aïllament avalen aquesta hipòtesi, de manera que el producte d'entrecreuament majoritari format no seria res més que un adducte intercadena cinèticament molt afavorit, amb una coordinació del tipus S-Pt-N. Es podria esperar que tingués lloc la migració del platí del sofre a una posició nitrogenada, però probablement caldria una major distorsió del dúplex, de manera que no s'observa. Recordant els treballs d'Orgel i col·laboradors,³ només detecten reaccions "suïcida" (intracadena) quan la cadena antisentit presenta una guanina molt propera al grup fòsforotioat, la qual cosa concorda amb el fet que, en el dúplex, el transplatí preferentment dona lloc a adductes intercadena.

Respecte als assajos CLIS i CLSI, és notori el diferent percentatge de formació d'entrecreament detectat tant per HPLC com per electroforesi. Es confirmen els resultats obtinguts als apartats 3.3.1 i 3.3.2, de manera que l'entrecreament té lloc més favorablement per a la cadena IS (probablement l'etapa de migració es dona més fàcilment en aquest cas). Cal dir, però, que la conversió a adductes entrecreuat en aquest cas va ser més baixa que en els assajos anteriors mencionats.

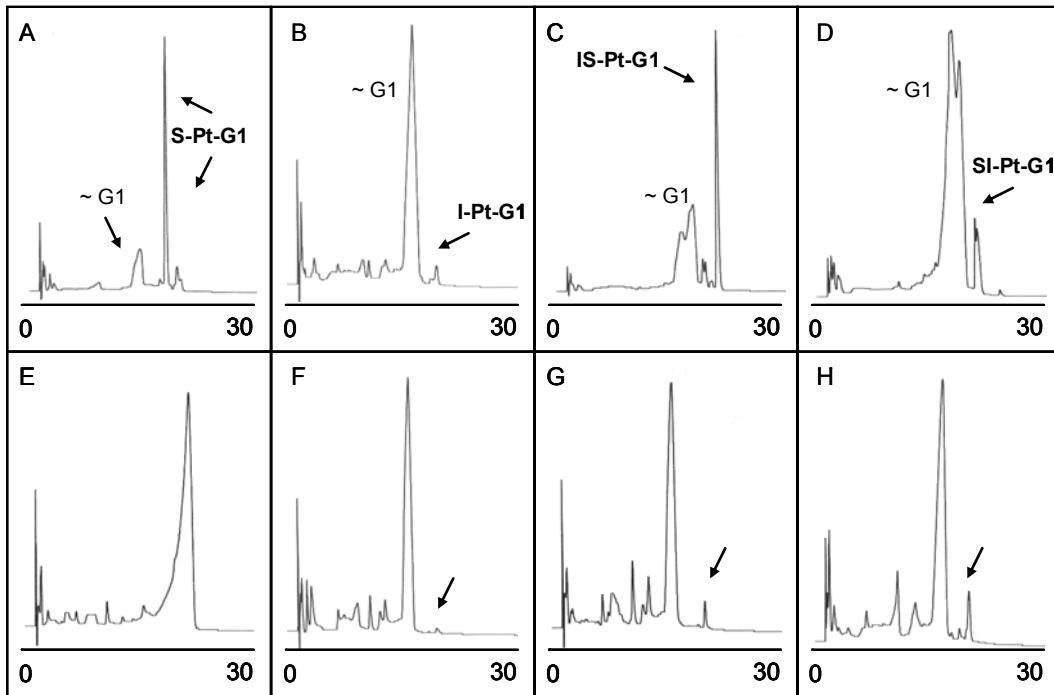


Figura 3.40. Perfils de HPLC de bescanvi anònic als 15 dies de reacció: CLS (A), CLI (B), CLIS (C), CLSI (D), CLC (E), CLSox (F), CLISox (G) i CLSoxI (H).

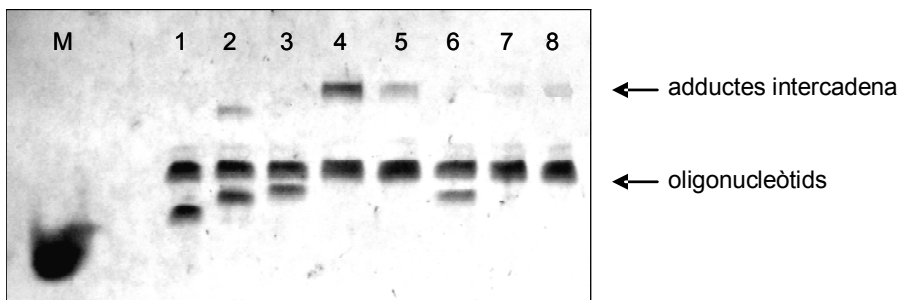


Figura 3.41. Gel de poliacrilamida als 13 dies de reacció: CLC (1), CLS (2), CLI (3), CLIS (4), CLSI (5), CLSox (6), CLISox (7) i CLSoxI (8).

Pel que fa a les reaccions amb X^S en forma oxidada o bé amb el dúplex control sense cap modificació, en general, per HPLC es van obtenir percentatges d'entrecreament pràcticament negligibles, tot i afegir 2 eq de transplatí, excepte per a les reaccions CLISox i CLSoxI, on es

detectà un pic en molt baixa proporció. Mitjançant PAGE, es va confirmar l'absència de banda d'entrecreuament per a les reaccions CLC i CLSox, mentre que per a CLISox i CLSoxl sí que es visualitzà una tènue presència de banda corresponent a algun tipus d'adducte intercadena (Figura 3.38). En cap d'aquests casos es va intentar aïllar el pic cromatogràfic corresponent al possible producte d'entrecreuament, degut a la baixa proporció en què es van obtenir. Tenint en compte que el sofre es troba en forma de sulfòxid, és de suposar que els adductes d'entrecreuament detectats corresponen bàsicament a adductes intercadena G-C. Aquests resultats tornen a confirmar la gran importància del grup tioèter del nucleòsid X^S, tant per dirigir la platinació com per accelerar les cinètiques. La rellevància de X^I també s'ha vist demostrada amb els resultats de CLS.

3.3.5 Reaccions d'entrecreuament entre IS i diferents cadenes complementàries

Per completar la informació obtinguda, es va estudiar l'efecte de la posició d'una guanina en la zona monocatenària de la cadena complementària en la formació dels entrecreuaments. Tots els assajos previs s'havien realitzat emprant la cadena G1, perquè inicialment s'havia suposat que la guanina de l'extrem 3' seria ideal per tal que s'establís l'entrecreuament. Tal i com ja s'ha vist, no és pas aquesta guanina, sinó la més propera a la zona de les nucleobases modificades, la que es coordina al platí. De tota manera, es va estudiar l'evolució de la reacció entre la cadena modificada IS (que és la que ha donat millors resultats) i cinc seqüències complementàries diferents, tal i com es mostra a la Taula 3.6.

reacció	cadena complementària a 5'dX ^S ACGTTGAG	% àrea pic d'adducte intracadena (19 dies)*	% àrea pic d'entrecreuament (19 dies)
CLCN	3'dGTGCAACTC	no es detecta	13 %
CLG1	3'dGTTTGTGCAACTC	6 %	26 %
CLG2	3'dTGTTGTGCAACTC	37 %	14 %
CLG3	3'dTTGTGTGCAACTC	16 %	20 %
CLG4	3'dTTTGGTGTGCAACTC	9 %	24 %

Taula 3.6. Resultats de les reaccions d'entrecreuament entre l'oligonucleòtid IS i diferents cadenes complementàries (CN, G1, G2, G3 i G4). * Aquests valors no són absoluts, ja que part de l'adducte intracadena podria sortir en forma de dúplex en el pic ample.

Tal i com s'observa a la Figura 3.42, els perfils de HPLC van ser molt similars per als diferents assajos, detectant-se un pic cromatogràfic a t_R llargs que va correspondre a adductes de tipus intercadena. Per a CCN, com que la cadena complementària és més curta, els pics cromatogràfics van sortir desplaçats a t_R menors. Per a CG2, sorprèn el fet que la cadena G2 es detectà correctament, alhora que és el que va donar lloc a menor producte entrecreat. Es

podria pensar que, tot i que G2 presenta el mateix tipus de complementarietat que les altres cadenes en estudi, la formació de la doble cadena no està tan afavorida, de manera que la reacció d'entrecreuament també es veuria afectada. Tal i com s'exposa a la Taula 3.6, el menor percentatge d'entrecreuament no està relacionat amb un baix percentatge de platinació, ja que per HPLC és el que va mostrar més adducte de tipus intracadena.

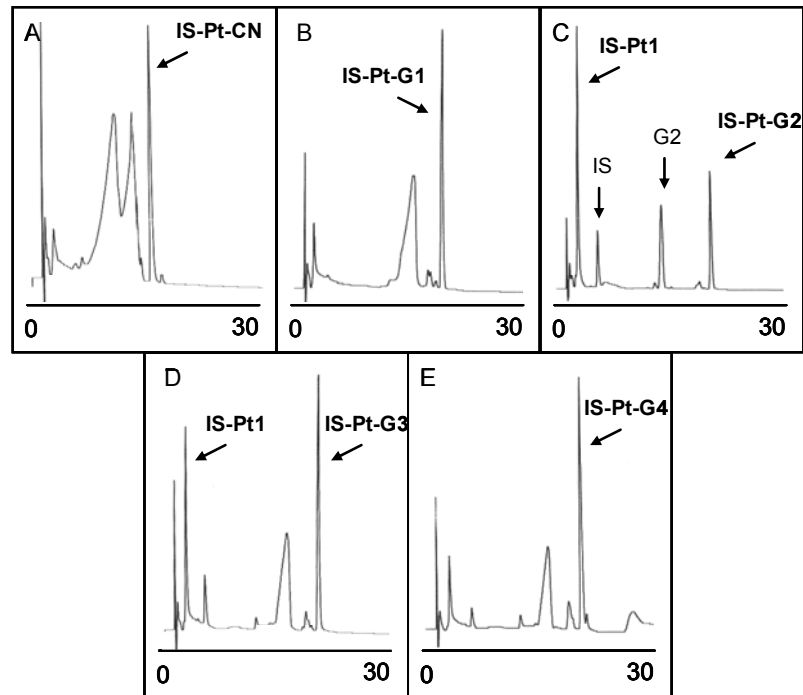


Figura 3.42. Perfils de HPLC de bescanvi aniónic als 14 dies de reacció d'entrecreuament entre IS i diferents cadenes complementàries: CLCN (A), CLG1 (B), CLG2 (C), CLG3 (D), CLG4 (E).

L'anàlisi mitjançant PAGE també va permetre comparar la diferent intensitat de les bandes d'entrecreuament (Figura 3.43). Per a CLCN (carril 2), l'adducte intercadena **IS-Pt-CN** va presentar una major mobilitat electroforètica que la resta d'entrecreuaments perquè la cadena complementària és quatre nucleobases més curta.

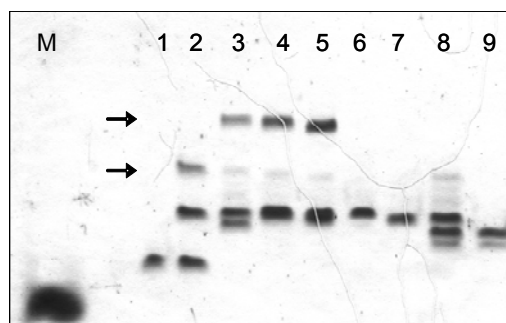


Figura 3.43. Gel de poliacrilamida als 14 dies de reacció: oligonucleòtid CN (1), reacció CLCN (2), CLG2 (3), CLG3 (4), CLG4 (5), oligonucleòtid G4 (6), oligonucleòtid IS (7). Els carrils 8 i 9 corresponen a l'anàlisi de l'oligonucleòtid 12-mer i del cru CL12mer, dels que es parla a l'apartat 3.3.6.

L'aïllament dels diferents adductes intercadena es va realitzar per HPLC de bescanvi aniònic, dessalant les mostres amb columnes Sep-Pak. Es van reanalitzar els adductes per PAGE, detectant exclusivament la banda d'entrecreuament en tots els casos (Figura 3.44). Per HPLC, els adductes presentaven un petit percentatge de la corresponent forma oxidada, la qual cosa ja indicava, altre cop, que el sofre no intervé en la coordinació del metall, podent ser oxidat per l'oxigen atmosfèric. Tot i així, la presència d'aquest subproducte no va afectar a la caracterització de les posicions de coordinació mitjançant els enzims.

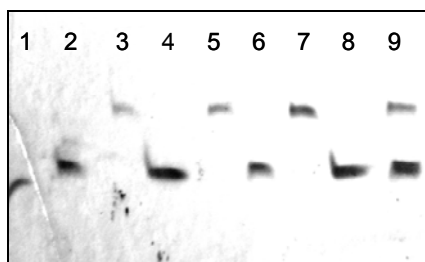


Figura 3.44. Gel de poliacrilamida corresponent a l'anàlisi de l'oligonucleòtid G2 (1), adducte **IS-Pt1** (2), adducte **IS-Pt-G2** (3), oligonucleòtid G3 (4), adducte **IS-Pt-G3** (5), oligonucleòtid IS (6), adducte **IS-Pt-G4** (7), oligonucleòtid G4 (8), cru de reacció CLG1 als 14 dies (9).

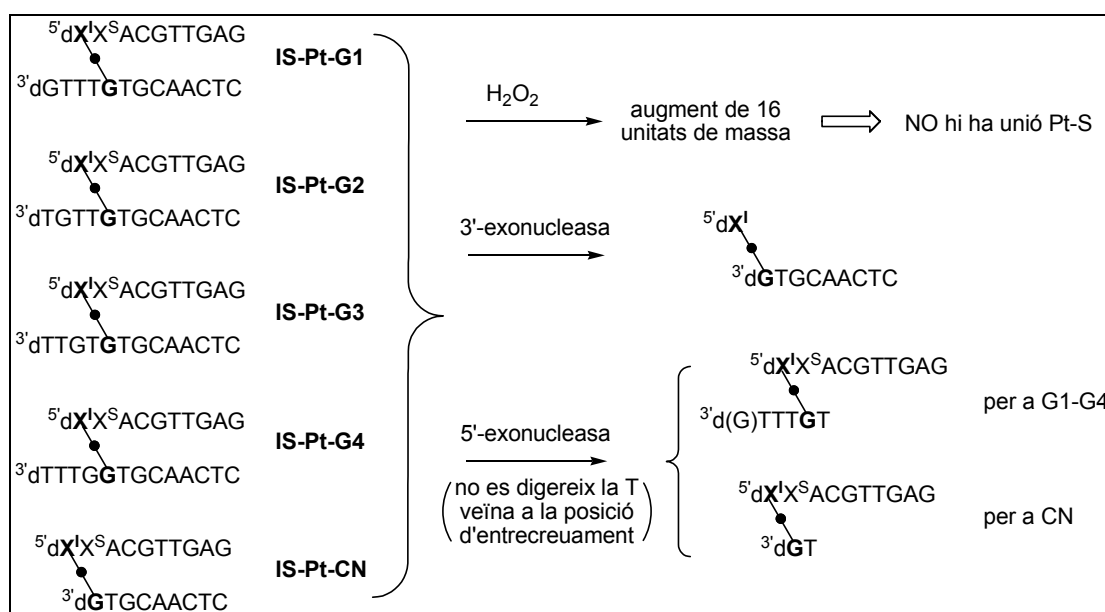


Figura 3.45. Resum dels resultats obtinguts en la caracterització estructural dels adductes d'entrecreuament entre IS i diferents cadenes complementàries.

La clau per a la caracterització estructural d'aquests adductes va ser el fet de poder comparar els resultats entre cadenes complementàries tan similars. El dubte més important a resoldre era si a l'adducte **IS-Pt-G4** les nucleobases coordinades al platí són les mateixes que a **IS-Pt-G1**, pel fet que hi ha dues guanines molt properes a l'espai. Tot i així, en tots els casos es va arribar

al mateix tipus de fragments de digestió, tal i com es mostra a la Figura 3.45. Curiosament, en la digestió amb la 5'-exonucleasa, en cap cas es va detectar la pèrdua de la timina veïna a la guanina platinada. Els resultats dels tractaments amb la 3'-exonucleasa van indicar que la coordinació, en tots els casos, és a X^I i a la G situada en posició complementària al nucleòsid X^S . Així, doncs, la reacció d'entrecreuament té lloc de manera selectiva sempre amb la mateixa guanina, la que és "complementària" a X^S . S'ha de recordar, però, que dels estudis de RMN (veure apartat 3.3.3.2) es va determinar que no hi ha aparellament entre X^S i aquesta G. De fet, cal no oblidar tampoc que Leng i col·laboradors han observat reaccions d'entrecreuament més ràpides quan el triplet GXG es troba enfrontat a un *mismatch* (desaparellament) del tipus 3AU (només amb dues nucleobases).

3.3.6 Estudis control amb IS i cadenes de seqüència no complementària

Un aspecte important de cara a una possible aplicació terapèutica dels oligonucleòtids platinats és esbrinar si la reacció d'entrecreuament tan sols té lloc si hi ha aparellament amb la cadena complementària. Per això, es van realitzar tres assajos emprant cadenes de seqüència no complementària a IS i de llargària diferent (oligòmers de 10, 12 i 15 nucleòtids, veure Taula 3.7).

reacció	cadena no complementària	% àrea d'adducte intracadena (19 dies)	% àrea d'entrecreuament, (19 dies)
CL10mer	3dGCCATATAGGC	37 %	no es detecta
CL12mer	3dCGATGCTTACCA	31 %	no es detecta
CL15mer	3dTTTCAGAAAATCTAG	34 %	no es detecta

Taula 3.7. Resultats dels assajos d'entrecreuament emprant l'oligonucleòtid IS i tres cadenes de seqüència no complementària de llargària diferent (10mer, 12mer i 15mer).

El seguiment de les reaccions mitjançant HPLC de bescanvi aniònic va posar de manifest la formació del corresponent adducte intracadena per reacció del transplatí amb la cadena IS, però en cap moment va donar lloc a adductes d'entrecreuament entre ambdues seqüències, fos quina fos la llargària de l'oligonucleòtid (veure Figura 3.46). No es va caracteritzar cap adducte mitjançant enzimatiques, perquè només es pretenia determinar si es formava entrecreuament amb la cadena complementària. L'oligonucleòtid 10mer, de seqüència autocomplementària, es detectà en forma de pic ample per HPLC de bescanvi aniònic. L'anàlisi per PAGE de la reacció CL12mer (Figura 3.43, carrils 8 i 9) va permetre arribar a les mateixes conclusions que per HPLC, ja que no es va visualitzar cap banda corresponent a producte d'entrecreuament.

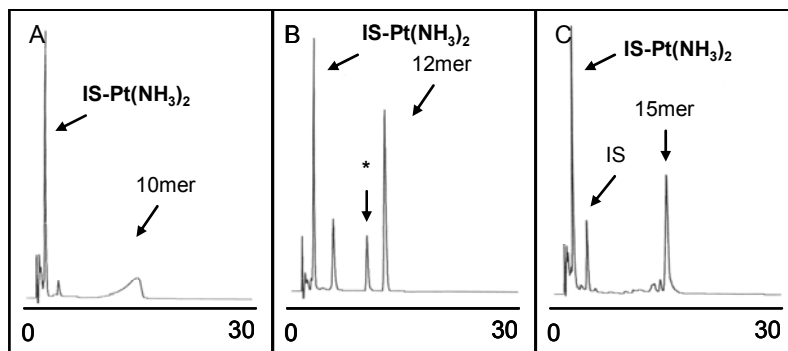


Figura 3.46. Perfils de HPLC de bescanvi aniónic als 14 dies de reacció del transplatí amb IS i diferents cadenes de seqüència aleatòria: CL10mer (A), CL12mer (B) i CL15mer (C). * Correspon a una impuresa de deleció d'un nucleòtid de l'oligonucleòtid 12mer.

Seria raonable que, en aquests casos, l'adducte **IS-Pt1** evolucionés, en el transcurs del temps, donant lloc a altres adductes on el platí es coordinés a dues posicions nitrogenades, tal i com s'ha descrit per a la reacció de l'oligonucleòtid IS a l'apartat 3.2.3.1 (tot i que en aquell cas no hi havia ions clorur en el medi). Si hagués estat el cas, en aquestes condicions d'anàlisi per bescanvi aniónic no hauria estat possible separar els diferents adductes intracadena, pel fet que surten a un t_R molt baix i seria difícil resoldre'ls.

El fet que no hi hagi entrecruament si no hi ha complementarietat permet validar aquesta metodologia, mostrant que és necessària la formació de la doble hèlix per tal que es doni la migració de l'àtom de platí de la posició sulfurada a una de nitrogenada de l'altra cadena. Aquesta reacció és suficientment lenta com perquè no tingui lloc de forma inespecífica enfront d'una diana que no sigui la complementària. Cal tenir en compte, com ja s'ha dit, que la migració del metall és regioselectiva a la guanina en posició enfrontada a X^S .

3.4 BIBLIOGRAFIA

¹ Vlassov, V.V.; Gorn, V.V.; Ivanova, E.M.; Kazakov, S.A.; Mamaev, S.V. *FEBS Lett.* **1983**, *162*, 286-289.

² a) Strothkamp, K.G.; Lippard, S.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 2536-2540. b) Elmroth, S.K. C.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3633-3634. c) Elmroth, S.K. C.; Lippard, S.J. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 5234-5243. d) Kjellström, J.; Elmroth, S.K. C. *Chem. Commun.* **1997**, 1701-1702. e) Kjellström, J.; Elmroth, S.K. C. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 6193-6199. f) Kjellström, J.; Elmroth, S.K. C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 38-44.

³ Chu, B.C.F.; Orgel, L.E. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 5163-5171.

⁴ a) Gruff, E.S.; Orgel, L.E. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 6849-6854. b) Farrell, N.; Qu, Y.; Feng, L.; Van Houten, B. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9522-9531.

- ⁵ a) Giraud-Panis, M.-J.; Leng, M. *Pharmacology & Therapeutics* **2000**, *85*, 175-181. b) Dalbiès, R.; Payet, D.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8147-8151.
- ⁶ Malinge, J.M.; Leng, M. *Cisplatin-Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* **1999**, B. Lippert (Ed.), Zurich: Verlag Helvetica Chimica Acta, 159-180.
- ⁷ Escaffre, M.; Chottard, J.-C.; Bombard, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5222-5228.
- ⁸ Boudvillain, M.; Guérin, M.; Dalbiès, R.; Saison-Behmoaras, T.; Leng, M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2925-2931.
- ⁹ a) Perrier, S.; Seela, F.; Schwartz, A.; Leng, M.; Chottard, J.-C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 1641-1644. b) Aupeix-Scheidler, K.; Chabas, S.; Bidou, L.; Rousset, J.-P.; Leng, M.; Toulmé, J.-J. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 438-445.
- ¹⁰ a) Janik, M.B.L.; Lippert, B.; Leng, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 645-653. b) Müller, J.; Drumm, M.; Boudvillain, M.; Leng, M.; Sletten, E.; Lippert, B. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 603-611.
- ¹¹ Berghoff, U.; Schmidt, K.; Janik, M.; Schröder, G.; Lippert, B. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *269*, 135-142.
- ¹² Schmidt, K.S.; Boudvillain, M.; Schwartz, A.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Reedijk, J.; Lippert, B. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5566-5570.
- ¹³ a) Schliepe, J.; Berghoff, U.; Lippert, B.; Cech, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 646-648. b) Manchanda, R.; Dunham, S.; Lippard, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5144-5145. c) Schmidt, K.S.; Filippov, D.V.; Meeuwenoord, N.J.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Lippert, B.; Reedijk, J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 375-376.
- ¹⁴ Zoltewicz, J.A.; Clark, D.F.; Sharpless, T.W.; Grahe, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1741-1749.
- ¹⁵ a) Heetebrij, R.J.; Tromp, R.A.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Reedijk, J. *Chem. Commun.* **1999**, 1693-1694. b) Heetebrij, R.J.; de Kort, M.; Meeuwenoord, N.J.; den Dulk, H.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Reedijk, J. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1823-1827.
- ¹⁶ Martin, R.B. *Cisplatin-Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* **1999**, B. Lippert (Ed.), Zurich: Verlag Helvetica Chimica Acta, 183-205.
- ¹⁷ Boudvillain, M.; Dalbiès, R.; Aussourd, C.; Leng, M. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2381-2388.
- ¹⁸ Escaffre, M.; Favre, A.; Chottard, J.-C.; Bombard, S. *Analytical Biochemistry* **2002**, *310*, 42-49.
- ¹⁹ Bernardi, A.; Bernardi, G. *The Enzymes* (3rd edn.), ed. P.D. Boyer, Academic Press, New York, **1971**, vol. 4, 329-336.
- ²⁰ Marchán, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1-8.
- ²¹ a) Barnham, K.J.; Djuran, M.I.; Murdoch, P.S.; Sadler, P.J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 721-722. b) Barnham, K.J.; Djuran, M.I.; Murdoch, P.S.; Randford, J.D.; Sadler, P.J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1995**, 3721-3726. c) Chen, Y.; Guo, Z.; Murdoch, P.S.; Zang, E.; Sadler, P.J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 1503-1508. d) Teuben, J.M.; van Boom, S.S.G.E.; Reedijk, J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 3979-3980. e) Fröhling, C.D.W.; Sheldrick, W.S. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 4411-4420. f) van Boom, S.S.G.E.; Chen, B.W.; Teuben, J.M.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1450-1455. g) Wolters,

D.; Sheldrick, W.S. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 1121-1129. h) Teuben, J.M.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 463-468. i) Marchán, V.; Moreno, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Chem Eur. J.* **2001**, *7*, 808-815.

²² Paquet, F.; Boudvillain, M.; Lancelot, G.; Leng, M. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4261-4268.

²³ Hofr, C.; Brabec, V. *Biopolymers* **2005**, *77*, 222-229.

²⁴ Hofr, C.; Brabec, V. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9655-9661.

²⁵ Andersen, B.; Bernal-Méndez, E.; Leng, M.; Sletten, E. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 1201-1210.

²⁶ a) Kozelka, J.; Fouchet, M-H.; Chottard, J-C. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 895-906. b) Andersen, B.; Sletten, E. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *79*, 353-358.

²⁷ Brabec, V.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5345-5349.