

## *CAPÍTOL I- INTRODUCCIÓ*



## 1. EL DNA I LA SEVA ESTRUCTURA

Els àcids nucleics tenen un paper molt important en els organismes vius. Són molècules clau en la transmissió, expressió i conservació de la informació genètica. Actualment es té molta informació sobre el DNA, sobre el seu mecanisme de funcionament, la seva estructura, propietats, etc. Tot això però, és el resultat d'estudis que es van iniciar ja fa molts anys:

L'any 1869, Fritz Miescher, va ser el primer en aïllar DNA dels nuclis de pus. El paper del DNA com a portador del material genètic va ser proposat l'any 1944 per Avery *et al.* mentre que l'any 1949, Erwin Chargaff demostrà que la composició de el DNA varia d'una espècie a l'altra i postulà també que en el DNA, la quantitat de la base adenina és molt semblant a la base timina i el mateix per la guanina i citosina.

Ja en aquest període es va veure que per entendre bé moltes de les incògnites de el DNA calia conèixer la seva estructura química, les interaccions que hi governaven, etc. L'any 1951 Rosalind Franklin va descriure dues formes diferents del DNA, la forma B i la forma A però no va ser fins el 1952 que ella mateixa juntament amb Raymond Gosling i al laboratori de Maurice Wilkins, van aconseguir un patró de difracció bo de la forma B del DNA. L'obtenció d'un model que expliqués aquest espectre no va ser fins l'any 1953 per James Watson i Francis Crick. En aquest moment es va tenir la primera constància de la doble hèlix que forma el DNA (Watson i Crick, 1953).

La cristal·lografia de raigs X és una de les tècniques que permet realitzar un estudi estructural més detallat de les molècules. L'interès de conèixer millor aquesta molècula tan important que és el DNA, així com els avenços tecnològics i metodològics de la cristal·lografia de raigs X, ha fet possible la resolució amb aquesta tècnica de moltes estructures d'oligonucleòtids a resolucions que en alguns casos arriben a ser atòmiques.

## 2. COMPONENTS DEL DNA

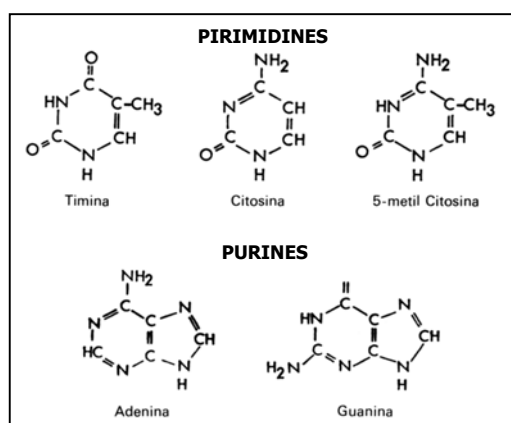
Per entendre bé l'estructura d'una hèlix de DNA és important conèixer els components que la formen. El DNA o àcid desoxiribonucleic està format per nucleòtids. Aquests consten de tres parts: una base, un sucre i un fosfat. A continuació es detalla cada una d'aquestes parts:

### Bases

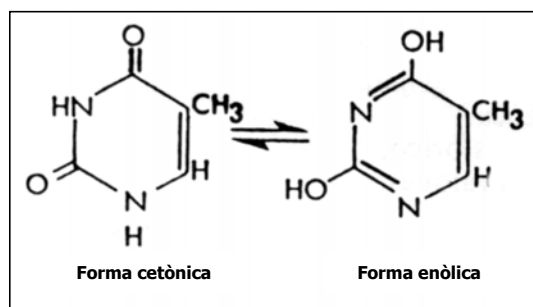
Hi ha dos grups de bases nitrogenades, les purines i les pirimidines. Les purines estan formades per dos anells aromàtics nitrogenats i són la guanina (G) i l'adenina (A). Les pirimidines en canvi, estan formades només per un heterocicle i són la timina (T), citosina (C) i uracil (U) (Fig. I-2.1).

Una característica important de les bases és que poden donar un tautomerisme ceto-enòlic. Això pot repercutir en alguna de les seves activitats biològiques ja que la formació de ponts d'hidrogen pot variar segons la forma que adopti la base. Un exemple d'aquest tautomerisme es mostra a la figura I-2.2.

Els àtoms d'hidrogen dels grups amino de les bases actuen com a donadors de ponts d'hidrogen mentre que els oxígens dels grups carbonil i els nitrògens dels anells poden actuar d'acceptors. Les bases són planes degut a l'aromaticitat dels seus anells. Tant la capacitat de formar ponts d'hidrogen com la planaritat i aromaticitat dels anells són propietats importantíssimes de les bases pel seu paper en la formació de la doble hèlix del DNA.



**Fig. I-2.1.** Fórmula química de les bases nitrogenades presents en el DNA (Subirana, 1985).

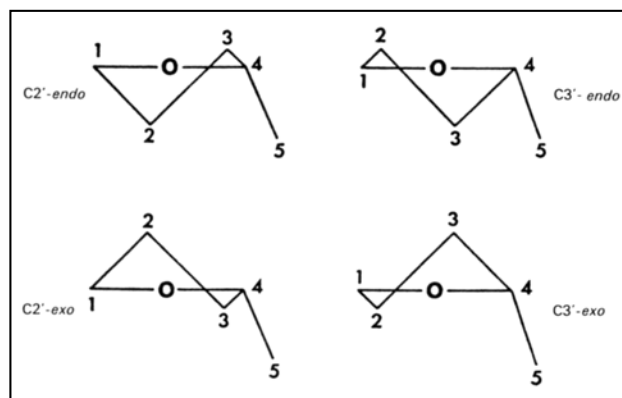


**Fig. I-2.2.** Tautomerisme ceto-enòlic de les pirimidines, concretament la timina (Subirana, 1985).

## Sucres

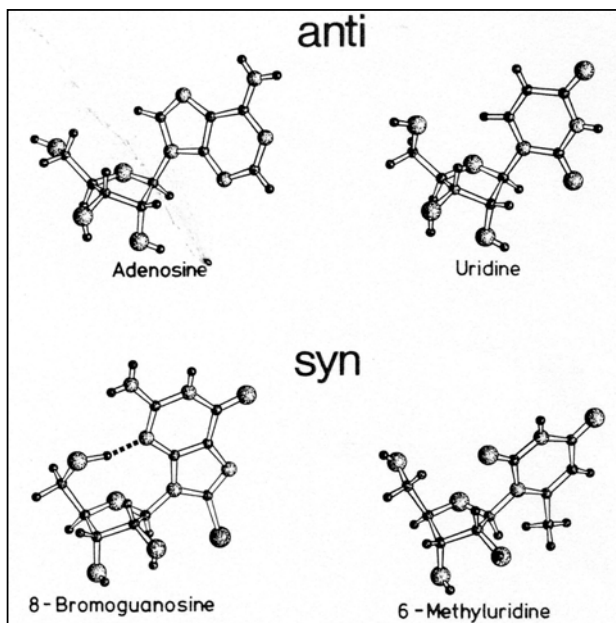
La molècula de sucre que constitueix el DNA és la  $\beta$ -D-2-desoxiribosa, que és un derivat de la  $\beta$ -D-ribose on s'ha substituït un grup hidroxil (OH) per un hidrogen a la posició 2'.

Els sucres són la part més flexible i mòbil de la molècula de DNA. Aquests poden adoptar dues conformacions en funció del seu plegament: la forma *exo* i la forma *endo* cadascuna de les quals té també dues formes segons l'àtom afectat. Les possibilitats conformacions dels sucres en el DNA són moltes. A la figura I-2.3 es mostra un esquema de les quatre principals, però el DNA presenta en realitat moltes situacions intermitges:



**Fig. I-2.3.** Quatre conformacions principals dels sucres en el DNA (Subirana, 1985).

Degut també a la flexibilitat del sucre i depenent de l'enllaç glicosídic, les bases poden adoptar dues conformacions: *syn* i *anti* (Fig. I-2.4). En la conformació *syn*, la part més voluminosa de l'anell s'orienta en direcció al sucre mentre que en la conformació *anti* s'orienta en direcció oposada a aquest.

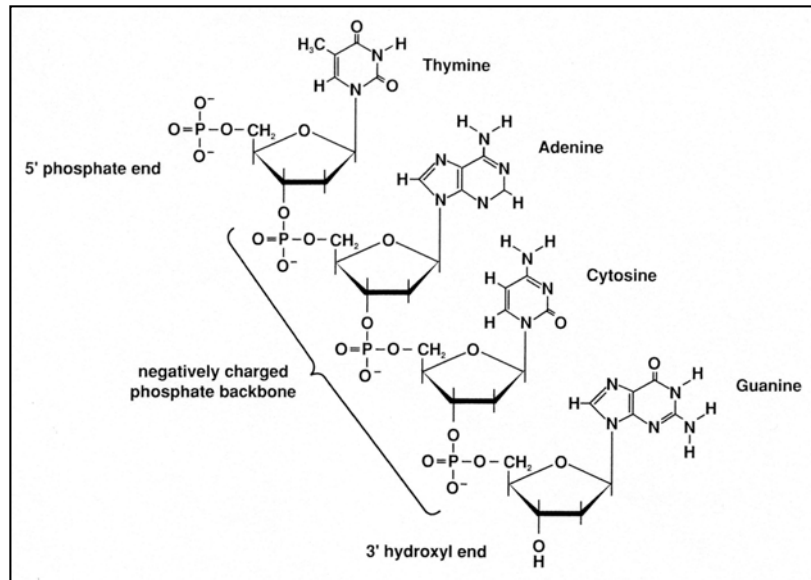


**Fig. I-2.4.** Possibles conformacions *syn* i *anti* que poden adoptar els nucleòsids (sucre i base) (Saenger, 1984).

## Fosfats

Els diferents nucleòtids que formen el DNA estan units a través d'un enllaç fosfodiéster: s'uneix un carboni 3' del sucre d'un nucleòtid amb un carboni 5' del sucre d'un altre nucleòtid com es mostra a la figura I-2.5. Per tant, un polinucleòtid té dos extrems diferents, el 3' i el 5', amb unes propietats químiques i biològiques diferents.

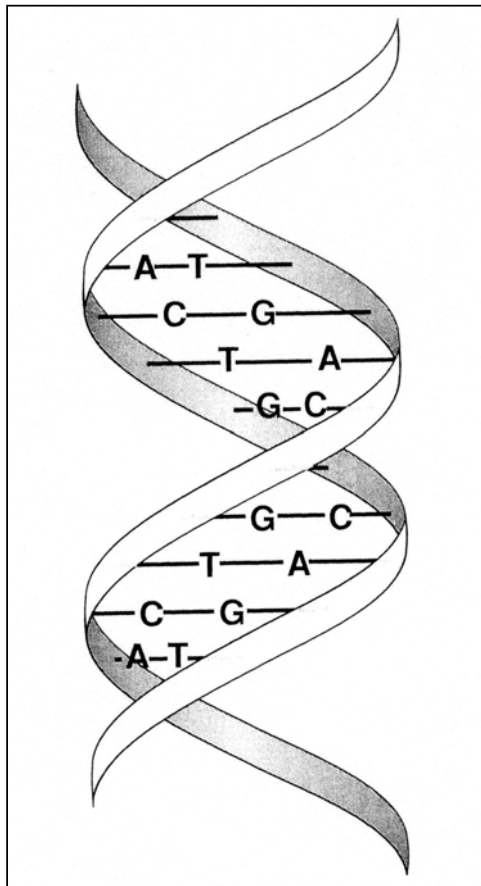
Els fosfats són els responsables de donar la càrrega negativa a la molècula de DNA, característica molt important d'aquesta.



**Fig. I-2.5.** Cadena de DNA formada per les bases timina, adenina, citosina i guanina (Sinden, 1994).

### 3. ESTRUCTURA DE LA DOBLE HÈLIX

Watson i Crick van ser els primers a proposar el model de la doble hèlix del DNA (Fig. I-3.1). Un DNA dúplex estàndard és una hèlix dextrogira formada per dues cadenes senzilles d'oligonucleòtids alineats de forma antiparal·lela: una cadena va en la direcció 5'→3' i l'altra en la direcció 3'→5'.

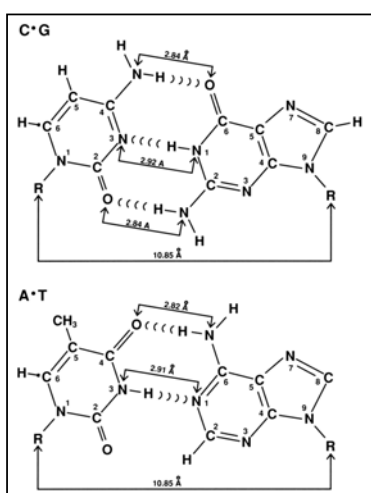


**Fig. I-3.1.** Estructura de la doble hèlix descrita per Watson i Crick (Sinden, 1994).

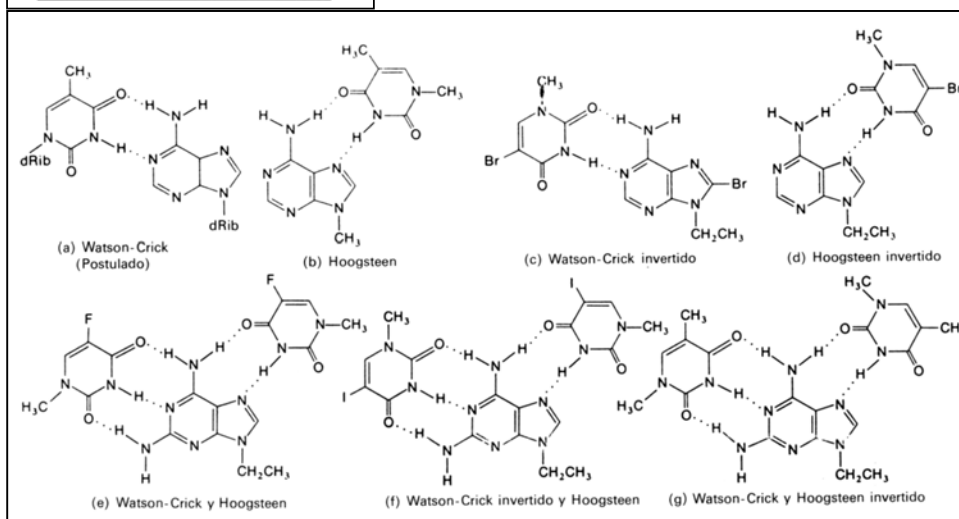


Hi ha dues interaccions importants que són les causants de l'estabilitat d'una doble hèlix de DNA: els ponts d'hidrogen entre les bases (aparellament entre bases) i l'apilament entre aquestes.

Les bases de diferents cadenes interaccionen entre elles a través de ponts d'hidrogen i seguint la complementarietat de les bases C amb G i T amb A. El mode d'aparellament estàndard és el descrit per Watson i Crick a on la citosina i guanina formen tres ponts d'hidrogen i la timina i adenina en formen dos (Fig. I-3.2). Hi ha però altres tipus d'aparellaments com per exemple els anomenats Hoogsteen o Hoogsteen invers. Uns exemples d'aquests aparellaments es mostren també a la figura I-3.2:



**Fig. I-3.2.** Aparellaments entre bases. A l'esquerra es mostra l'aparellament Watson i Crick per les bases C:G i A:T (Sinden, 1994). A la part inferior es mostren els tipus d'aparellament trobats en cristalls formats per derivats d'adenina i d'uracil (Subirana, 1985).



L'altra força estabilitzadora de la doble hèlix és l'apilament entre les bases. L'aromaticitat d'aquestes fa que siguin planes i es puguin apilar a través d'interaccions hidrofòbiques i forces de Van der Waals.

L'energia d'estabilització deguda als ponts d'hidrogen entre les bases depèn de la composició de la seqüència, tots els parells de bases A·T tenen energies semblants i el mateix passa amb els parells C·G. En canvi, l'energia d'estabilització deguda a l'apilament de les bases depèn de la seqüència, per exemple, l'energia corresponent a 5' GT no és la mateixa que la 5' TG (Ornstein *et al.*, 1978).

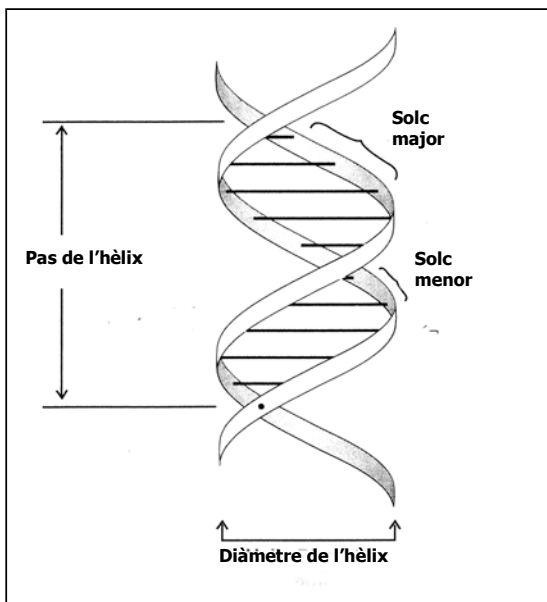
### Paràmetres de la doble hèlix

L'estructura del DNA es pot descriure mitjançant uns paràmetres que defineixen la doble hèlix (Dickerson *et al.*, 1989). Alguns d'aquests són (Fig. I.3.3):

Número de residus per volta: és el número de parells de bases necessaris per tal de que la hèlix giri 360°.

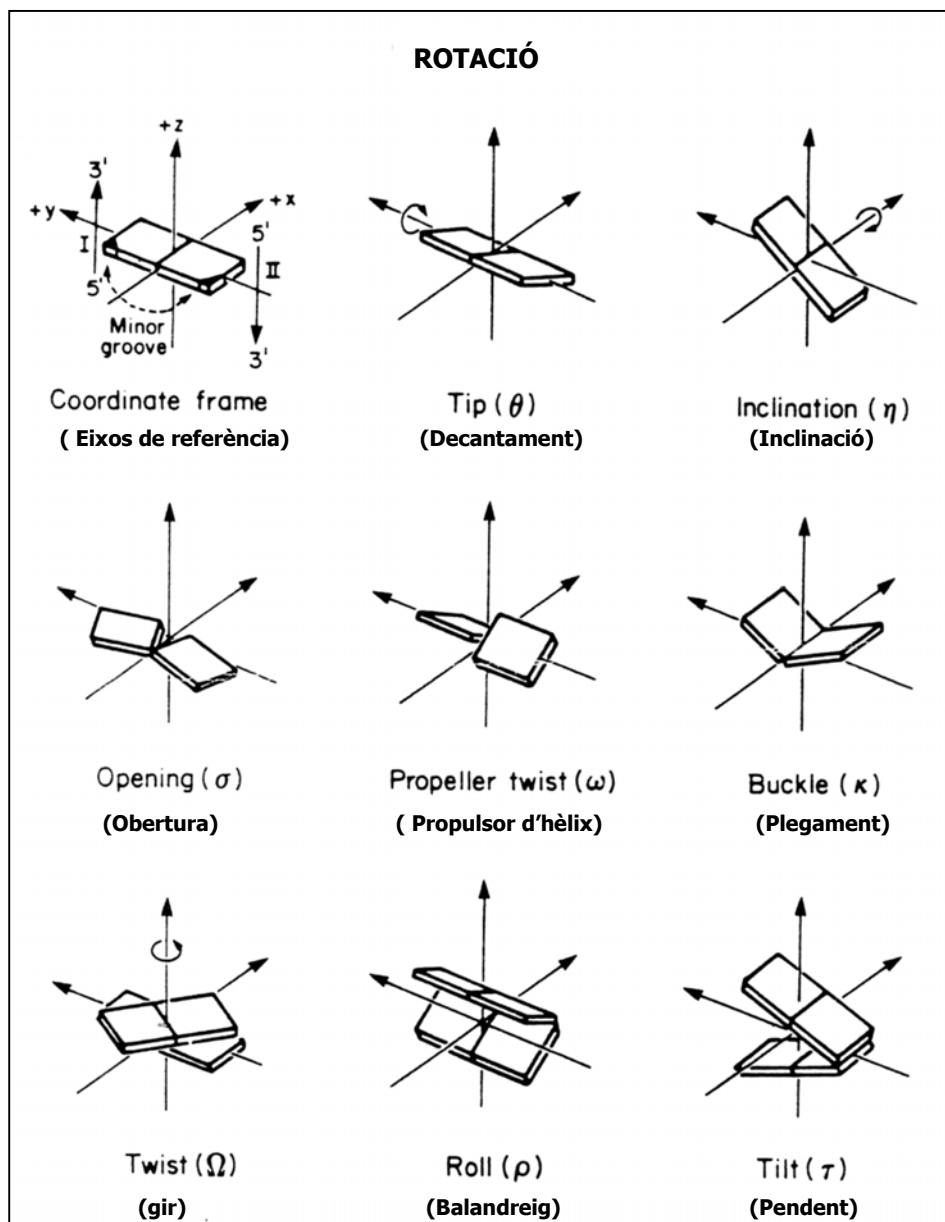
Pas de l'hèlix: longitud d'una volta completa de DNA.

Solc menor i solc major: una característica molt important del DNA és la formació de dos solcs, el major i el menor de mides i característiques diferents. Aquestes diferències són molt importants a l'hora d'interaccionar amb altres molècules com poden ser fàrmacs o proteïnes (Seeman *et al.*, 1976).

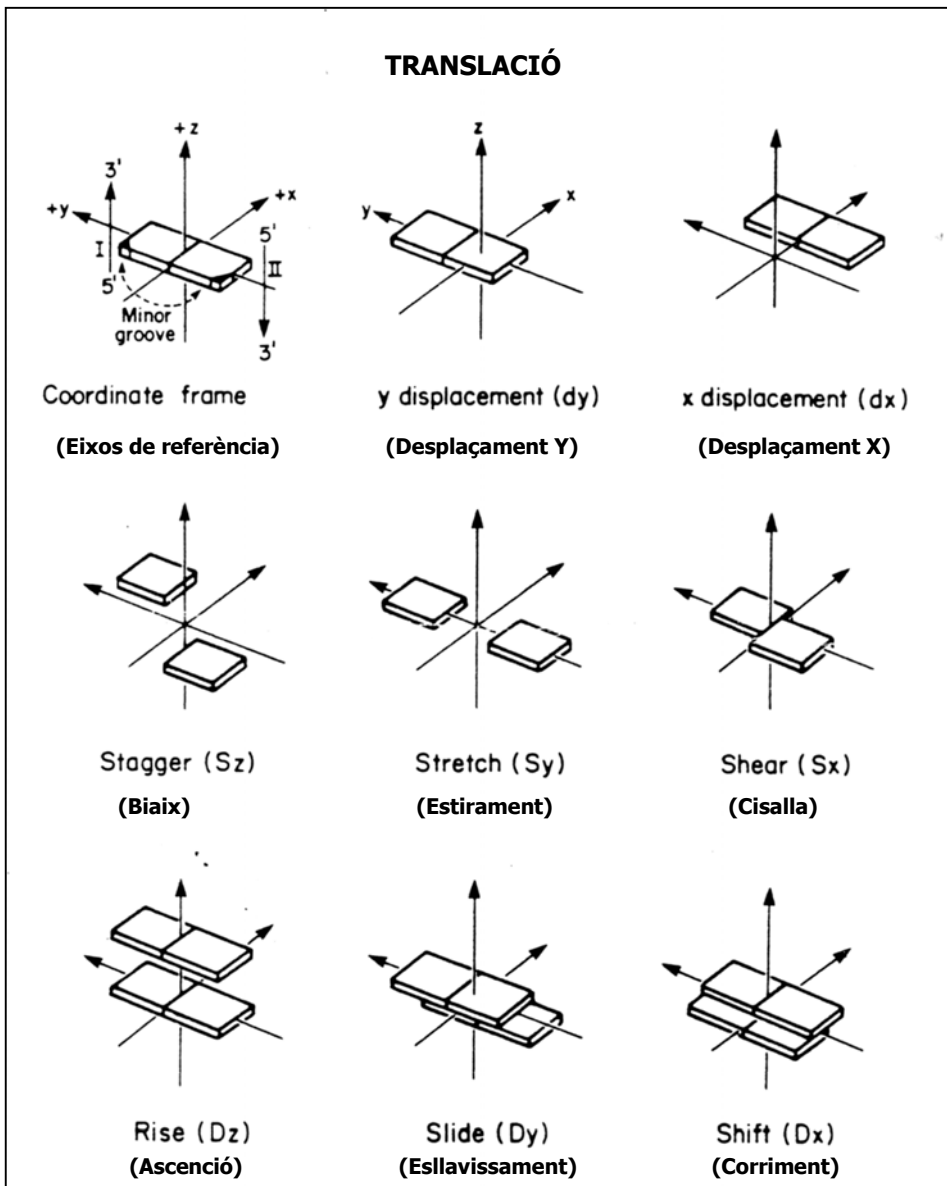


**Fig. I-3.3.** Representació d'alguns dels paràmetres que caracteritzen una hèlix (Sinden, 1994).

Altres termes que defineixen una hèlix es mostren a les figures I-3.4 i I-3.5. Aquests són els paràmetres de rotació i translació entre un parell de bases o dos parells de bases successius. Els més importants són el gir i l'ascenció.

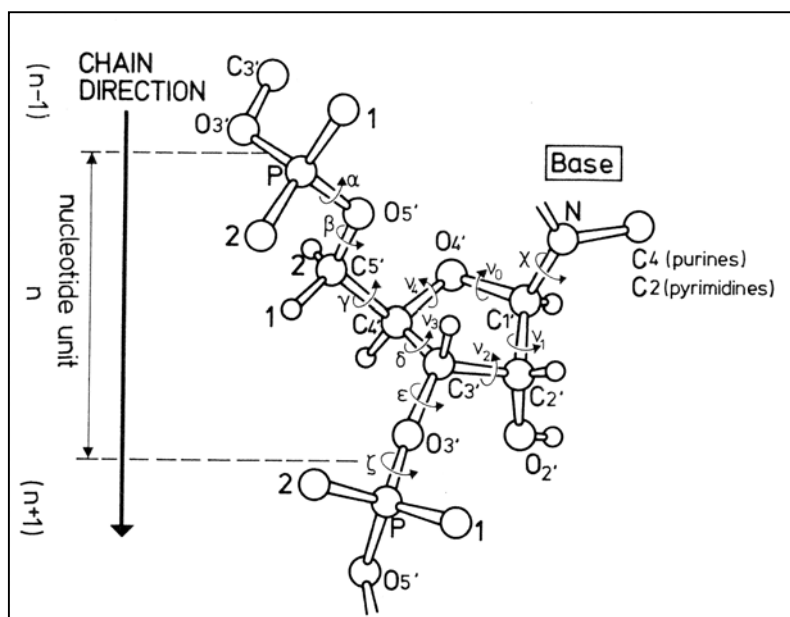


**Fig. I-3.4.** Definició dels paràmetres de l'hèlix de DNA corresponents a la rotació (Dickerson, 1989).



**Fig. I-3.5.** Definició dels paràmetres de l'hèlix de DNA corresponents a la translació (Dickerson, 1989).

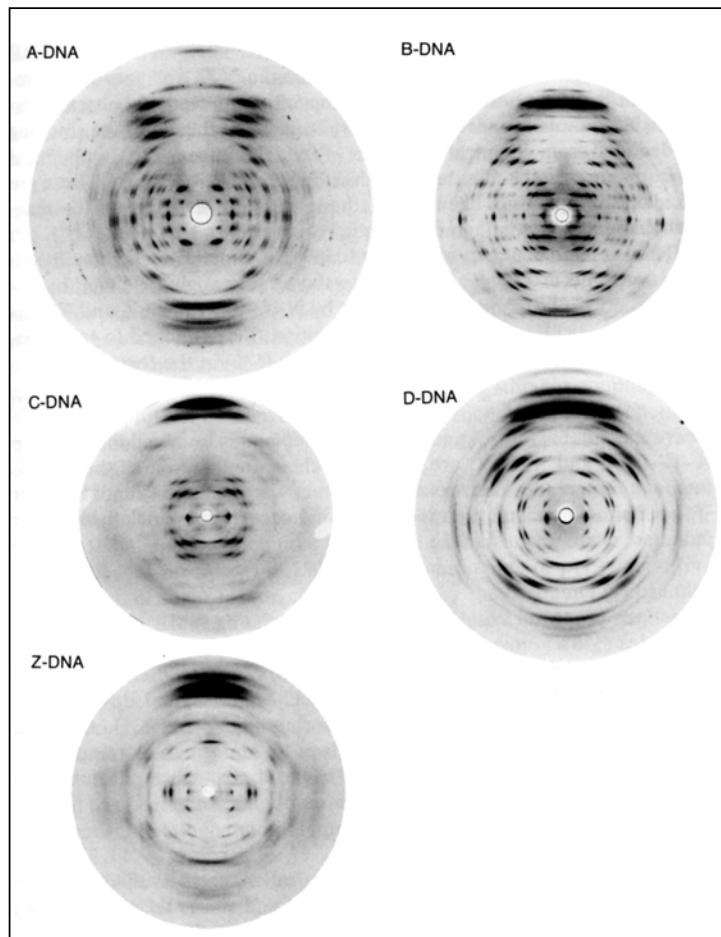
Finalment, cal definir els angles de torsió presents en una molècula de DNA els quals descriuen l'estructura tridimensional de la molècula (Fig. I-3.6). Els angles de torsió de l'esquelet d'un polinucleòtid són:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  i  $\zeta$  seguint els àtoms  $P \rightarrow O5' \rightarrow C5' \rightarrow C4 \rightarrow C3' \dots$ . Els angles de torsió del sucre s'anomenen amb les lletres  $\nu_0 - \nu_4$  i l'angle  $\chi$  és el que defineix l'orientació de la base respecte el sucre, donant les conformacions *syn* i *anti* prèviament descrites.



**Fig. I-3.6.** Esquema dels angles de torsió presents en un nucleòtid (Saenger, 1984).

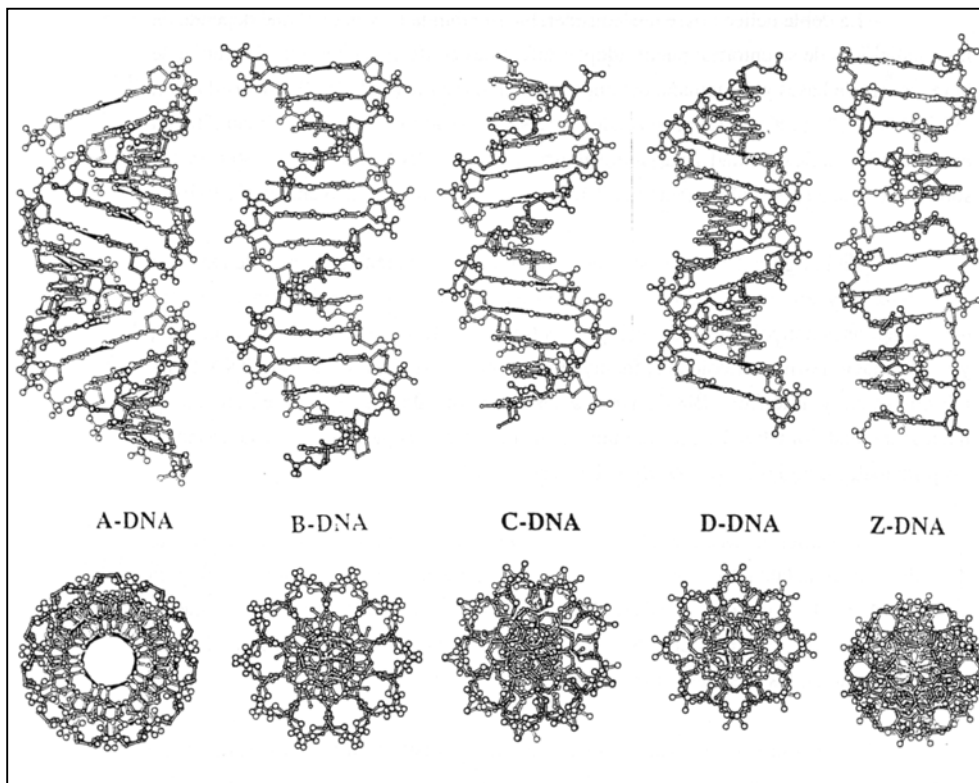
## 4. POLIMORFISME DEL DNA

Una doble hèlix de DNA pot adoptar diferents conformacions depenent de les condicions en que es troba (hidratació, ions, etc.) i també de la composició de la seva seqüència. Aquestes diferents formes del DNA s'anomenen amb les lletres A, B, C, D i Z. A la figura I-4.1 es mostren uns exemples de diagrames de fibra obtinguts per les diferents conformacions del DNA, totes elles diferents:



**Fig. I-4.1.** *Diagramens de fibra de les diferents formes del DNA: A, B, C, D i Z (Saenger, 1984).*

Les formes A, B, C i D són hèlixs dextrogires mentre que la forma Z és l'única que adopta la forma d'una hèlix levogira (Fig. I.4-2).



**Fig. I-4.2.** Representació de les diferents formes del DNA en vista frontal i en projecció (Saenger, 1984).

Totes elles presenten unes diferències estructurals que les caracteritza, les més importants es resumeixen a la taula I-4.1:

Forma	Pas de l'hèlix (nm)	pb per volta*	Inclinació de les bases (°)
A	2.82	11	20
B	3.38	10	6
C	3.10	8.5-9.7	8
D	2.43	8	16
Z	4.35	-12	7 i 18

**Taula I-4.1.** Paràmetres característics de les diferents formes del DNA. \*pb es refereix a parells de bases.

Per tant, les diferents conformacions del DNA es poden diferenciar clarament. Aquestes diferències els dona unes característiques especials a cadascuna d'elles.

### La forma B del DNA

Aquesta representa la forma més important que adopta el DNA i és la que es troba normalment en dissolució. La primera estructura de la forma B va ser la descrita per Watson i Crick (1953). Actualment s'han resolt moltes estructures de cristalls amb la forma B i d'aquí es treuen unes característiques generals per aquesta conformació:

Presenta dos solcs, el solc menor i el solc major de característiques diferents que són molt importants per interaccionar amb proteïnes, fàrmacs, ions, etc. Els dos solcs tenen dimensions diferents sent el solc major més gran que l'altre, aquestes dimensions vénen afectades tant per la seqüència del DNA com per la interacció de fàrmacs.

Com es pot veure a la taula I-4.1, el valor mig de parells de base per volta és de 10, amb un pas de l'hèlix de 3.38 nm i amb una inclinació de 6°. La conformació dels sucres és normalment C3'-*exo*.

Tot i que hi ha uns paràmetres característics generals de la forma B del DNA, s'ha observat amb els cristalls d'oligonucleòtids resolts, una variabilitat en els paràmetres de l'hèlix de les diferents bases o parells de bases. Per exemple, es detecten diferències en el valor de gir i consegüentment en els angles



conformacionals, la conformació dels sucres, etc. (Yanagi *et al.*, 1991). Aquestes diferències depenen de la seqüència així com de l'entorn de cristal·lització d'aquesta.

### **Les formes A, C, D i Z**

Aquestes formes també trobades en estructures de DNA són minoritàries en comparació amb la forma B. Tot i així, poden ser interessants degut a les seves peculiaritats estructurals:

La forma A del DNA s'estabilitza en condicions de deshidratació (Ivanov i Krylov, 1992) i ha estat cristal·litzada en nombroses ocasions. Totes elles contenen la seqüència GG que sembla important de cara a estabilitzar aquesta forma del DNA. Els sucres adopten una forma C3'-*endo*. Els dos solcs que presenta tenen una longitud semblant però un d'ells és molt més profund que l'altre. Aquesta forma no s'ha pogut obtenir en dissolució aquosa el que fa pensar que no té una funció biològica. Tot i així no està del tot clar ja que el RNA només existeix en la forma A.

La forma C és segurament la més semblant a la forma B, té uns solcs semblants i la mateixa conformació dels sucres però apareix en condicions de deshidratació. És més difícil d'obtenir que les altres però s'ha observat tant en DNA sintètic com natural.

La forma D s'ha obtingut només en seqüències alternants que contenen les bases A i T i va ser descrita per primer cop per Davies i Baldwin (1963) en una fibra de poli [d(AT)d(AT)]. Aquestes poden donar una forma de característiques diferents a la B i amb un solc menor molt més profund, formant una bona cavitat per contenir aigua o ions. Els seus sucres es troben en C3'-*exo*.

Tant de la forma C com de la forma D no s'han obtingut cristalls d'oligonucleòtids que puguin confirmar les estructures obtingudes a través de fibres.

Finalment, la forma Z del DNA és l'única que és levogira. L'interès biològic d'aquesta forma encara és poc clar ja que només s'aconsegueix obtenir-la en dissolució en condicions de força iònica molt altes. Tot i així, s'ha visualitzat en cromosomes de *Drosophila* i sembla que pot estar involucrada en la regulació del DNA supercoil. S'han obtingut fibres i cristalls amb aquesta conformació, el primer cristall va ser descrit amb la seqüència d(CGCGCG) per Wang *et al.* (1979). Una característica important que s'observa en aquestes estructures és que només té un solc, el solc menor.

### Triplets i quadruplets

A part de la doble hèlix de DNA, s'han observat altres estructures en les que hi intervenen més de dues hèlixs, concretament es coneixen estructures amb tres i amb quatre cadenes senzilles.

#### Triplets de DNA

La idea d'una estructura triple de DNA data de fa molts anys quan Pauling va proposar aquest model pel DNA estàndard. Aquesta hipòtesi va ser refusada amb la resolució de la doble hèlix de Watson i Crick. La primera evidència de triplets que es té va ser descrita per Felsenfeld *et al.* (1957). Primer es van observar aquest tipus d'estructures amb el RNA (Felsenfeld *et al.*, 1957, Lipsett, 1963) i després en mescles RNA i DNA.

Un triplet de DNA és la unió d'una cadena senzilla d'àcids nucleics al solc major d'un DNA dúplex. Hi ha dot tipus de triplets que es diferencien segons l'orientació i composició de la tercera cadena senzilla:

1. Triplets paral·lels YRY. Aquests presenten els següents aparellaments: T:AT i C<sup>+</sup>:GC, els dos amb uns ponts d'hidrogen tipus Hoogsteen.
2. Triplets antiparal·lels RRY. Amb uns aparellaments G:GC, A:AT i T:AT, en aquest cas amb una interacció Hoogsteen inversa.

sent Y = pirimidina i R = purina.

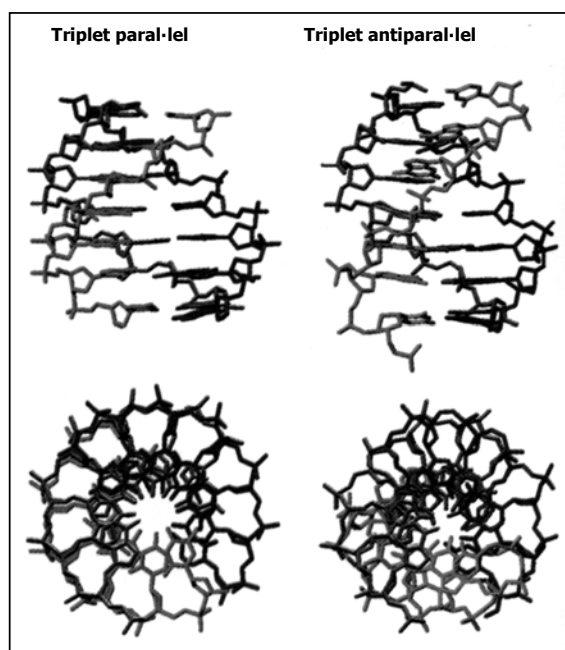
Un exemple de triplets de DNA es mostra a la figura I-4.3.

Els triplets es formen en condicions biològiques però el seu paper encara no està del tot clar. S'ha vist però que poden inhibir enzims com la RNA polimerasa, DNAasa I i RNAasa (Morgan i Wells, 1968, Murray i Morgan, 1973). A més, estudis realitzats per Frank-kamenetskii l'any 1986 proposen que els triplets es formen *in vivo*. Sembla que també puguin tenir un paper en la condensació dels cromosomes o en la regulació transcripcional.

Una altra línia d'investigació referent als triplets és la seva utilització com agents terapèutics. L'especificitat de seqüència és la característica més important que poden aportar. Hi ha varies possibles vies d'acció amb aquests triplets: una d'elles és utilitzar-los com a diana per reconèixer un DNA dúplex concret i actuar així sobre la transcripció (bloquejar-la) o inhibir la producció de proteïna. Una altra

possibilitat és la de crear nucleases artificials més específiques que les naturals ja que les seqüències de reconeixement són més llargues.

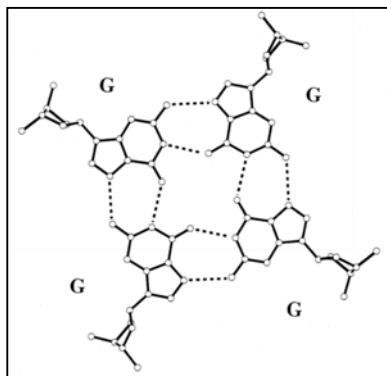
L'estabilització d'aquestes estructures es pot induir modificant la seqüència de la tercera cadena, mitjançant fàrmacs intercalants o que interaccionen amb el solc menor, o també modificant la cadena de fosfats o els sucres.



**Fig. I-4.3.** Representació d'un triplet paral·lel YRY (esquerra) i d'un triplet antiparal·lel RRY (dreta). Es mostra un vista frontal i una projecció de les estructures (Neidle, 1999).

#### Quadruplets de DNA

Una altra de les possibles estructures que pot adoptar el DNA és el quadruplet. Aquest està format per pisos de quatre bases aparellades que s'apilen entre elles. Normalment les tètades estan formades per quatre guanines (Fig. I-4.4) però també s'han trobat altres tipus de tètades com les de citosines i guanines (Kettani *et al.*, 1995) o les de quatre timines (Cáceres *et al.*, 2004).

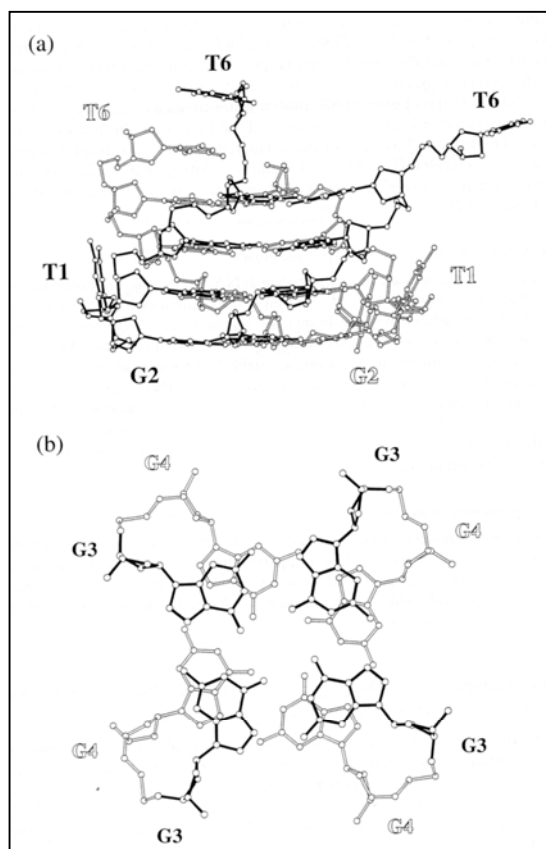


**Fig. I-4.4.** Esquema d'una tètrada de guanines (Neidle, 1999).

La importància biològica d'aquests arranjaments recau en els telòmers. Aquests estan situats al final dels cromosomes i són rics en guanines (Blackburn, 2001). Es creu que en determinades condicions poden adoptar una estructura en forma de quadruplet. *In vitro* sí que s'ha demostrat que seqüències riques en guanines poden formar quadruplets, hi ha diverses estructures resoltes per RMN i per raigs X que demostren la seva existència (Patel *et al.*, 1999).

Hi ha diferents tipus de quadruplets en funció de com es disposen les cadenes: paral·lels, antiparal·lels o mesclades de les dues. A la figura I-4.5 es mostra un exemple d'una estructura d'un quadruplet.

S'estan realitzant diversos estudis per utilitzar aquests quadruplets com agents terapèutics (Han i Hurley, 2000). Es creu que la formació d'aquests quadruplets al final dels telòmers pot inhibir l'acció de l'enzim telomerasa. Per tant, la línia d'aquestes investigacions és intentar induir la formació de quadruplets. Es sap que ions monovalents com el  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $Tl^+$  ajuden a estabilitzar aquestes estructures (Basu *et al.*, 2000) però també s'estan dissenyant fàrmacs intercalants que puguin apilar-se entre dues tètrades i ajudar també a induir el quadruplet (Cuesta *et al.*, 2003). Recentment, s'ha resolt per raigs X una estructura del telòmer d'*Oxytricha nova* amb un fàrmac derivat de l'acridina (Haider *et al.*, 2003).



**Fig. I-4.5.** *Quadruplet obtingut amb un cristall de la seqüència d(TG<sub>4</sub>T) (Laughlan et al., 1994, Phillips et al., 1997). (a) Vista frontal de l'estructura. (b) Visió de l'apilament de dues tètades G:G:G:G del cristall.*

## 5. HIDRATACIÓ DEL DNA

L'aigua present en les molècules no només té la funció de dissoldre-les sinó que interacciona amb aquestes. Concretament en macromolècules, té un paper molt important per mantenir les seves estructures secundàries i terciàries. Per exemple, en el DNA disminueix les repulsions electrostàtiques entre fosfats.

Ja s'ha comentat en apartats anteriors que el grau d'hidratació del DNA pot induir canvis de conformació: en general, en condicions d'alta humitat s'obté la forma B-DNA mentre que si es deshidrata la molècula es poden obtenir les altres conformacions A, C, D i Z, depenent també dels ions presents i de la seqüència.

Falk *et al.*, (1963) van estudiar els canvis en l'espectre infraroig del DNA en variar la humitat d'aquest. L'objectiu era determinar la posició espacial de les molècules d'aigua. D'aquí van observar que primer s'hidrataven els fosfats, en segon lloc els sucres i finalment les bases.

Estudis termodinàmics i hidrodinàmics en dissolució van també demostrar que el DNA té una quantitat d'aigua estàtica a la seva superfície. Per estudiar més detalladament a on estan localitzades aquestes aigües calen però altres tècniques més acurades com pot ser la difracció de raigs X.

A partir de cristalls d'oligonucleòtids s'ha pogut analitzar la hidratació del DNA. La part ordenada de les molècules d'aigua es pot diferenciar en dues capes, la capa primària i la secundària. La primària és impermeable als cations i es diferencia clarament de la part de dissolvent desordenada. Aquesta consta d'unes 11-12 molècules d'aigua per nucleòtid unides amb una força decreixent als fosfats, sucres i bases. La capa secundària no es troba tan ordenada com la primària i és més difícil de diferenciar de la part de dissolvent desordenada (Tunis i Hearst, 1968).

Schneider i Berman (1995) van realitzar estudis a partir de cristalls d'oligonucleòtids per tal de predir l'esquelet d'aigües en una estructura de B-DNA. D'aquí es va concloure que les aigües d'hidratació de moltes de les bases en una hèlix eren molt semblants a les de les bases soles però amb possibles modificacions. També es demostra que les bases puríniques adenina i guanina tenen una hidratació molt semblant i passa el mateix amb les bases pirimidíniques timina i citosina.

Un tret important de la hidratació del DNA és la diferent accessibilitat del dissolvent per les diferents bases: un parell de bases AT pot interaccionar amb una o dues molècules d'aigua més que un parell CG. A més, en diverses estructures d'oligonucleòtids (per exemple, Vlieghe *et al.*, 1999, Soler-López *et al.*, 1999) s'ha trobat un esquelet d'aigües molt ben definit i constant interaccionant en el solc menor d'una regió formada per bases AATT.

## 6. INTERACCIÓ DEL DNA AMB IONS

La interacció del DNA amb ions té molta importància tan biològica com conformacional. Els ions poden estabilitzar o inestabilitzar estructures, poden afectar a la funció d'enzims i estan implicats en processos cel·lulars com la replicació, transcripció i traducció (Eichhorn, 1973).

El DNA és un polielectròlit que interacciona amb ions de dues maneres diferents: d'una manera difusa, per un apantallament de càrregues, o mitjançant una unió específica. Els dos tipus d'interacció presenten característiques diferents, la primera és independent de la seqüència mentre que la segona no. En general, la interacció d'un ió amb el DNA és a través d'una molècula d'aigua però hi ha excepcions com per exemple la interacció dels ions  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  amb el N7 de guanines, sent aquesta una interacció directa ió-DNA.

Els àcids nucleics presenten concretament quatre llocs on hi pot interaccionar un ió: els oxígens dels fosfats carregats negativament, els hidroxils de les riboses, els nitrògens dels anells de les bases i els grups ceto de les bases (Fig. I.6.1). Hi ha molts tipus d'ions *in vivo* i *in vitro* amb característiques diferents i per tant que afectaran de manera diferent al DNA.

Pels estudis de cristal·lització els ions també hi tenen un paper molt important; l'obtenció de cristalls amb una seqüència concreta pot dependre molt directament del tipus i la concentració d'ions. Com ja s'ha citat anteriorment també poden afavorir una o altra forma del DNA i produir modificacions als paràmetres de l'hèlix (Soumpasis, 1985). Cal tenir present que en general, la majoria d'ions estan hidratats, es puguin detectar o no les seves aigües d'hidratació.

A continuació es descriurà més detalladament els lloc d'interacció del ions amb el DNA i quin tipus d'ions s'estabilitzen a cada posició:

### **Fosfats**

Els oxígens carregats negativament dels fosfats poden interaccionar amb molts tipus de cations, tan monovalents com divalents. La interacció que es dona és electrostàtica.



## Sucres

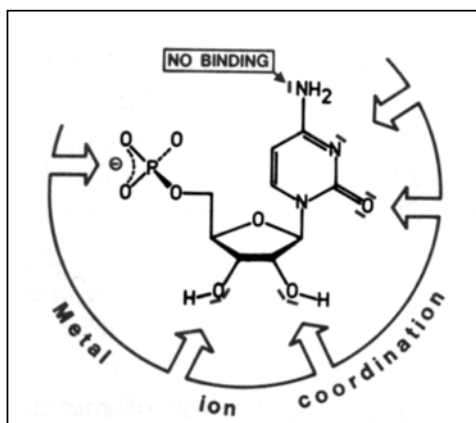
Els grups hidroxils dels sucres, en general interaccionen amb cations alcalins o alcalinoterris. Els electrons lliures de l'oxigen es cedeixen al catió per tal de formar aquestes interaccions.

## Nitrògens de les bases

Els anells aromàtics de les bases contenen nitrògens que degut als seus electrons desaparellats poden interaccionar amb cations. Preferencialment interaccionen amb alcalins i metalls de transició tot i que també poden interaccionar amb alcalinoterris.

## Grups ceto de les bases

Poden interaccionar amb ions metàl·lics. Mentre que en les pirimidines es pot donar interacció amb els oxígens O2 i O4, en les purines l'oxigen O6 normalment no interacciona ja que el N7 d'aquestes bases és un lligant millor.



**Fig. I-6.1.** Possibles llocs de coordinació d'ions en un nucleòtid (Saenger, 1984).

## **7. INTERACCIÓ DEL DNA AMB FÀRMACS**

La propietat del DNA de ser el portador de la informació genètica el fa una molècula clau com a diana per interaccionar amb fàrmacs. Aquests poden interferir en processos tan importants com per exemple la transcripció i replicació del DNA.

La manera principal d'interacció DNA-fàrmac és a través de molècules petites (sovint aromàtiques) que s'uneixen al DNA de diverses maneres:

1. Interaccionant amb els solcs
2. Reaccionant covalentment
3. Intercalant-se entre les bases

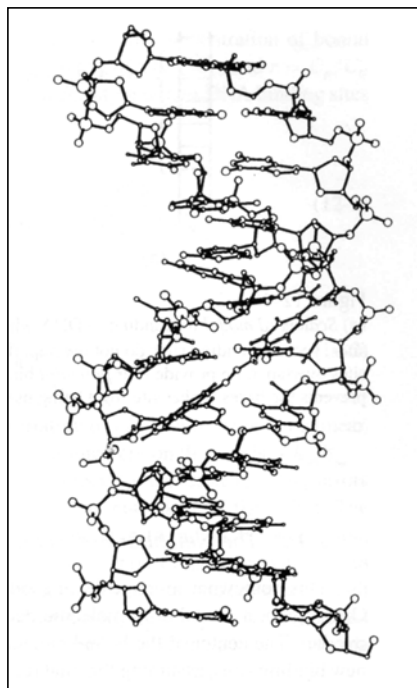
La interacció del DNA amb aquest tipus de lligants és una via relativament senzilla de cara a dissenyar nous fàrmacs amb aplicacions terapèutiques o a millorar-ne les seves propietats.

Hi ha però altres modes d'interacció de fàrmacs amb el DNA: a través de control dels factors de transcripció i polimerasa on els fàrmacs interaccionen amb les proteïnes unides al DNA. Una altra possibilitat és la unió RNA-DNA per formar hèlixs triples o per formar híbrids RNA-DNA que poden interferir en l'activitat transcripcional.

### **Fàrmacs que interaccionen amb el solc menor**

Els fàrmacs que interaccionen amb els solcs del DNA ho fan generalment a través del solc menor. Uns exemples molt estudiats d'aquest tipus de fàrmacs són la netropsina o el berenil (Fig. I-7.1). Aquestes són molècules curvades, propietat que afavoreix la seva interacció amb el solc del DNA. La netropsina és específica per regions riques en A·T del solc menor. La interacció és a través de ponts d'hidrogen entre els grups amida de la netropsina i el N3 i O2 de les bases adenina i timina, respectivament.

Es coneixen molts fàrmacs que interaccionen amb el solc menor (Zimmer i Wähnert, 1986) amb diverses aplicacions terapèutiques, actuant sovint com a antibiòtics.

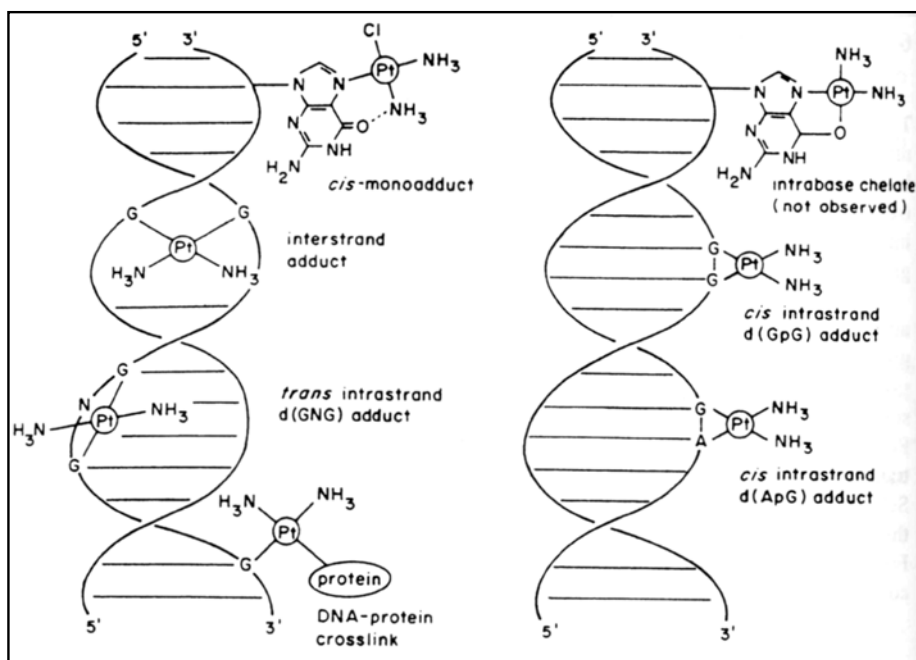


**Fig. I-7.1.** Model obtingut per RMN de la seqüència d(CGCGAATTCGCG) amb el fàrmac berenil unit al solc menor (Lane *et al.*, 1991).

### **Fàrmacs que s'uneixen covalentment al DNA**

Es coneixen nombrosos compostos ja siguin naturals o sintètics que poden reaccionar covalentment amb el DNA formant així un adducte covalent. En alguns casos està demostrada la seva activitat com a molècules anticancerígenes (Dandliker *et al.*, 1997, Lepre i Lippard, 1990).

El DNA pot reaccionar amb aquests compostos per diferents llocs: pel solc menor, a través dels grups amino de les guanines, el N3 de les adenines, etc. Un exemple d'aquest tipus de fàrmac és el *cis*-platí (Fig. I-7.2) que s'utilitza com a anticancerígen.



**Fig. I-7.2.** Representació esquemàtica de possibles llocs d'unió cis-platí-DNA (Lepré i Lippard, 1990).

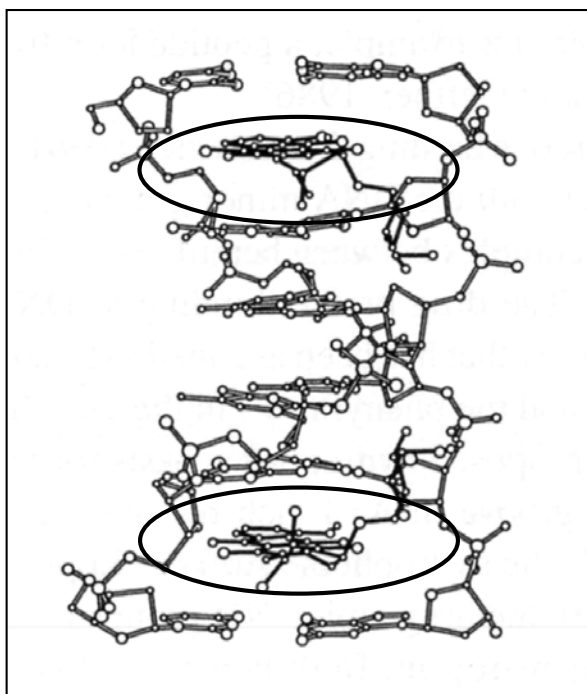
### Fàrmacs intercalants

Una tercera família de molècules petites que interaccionen amb el DNA són els fàrmacs intercalants. La intercalació va ser proposada per primer cop per Lerman (1961) i requereix molècules amb una part aromàtica capaç d'intercalar-se entre les bases del DNA interaccionant amb elles a través d'interaccions  $\pi$ - $\pi$ . En produir-se la intercalació, els parells de bases que contenen el fàrmac es separen, deixant així espai per a la molècula, actuant aquesta com un parell de bases addicional. També es produeixen altres canvis en el DNA com per exemple una disminució del valor del gir en el lloc de la intercalació, es produeixen canvis també en el pendent i en el propulsor d'hèlix.

Quan s'estudia la intercalació s'ha de tenir present el principi d'exclusió el qual estableix que la intercalació no es pot donar en parells de bases consecutius. Per tant, tot i que en principi tots els parells de bases són llocs potencials per donar-se la intercalació, quan un parell de bases té un fàrmac intercalat, la intercalació en els parells de bases adjacents queda inhibida.

Hi ha moltes estructures estudiades per raigs X que contenen un fàrmac intercalat. La gran majoria s'han obtingut amb els hexàmers CGTACG i CGATCG (Fig. I-7.3), però també amb altres seqüències més llargues com octàmers o dodecàmers.

El lloc d'intercalació és sempre un pas no alternant (normalment CG) amb excepció de dues estructures descrites recentment on el fàrmac es troba intercalat en passos CC/GG i AA/TT (Lisgarten *et al.*, 2002, Malinina *et al.*, 2002). Aquestes últimes estructures obren una via d'estudi de cara a induir especificitat en els fàrmacs ja que sovint és el problema que presenten aquest tipus de molècules.



**Fig. I-7.3.** Estructura de l'hexàmer d(CGATCG) amb dues molècules del fàrmac daunomicina intercalades en els passos CG (Wang *et al.*, 1987).

Per tal de completar aquests estudis és molt important detectar primer si un fàrmac intercala, i en segon lloc, veure si és específic per una determinada seqüència. La difracció de raigs X és una tècnica molt important per aquests estudis i permetrà analitzar molt detalladament les interaccions entre el fàrmac i el DNA. Però com que és una tècnica relativament lenta i laboriosa, sovint interessa partir d'informació obtinguda amb altres tècniques.

Estudiar directament la intercalació no és sempre evident, moltes de les tècniques que s'utilitzen detecten efectivament una interacció del DNA amb el fàrmac però no totes confirmen que aquesta sigui una intercalació. Les tècniques més utilitzades per aquest propòsit són:

- UV-visible: es basa en utilitzar els canvis espectroscòpics que pateix el fàrmac en interaccionar amb el DNA: el màxim d'absorció d'aquest es desplaça cap a longituds d'ona més grans i la seva absorbància disminueix (Waring, 1965).
- Viscositats: la comparació de mesures de viscositat d'un DNA amb i sense fàrmac pot donar informació de si hi ha o no intercalació. Un augment en la viscositat indica que el fàrmac s'ha intercalat en el DNA (Lerman, 1961).
- Calorimetria: mesures directes de la temperatura d'unió entre un fàrmac i el DNA donen informació de l'entalpia i entropia relacionades amb el procés d'unió.
- Corbes de fusió: mitjançant la mesura del punt de fusió d'un oligonucleòtid amb i sense fàrmac es pot detectar d'una manera molt fàcil i ràpida si el fàrmac estableix o no l'oligo. Aquestes mesures però, no afirmen que l'estabilització sigui deguda a una intercalació.
- Diàlisi: emprant el mètode descrit per Ren i Chaires (1999) es pot detectar l'especificitat de seqüència d'un fàrmac. Aquesta tècnica és molt útil ja que permet realitzar els estudis amb oligonucleòtids i dona informació de l'especificitat de seqüència. El problema que pot presentar és que per tal d'utilitzar-la cal que el fàrmac absorbeixi a l'UV-visible.
- Footprinting: aquest mètode és àmpliament utilitzat i també permet estudiar l'especificitat de seqüència dels fàrmacs (Fox, 1997).

## 8. APLICACIONS DEL DNA EN NANOTECNOLOGIA

S'entén per nanotecnologia els estudis que pretenen obtenir objectes a gran escala els components dels quals siguin de l'ordre de centenars de nanòmetres. Les aplicacions de la nanotecnologia avarca moltes disciplines com pot ser la medicina, l'enginyeria electrònica i computacional, química, etc.

El DNA és una de les molècules que s'utilitza en nanotecnologia. Les seves propietats fan que sigui una molècula interessant per aquestes aplicacions. Aquestes propietats són per una banda les seves mides petites: un diàmetre d'uns 2 nm, un pas d'hèlix de 3.4-3.6 nm, etc. i per altra banda la complementaritat de les bases que el formen C amb G i T amb A, amb la capacitat de reconeixement que això comporta. Actualment hi ha molts grups de recerca que tenen com a objectiu aprofitar aquestes propietats del DNA i aplicar-les en nanotecnologia. Alguns exemples d'aquestes línies de recerca són:

La unió en el DNA ramificat d'extrems cohesius que permetin crear estructures complexes com pot ser un cub, un octàedre truncat, cristalls de DNA bidimensionals, etc. (Winfrey *et al.*, 1998, Seeman, 2003).

Una altra modificació que millora les propietats del DNA és la inserció en una doble hèlix de bases modificades capaces de complexar un metall com el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$  o  $\text{Ag}^+$ , revisat per Wagenknecht (2003). Aquestes modificacions augmenten l'estabilitat de la doble hèlix.

Altres aplicacions són: unió de nanopartícules d'or al DNA (Stevenson *et al.*, 2002) que pot tenir aplicacions per crear dispositius òptics, sensors. També s'estudien nanotubs de carboni amb reconeixement de DNA (Williams *et al.*, 2002), o la conductivitat i superconductivitat induïda en el DNA, o bé la creació de dispositius elèctrics i magnètics basats en DNA, etc.

## 9. OBJECTIUS

L'objectiu general de la tesi era l'estudi de les interaccions del DNA amb fàrmacs intercalants i amb metalls de transició. Els fàrmacs que es volien estudiar són derivats de sistemes aromàtics com l'acridina i l'antraquinona. La majoria d'aquests tenen units diferents aminoàcids i es pretenia poder-los detectar per raigs X encara que en general són molt mòbils i presenten interaccions inespecífiques (García-Pérez *et al.*, 2003). Pel que fa als metalls de transició són interessants per la propietat que tenen de poder interaccionar amb nitrògens dels anells aromàtics de les bases, a més a més de poder interaccionar electrostàticament. Aquestes interaccions ens han de permetre entendre més per una banda el mecanisme de funcionament dels fàrmacs i per l'altra el paper dels ions en l'estabilització del DNA.

Un segon objectiu i relacionat amb el primer era intentar induir la intercalació de fàrmacs en un pas AA/TT. Recentment s'havia publicat al laboratori una estructura del dodecàmer d(CGCGAATTCGCG) amb una acridina intercalada en aquest pas (Malinina *et al.*, 2002) i a partir d'aquests resultats, es pretenia comprovar si l'estructura obtinguda era casual o es podia realment induir aquesta intercalació. En aquesta línia, i partint de l'estructura del fàrmac intercalat, es van dissenyar fàrmacs derivats d'aquest.

Per portar a terme aquests objectius s'ha emprat sobretot la cristal·lografia de raigs X. Aquesta tècnica ha de permetre estudiar d'una manera detallada les estructures i interaccions presents en aquestes. Com que l'estudi d'una estructura per raigs X és sovint un procés lent, es volia utilitzar altres tècniques per tal d'obtenir una informació prèvia dels fàrmacs i realitzar cristal·litzacions més dirigides. Aquestes altres tècniques són el footprinting, fluorescència, viscositats i modelatge molecular. Es pretenia obtenir d'aquestes tècniques una orientació dels millors fàrmacs i posteriorment utilitzar-los pels estudis cristal·logràfics.